

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON

LUCIANA IURKIV

INDUTORES DE RESISTÊNCIA E SEUS EFEITOS SOBRE *Bipolaris sorokiniana*
E *Azospirillum brasilense* EM TRIGO: CUSTOS ADAPTATIVO E ECOLÓGICO

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2016

LUCIANA IURKIV

**INDUTORES DE RESISTÊNCIA E SEUS EFEITOS SOBRE *Bipolaris sorokiniana*
E *Azospirillum brasilense* EM TRIGO: CUSTOS ADAPTATIVO E ECOLÓGICO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Vandeir Francisco Guimarães

Coorientador: José Renato Stangarlin

Coorientadora: Kátia Regina Schwan-Estrada

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

192i

Iurkiv, Luciana

Indutores de resistência e seus efeitos sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Azospirillum brasilense* em trigo: custos adaptativo e ecológico./Luciana Iurkiv. — Marechal Cândido Rondon, 2016.

72 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães

Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Coorientador: Prof. Dr. Kátia Regina Schwan-Estrada

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2016

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia

1. Mancha marrom. 2. Acibenzolar-S-metil. 3. Mananoligossacarídeo fosforilado. 4. *Bacillus cereus*. I. Guimarães, Vandeir Francisco. II. Stangarlin, José Renato. III. Schwan-Estrada, Kátia Regina. IV. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. V. Título.

CDD 20.ed. 633.11

CIP-NBR 12899

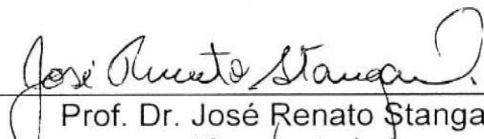
Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

LUCIANA IURKIV

INDUTORES DE RESISTÊNCIA E SEUS EFEITOS SOBRE *Bipolaris sorokiniana* E *Azospirillum brasilense* EM TRIGO: CUSTOS ADAPTATIVO E ECOLÓGICO

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

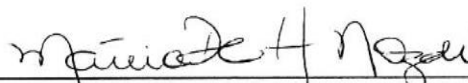
APROVADA: 12 de setembro de 2016



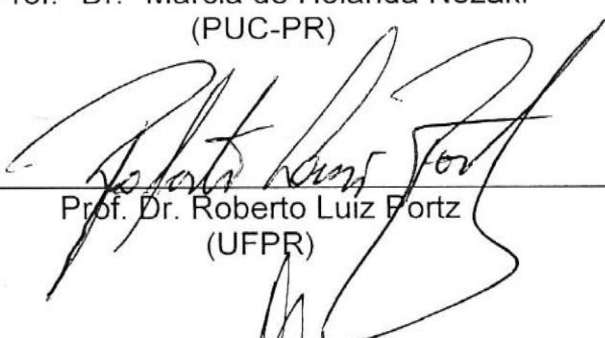
Prof. Dr. José Renato Stangarlin
(Coorientador)
(Unioeste)



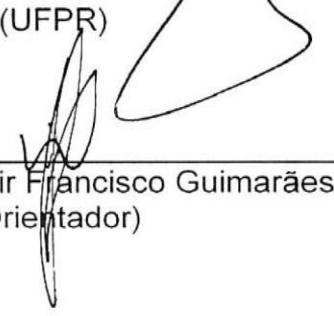
Pesq.ª Dr.ª Sidiane Coltro Roncato
(Unioeste)



Prof.ª Dr.ª Márcia de Holanda Nozaki
(PUC-PR)



Prof. Dr. Roberto Luiz Fortz
(UFPR)



Prof. Dr. Vander Francisco Guimarães
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Agradeço a minha família, meus pais Alice e Estefano, e meus irmãos Ana Márcia, Erivelton, Andréa e Tatiane pelo incentivo e apoio.

Ao meu orientador Professor Dr. Vandeir Francisco Guimarães, pela oportunidade e orientação.

Aos meus coorientadores Professor Dr. José Renato Stangarlin e Professora Kátia Regina Schwan-Estrada, pelo auxílio em todos os momentos.

Ao meu amigo Omari que esteve constantemente presente e colaborou diretamente para a realização deste trabalho, e pela grande amizade.

Às minhas amigas Edilaine, Sidiane e Bruna que colaboraram em diversas etapas fundamentais do desenvolvimento da pesquisa.

Aos amigos André, Débora, Mitio e Cristiane que colaboraram na realização de diversas avaliações.

Às minhas amigas Daliana, Rosane, Juliana Araújo e Juliana Menegolo, pela amizade e companheirismo, as quais compartilharam comigo diversos momentos importantes dessa jornada, e fizeram dela um caminho muito mais agradável.

A todos os meus amigos do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, com os quais eu compartilho diversos momentos de crescimento profissional e pessoal.

A todos os professores e funcionários da UNIOESTE que colaboraram de forma direta ou indireta no desenvolvimento do trabalho.

À EMBRAPA Trigo pelo fornecimento de isolados do patógeno utilizado na pesquisa.

E a todos que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para a realização desta obra.

***"PRECISAMOS DAR UM SENTIDO HUMANO
ÀS NOSSAS CONSTRUÇÕES. E, QUANDO O
AMOR AO DINHEIRO, AO SUCESSO, NOS
ESTIVER DEIXANDO CEGOS, SAIBAMOS
FAZER PAUSAS PARA OLHAR OS LÍRIOS DO
CAMPO E AS AVES DO CÉU." (ÉRICO
VERÍSSIMO).***

RESUMO

IURKIV, Luciana, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Setembro – 2016. Custo adaptativo e ecológico da indução de resistência em trigo contra *Bipolaris sorokiniana*. Orientador: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães. Coorientadores: Prof. Dr. José Renato Stangarlin e Profa. Dra. Kátia Regina Schwan-Estrada.

É reconhecida a eficiência da indução de resistência no controle de fitopatógenos, no entanto, existem custos relacionados à sua aplicação ainda pouco investigados, como é o caso dos custos adaptativos e ecológicos. No presente trabalho objetivou-se verificar a eficiência da aplicação dos indutores acibenzolar-S-metil (ASM), mananoligossacarídeo fosforilado (MOS) e *Bacillus cereus* no controle de mancha marrom em trigo, e sua relação com a indução de enzimas relacionadas a defesa, assim como a interferência sobre as trocas gasosas, sobre o microrganismo não alvo *Azospirillum brasilense*, e a produção da cultura. O experimento foi conduzido sob cultivo protegido no Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Marechal Cândido Rondon. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema fatorial 4 x 2 x 2, com quatro repetições. O primeiro fator “Indutores de Resistência” foi constituído pelos indutores ASM, MOS, *Bacillus cereus* e a testemunha Água. O segundo fator “Patógeno” foi constituído pela presença ou ausência do patógeno *Bipolaris sorokiniana*. O terceiro fator “BPCV” constituiu-se pela presença ou ausência da bactéria promotora de crescimento vegetal *A. brasilense*. As sementes foram inoculadas com *A. brasilense* 24 h antes da semeadura. O tratamento com os indutores de resistência foi realizado 25 dias após a emergência e 24 horas após foi realizada a inoculação com o patógeno. Foram realizadas avaliações para quantificação das enzimas peroxidase, fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase às 0 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 horas após o tratamento. As trocas gasosas foram avaliadas às 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 horas após o tratamento. A quantificação de diazotróficos foi realizada na implantação do experimento, no momento da aplicação dos indutores de resistência e no florescimento da cultura. No florescimento foram realizadas análises biométricas e no final do ciclo, análise dos componentes da produção. A aplicação dos indutores de resistência foi eficiente no controle da mancha marrom em trigo. Os tratamentos indutores não apresentaram interferência sobre os microrganismos diazotróficos

endofíticos. Observou-se maior atividade de peroxidases para o tratamento MOS o qual apresentou grande eficiência no controle da doença. Não observou-se relação entre a atividade de fenilalanina amônia-liase e β -1,3-glucanase e o controle de mancha marrom. Observou-se maior taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) na ausência do patógeno e presença de *A. brasilense*, porém MOS reduziu a A. A concentração interna de CO₂ e a transpiração foliar apresentaram-se superiores nos tratamentos com ausência do patógeno. A condutância estomática foi afetada pelo tratamento MOS. O comprimento da folha bandeira e a área foliar foram afetados negativamente pela aplicação de ASM. Porém, a massa total de grãos não sofreu interferência dos tratamentos, apesar de a massa de 100 grãos ter sido superior para ASM.

Palavras-chave: mancha marrom, acibenzolar-S-metil, mananoligossacarídeo fosforilado, *Bacillus cereus*.

ABSTRACT

IURKIV, Luciana, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, September – 2016. Adaptive and ecological costs of induced resistance in wheat against *Bipolaris sorokiniana*. Advisor: Prof. Dr. Vandeir Francisco Guimarães. Co-Advisors: Prof. Dr. José Renato Stangarlin and Prof. Dr. Katia Regina Schwan-Estrada.

The induced resistance efficiency in the control of pathogens is recognized, however there are costs related to its use that are still little researched, as the case of fitness and ecological costs. This research aims to verify the efficiency of use of the acibenzolar-S-methyl (ASM), mannanoligosaccharide (MOS) and *B. cereus* inductors in the control of spot blotch wheat disease, and its relation with the induction of enzymes related to the plant defense, as well as the interference on gas exchanges, on the non-target microorganisms *A. brasilense*, and on the crop production. The experiment was conducted in green house growing at the Núcleo de Estações Experimentais of the Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon *Campus*. The experimental design was made in randomized block design in a factorial schema 4 x 2 x 2, with four replications. The first factor "Resistance Inductors" was constituted by ASM, MOS, *B. cereus* inductors and water (control). The second factor "Pathogen" was constituted by the presence or absence of *B. sorokiniana* pathogen. The third factor "PGPR" was made up by the presence or absence of the PGPR *A. brasilense*. The seeds were inoculated with *A. brasilense* 24 h before sowing. The treatment with the resistance inductors was done 25 days after the plant emergency and 24 h after it, the inoculation with the pathogen was done. Evaluations for the quantification of peroxidase enzyme, phenylalanine ammonia-lyase and β -1.3-glucanase enzymes activities were done at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h and 96 h after treatment. Gas exchanges were evaluated at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 120 h after treatment. The quantification of diazotrophic was made in the implementation of the experiment, at the moment of the use of the resistance inductors and in the flowering. At the flowering, biometric evaluations were performed, and at the end of the cycle, production analysis were held. The use of resistance inductors was efficient in the control of spot blotch wheat disease. The treatment with inductors did not show any interference on the endophytic diazotrophic microorganism. Higher activity of peroxidases for the MOS treatment was observed, that presented high efficiency on

the control of the disease. No relation between the activities of phenylalanine ammonia lyase and β -1.3-glucanase and the control of spot blotch was observed. A higher tax of liquid assimilation of CO₂ (A) in the absence of the pathogen and presence of the *A. brasilense* was observed, however, MOS reduced the "A". The internal concentration of CO₂ and the leaf transpiration showed as superior in the treatment with the absence of the pathogen. The stomatal conductance was affected by MOS treatment. The length of the flag leaf and leaf area were affected by ASM use. But, the total weight of grain did not suffer interference of the treatments, in spite of the weight of 100 grains to have been superior to ASM.

Key words: spot blotch, acibenzolar-S-methyl, mannanoligosaccharide, *Bacillus cereus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA NAS PLANTAS	3
2.1.1	Enzimas Relacionadas à Defesa.....	4
2.1.1.1	β -1,3-glucanases	4
2.1.1.2	Peroxidase	5
2.1.1.3	Fenilalanina Amônia-liase	5
2.2	RESISTÊNCIA INDUZIDA	7
2.2.1	Elicitores.....	9
2.2.1.1	Elicitores de Origem Biótica.....	11
2.2.1.2	Elicitores de Origem Abiótica.....	12
2.2.2	Custos da Indução de Resistência.....	13
2.2.2.1	Custos Adaptativos da Indução de Resistência.....	14
2.2.2.2	Custos Ecológicos da Indução de Resistência	15
2.3	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL ..	16
2.3.1	<i>Azospirillum brasilense</i>.....	18
2.4	TRIGO	19
2.4.1	Mancha Marrom ou Helminthosporiose em Trigo.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	ENSAIO <i>IN VITRO</i>	23
3.1.1	Inibição do Cresc. Micelial e Esporulação de <i>B. sorokiniana</i>	23
3.2	ENSAIO <i>IN VIVO</i>	23
3.2.1	Localização do Experimento.....	23
3.2.2	Delineamento Experimental	24
3.2.3	Ambiente Experimental	24
3.2.4	Inoculação com <i>A. brasilense</i> e Semeadura	25
3.2.5	Aplicação dos Ind. Resist. e Inoculação com <i>B. sorokiniana</i>	25
3.2.6	Avaliações	26
3.2.6.1	Análises Bioquímicas.....	26
3.2.6.1.1	Determinação de enzimas relacionadas à defesa	26
3.2.6.2	Trocas Gasosas.....	28

3.2.6.3	Severidade da Doença	29
3.2.6.4	Análises Biométricas e Produção	29
3.2.6.3	Isolamento e Quantif. De Microrg. Diazotróficos.....	30
3.3	ANÁLISE DOS DADOS	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1	ENSAIO <i>IN VITRO</i>	31
4.1.1	Inibição do Cresc. Micelial e Esporulação de <i>B. sorokiniana</i>	31
4.2	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	32
4.2.1	Severidade da Doença.....	32
4.2.2	Isolamento e Quantificação de Diazotróficos.....	34
4.2.3	Enzimas Relacionadas à Defesa.....	36
4.2.3.1	Atividade de Peroxidases	36
4.2.3.2	Atividade de Fenilalanina Amônia-liase	38
4.2.3.3	Atividade de β -1,3 glucanase.....	40
4.2.4	Trocas Gasosas	42
4.2.4.1	Taxa de Assimilação Líquida CO ₂ (A).....	42
4.2.4.2	Concentração Interna de CO ₂ (C _i)	44
4.2.4.3	Transpiração Foliar (E)	46
4.2.4.4	Condutância estomática (G _s).....	48
4.2.5	Análises Biométricas e Componentes da Produção	49
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
6	CONCLUSÃO.....	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1 INTRODUÇÃO

Inúmeras alternativas ao controle químico convencional de fitopatógenos, como forma de reduzir os danos associados ao seu emprego, tem-se mostrado eficientes. Dentre elas a utilização de agentes capazes de induzir resistência nas plantas tratadas, ativando, assim, seus próprios mecanismos naturais de defesa, sem qualquer alteração em seu genoma (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997). Nesse sentido, inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos intencionando o desenvolvimento de compostos protetores não-antibióticos, capazes de ativar o potencial natural de resistência em diversas espécies de plantas (MÉTRAUX, 2007). Reconhece-se, portanto, o grande potencial de tais compostos como uma nova geração de produtos para controle de doenças, reduzindo o uso de fungicidas e oportunizando o uso de agentes de biocontrole (LYON & NEWTON, 1997). São diversos os benefícios relacionados ao emprego desta tecnologia, destacando-se a maior segurança para o ambiente em relação ao uso de agrotóxicos, além de evitar a seleção de cepas resistentes de patógenos em virtude do complexo multigenes, que regula esse processo (IRITI & FAORO, 2006).

Entretanto, algo que deve ser considerado, é a existência de custos relacionados ao fenômeno da indução de resistência. Heil & Baldwin (2002) definiram que o custo da resistência induzida é todo efeito negativo sobre a adaptabilidade da planta que resulta da expressão de características de defesa. Os tipos de custos mais comumente discutidos e relatados são os custos de alocação ou adaptativos (KUHN & PASCHOLATTI, 2010), custos ecológicos e custos genéticos (HEIL, 2001). Os custos adaptativos e genéticos têm recebido especial atenção da comunidade científica e diversos trabalhos demonstram seu impacto na produtividade das mais diversas culturas (HEIL et al., 2000; HEIL, 2001; GAYLER et al., 2004;). No entanto, os custos ecológicos têm recebido pouca atenção, sendo escassos os trabalhos relacionados ao tema (VIERHEILIG et al., 1994; LIAN et al., 2000; ZANARDO, 2009). Entretanto, é de fundamental importância para o aprimoramento e aceitação desta tecnologia, o acompanhamento e quantificação de todos os custos envolvidos, visando redirecionar a pesquisa para alcançar benefício maior que os custos pelo seu emprego.

O emprego de ASM, MOS e *Bacillus cereus* tem sua eficiência comprovada por inúmeras investigações realizadas dentre os mais diversos patossistemas. No

entanto, são escassas as pesquisas relativas à interferência causada por esta indução em organismos não alvos, como é o caso de *Azospirillum brasilense*. Neste sentido, busca-se avaliar o controle de mancha marrom em trigo e as alterações fisiológicas e bioquímicas provocadas pelo emprego de agentes indutores ASM, MOS e *Bacillus cereus*, bem como o impacto desta indução na interação com microrganismos diazotróficos e na produção.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA NAS PLANTAS

A doença em planta é a exceção e não a regra, sendo assim, os patógenos expressam um fenótipo virulento somente em um ou um limitado número de espécies hospedeiras. Patógenos inoculados em espécies não hospedeiras perdem a habilidade de crescer e infectar a planta, ou após a infecção encontram um mecanismo de resistência (LAMB et al., 1989). Os mecanismos de defesa de plantas contra patógenos existem em multiplicidade e são extremamente eficientes (ROMEIRO, 1999).

Segundo Pascholati & Leite (2005), a resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos.

Os mecanismos de resistência podem ser pré-formados (ou passíveis, constitutivos) e pós-formados (ou ativos, induzíveis) (KUC, 2001). Os fatores de resistência pré-formados incluem aqueles já presentes nas plantas antes do contato com os patógenos. No caso dos pós-formados, estes mostram-se ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta a presença dos patógenos. Os fatores estruturais da planta atuam como barreiras físicas, impedindo a entrada do patógeno e a colonização dos tecidos, enquanto que as reações bioquímicas que ocorrem nas células do hospedeiro produzem substâncias que mostram-se tóxicas ao patógeno e criam condições adversas ao crescimento deste no interior da planta (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

De acordo com Pascholati & Leite (2005) são exemplos de cada grupo:

- Pré-formados:
 - Estruturais: cutícula, tricomas, estômatos, fibras/vasos condutores.
 - Bioquímicos: fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas e inibidores protéicos.
- Pós-formados:
 - Estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses, hesperidinas.

- Bioquímicos: fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese, espécies reativas de oxigênio.

A combinação de reações de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos empregados na defesa da planta são distintas em diferentes relações patógeno-hospedeiro. Além disso, dentro da mesma relação patógeno-hospedeiro, as combinações para defesa dependem da idade da planta e do tipo de órgão e tecido atacado, condição nutricional da planta e condições climáticas (AGRIOS, 2005).

2.1.1 Enzimas Relacionadas à Defesa

2.1.1.1 β -1,3-glucanases

As β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, composto esse, que juntamente com a quitina, são os principais componentes que dão resistência a parede celular dos fungos (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993). Tem sido proposto que estas glucanohidrolases atuam de pelo menos duas formas diferentes: diretamente, degradando as paredes celulares do agente patogênico; e, indiretamente, promovendo a liberação de fragmentos glicosídicos, tanto da parede celular do patógeno, quanto da própria planta, que podem atuar como elicitores de reações de defesa (LEUBNER-METZGER & MEINS, 1999). De acordo com Van Loon & Van Strein (1999), as β -1,3-glucanases são classificadas como proteínas-RP dentro da família PR-2.

As β -1,3-glucanases são extensamente distribuídas entre bactérias, fungos e plantas. Baseado nas reações de hidrólise catalizadas pela glucanase, β -1,3-glucanases são classificadas em exo- β -1,3-glucanases e endo- β -1,3-glucanases (PANG et al., 2004). β -1,3-glucanases são monômeros com massa molecular entre 25 e 35 kDa e que produzem oligômeros com duas a seis unidades de glicose a partir do substrato laminarina, uma β -1,3-glucana. Existem diferentes isoformas dessa enzima e grande variação entre elas quanto à atividade catalítica relativa sobre o substrato laminarina (CAVALCANTI et al., 2005). Exibem formas básicas, que ocorrem normalmente intracelularmente (nos vacúolos), e ácidas, que ocorrem extracelularmente, e possuem ação imediata na defesa das plantas, pela ação direta nas hifas invasoras (MARTINS, 2008).

2.1.1.2 Peroxidase

O termo peroxidase remete a enzimas capazes de catalizar a oxirredução entre peróxido de hidrogênio e vários redutores ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$), e estão presentes nos tecidos das plantas, em certas células animais e em microrganismos, sendo divididas em três superfamílias baseando-se na sua estrutura e atividade catalítica. As POXs (EC 1.11.1.7) são oxirredutases específicas de plantas pertencentes à Classe III (HIRAGA et al., 2001).

As peroxidases são específicas para oceptor de hidrogênio, sendo ativos somente metil, etil e peróxidos, mas inespecíficas para os doadores de hidrogênio, que podem ser fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e muitos aminoácidos. As peroxidases são glicoproteínas com massa molecular em torno de 40 kDa, conhecidas como enzimas de função dupla, pois são capazes de gerar o H_2O_2 que lhes servirá de substrato (CAVALCANTI et al., 2005).

As peroxidases são responsáveis por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (CAVALCANTI et al., 2005). Entre eles destaca-se a síntese de lignina, no qual os álcoois de fenilpropano são unidos em um polímero pela ação dessa enzima, que cataliza a oxidação desses álcoois, gerando radicais livres intermediários que se associam de forma não enzimática em uma disposição ao acaso para formar lignina (TAIZ & ZEIGER, 2004). A lignina ou processo de lignificação pode interferir com o crescimento de patógenos através de modificações químicas nas paredes celulares (VAN LOON & VAN STRIEN, 1999). Além da lignificação, existem evidências de que as POXs estão envolvidas nos processos de suberificação, catabolismo da auxina, cicatrização de feridas (HIRAGA et al., 2001), respostas de hipersensibilidade e produção de fitoalexinas, grande parte destes envolvidos na defesa contra a infecção por patógenos (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992).

Considerando-se o envolvimento da POX nos processos de defesa, Van Loon & Van Strien (1999), classificaram-na na Família PR-9 das Proteínas Relacionadas à Patogênese.

2.1.1.3 Fenilalanina Amônia-liase

A fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5) é uma enzima que está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que ela cataliza é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004), considerando tratar-se da enzima chave na rota dos fenilpropanóides (RITTER & SCHULZ, 2004). A FAL tem sido encontrada principalmente em plantas, mas também está presente em fungos (RÖSLER et al., 1997) e bactérias (XIANG & MOORE, 2005).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico e amônia. O ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008), sendo que diversas funções essenciais estão associadas a estes, como suporte mecânico (ligninas) (WHETTEN & SEDEROFF, 1995), proteção contra estresses bióticos e abióticos (fitoalexinas, antioxidantes e compostos absorvedores de radiação UV) (DIXON & PAIVA, 1995), e pigmentos como antocianinas (HOLTON & CORNISH, 1995). FAL é uma enzima tetramérica, e a expressão de genes múltiplos em combinação com possíveis modificações pós-traducionais conduz à formação de uma gama de formas heterotetraméricas que pode ser diferente dependendo do estímulo particular. Em feijão, por exemplo, há uma família de três ou quatro FAL-genes, os quais codificam para diferentes isoformas, sendo que os transcritos correspondentes variam de acordo com as diferentes situações biológicas (LIANG et al., 1989).

Em função da sua importância chave no metabolismo secundário dos fenilpropanóides, a FAL é uma enzima largamente estudada por fisiologistas (RITTER & SCHULZ, 2004), e em meio ao fenômeno da indução de resistência, também é uma das enzimas mais estudadas (KUHN, 2007), considerando-se que muitos fenilpropanóides induzidos por estresse biótico são classificados como fitoalexinas, as quais são compostos antimicrobianos sintetizados em resposta ao ataque de patógenos, incluindo pterocarpanos (por exemplo, gliceolina), isoflavonas, isoflavonoides, cumarinas, psoralenos, 3-deoxiantocianidinas, flavonóides e auronas. Os níveis destes compostos aumentam grandemente em torno do local da infecção, chegando a concentrações tóxicas aos agentes patogênicos (DIXON & PAIVA, 1995). O processo de lignificação também possui influência decisiva no

crescimento do patógeno e sua via de síntese é regulada pela FAL (WHETTEN & SEDEROFF, 1995).

2.2 RESISTÊNCIA INDUZIDA

A resistência induzida, ou resistência sistêmica adquirida, envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes existente nas plantas (HAMMERSCHMIDT & DANN, 1997). A ativação deste sistema de defesa é desencadeada por agentes, chamados elicitores, de caráter biótico ou abiótico que resultam na expressão de mecanismos de defesa relacionados à produção de substâncias tóxicas ao patógeno e/ou formação de barreiras estruturais que restringem a colonização dos tecidos (KUC, 2001). A resistência induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (tratamento indutor) e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento desafiador). Essa dependência indica que mudanças específicas no metabolismo da planta, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias importantes no fenômeno da resistência induzida (PASCHOLATI & LEITE, 1995). A efetividade de um agente indutor não é devido à atividade antimicrobiana ou pela habilidade de ser transformado em agente antimicrobiano (KUC, 2001), mas sim pela capacidade de ativar mecanismos de defesa da própria planta.

As duas formas mais claramente definidas de resistência induzida são resistência sistêmica adquirida (SAR), e resistência sistêmica induzida (ISR), que podem ser diferenciados com base na natureza do eliciador e nas vias reguladoras envolvidas (CHOUDHARY et al, 2007). Entretanto, ambos os termos SAR e ISR são empregados como sinônimos. A Figura 1, adaptada de Vallad & Goodman (2004), representa uma comparação entre ambas as formas.

A SAR é caracterizada pela proteção contra um amplo espectro de patógenos (OOSTENDORP et al., 2001) e pode ser desencadeada pela exposição da planta à patógenos virulentos, microrganismos avirulentos e microrganismos não patogênicos (CHOUDHARY et al, 2007), bem como, uma grande variedade de químicos tem apresentado capacidade de ativar SAR. Benzothiadiazole (BTH) (LAWTON et al. 1996), 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) (WARD et al., 1991; UKNES et al. 1992), e ácido salicílico (SA) induzem o mesmo conjunto de PR-gêneses comparado aos biologicamente induzidos na SAR (VERHAGEN et al., 2006). A indução de resistência adquirida já foi demonstrada por inúmeros ativadores disponíveis

comercialmente, como é o caso de BION (ASM, Syngenta) (BOKSHI et al., 2008; THAKUR & SOHAL, 2013) e o agente biológico Milsana (extrato de *Reynoutria sacalinensis*; KHH BioScience), dentre outros (VERHAGEN et al., 2006).

O desenvolvimento da SAR é frequentemente associado com várias respostas de defesa celular, como a síntese de proteínas-RP, fitoalexinas e acúmulo de espécies ativas de oxigênio, rápida alteração na parede celular e aumento na atividade de várias enzimas relacionadas à defesa (THAKUR & SOHAL, 2013).

A indução de SAR é acompanhada pelo acúmulo local e sistêmico de níveis endógenos do hormônio vegetal ácido salicílico (AS), seguido pela expressão de genes-RP (VERHAGEN et al., 2006). A importância do acúmulo de AS para a expressão da SAR foi demonstrada pelo uso de plantas transgênicas NahG. Estas plantas expressam o gene bacteriano nahG salicilato hidroxilase, fazendo delas incapazes de acumular AS (GAFFNEY et al. 1993 citado por VERHAGEN et al., 2006). Plantas NahG não apresentam resposta de SAR. A aplicação exógena de AS, ou um de seus análogos funcionais BTH ou INA, permite a completa expressão da SAR.

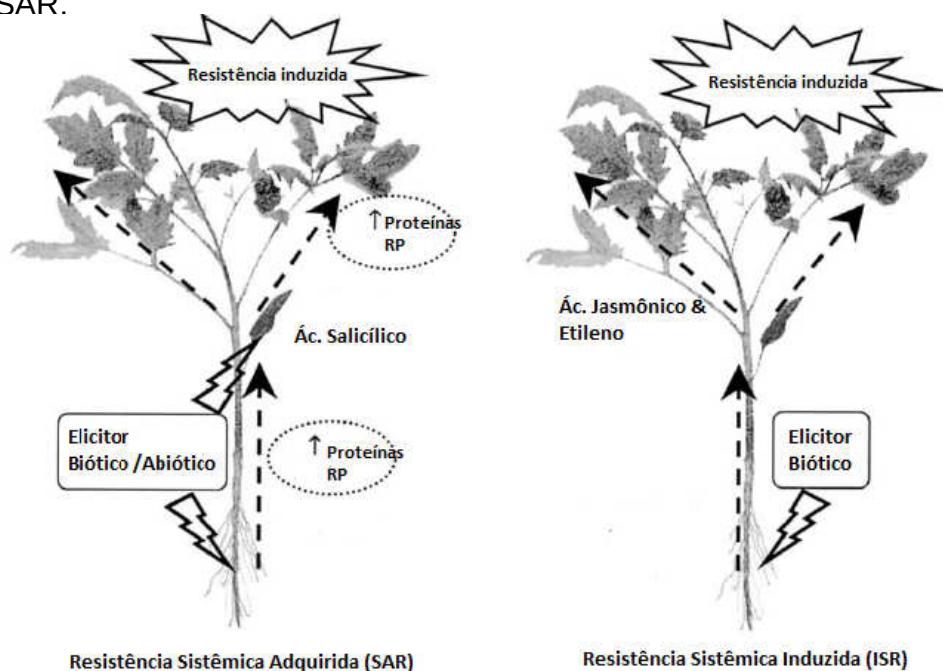


Figura 2.1. Comparação entre as duas formas melhor caracterizadas da indução de resistência em plantas, ambas levam a respostas fenotípicas semelhantes. Resistência sistêmica adquirida, induzida pela exposição da raiz ou tecidos foliares a elicitores abióticos ou bióticos, é dependente do fitohormônio salicilato (ácido salicílico), e associada com o acúmulo de proteínas relacionadas com a patogênese (RP). Resistência sistêmica induzida, induzida pela exposição das raízes a estirpes específicas de rizobactéria promotoras do crescimento de plantas, é dependente do fitormônios etileno e jasmonato (Ácido jasmônico), independente de salicilato, e não está associada com o acúmulo de proteínas RP (ou transcritos). No entanto, ambas as respostas estão interligadas molecularmente, tal como demonstrado pela sua dependência de uma versão funcional do gene *NPR1* em *Arabidopsis thaliana* (adaptada de Vallad & Goodman, 2004).

A ISR, geralmente chamada de resistência sistêmica induzida por rizobactéria, tem sido demonstrada em diferentes espécies vegetais contra diversos patógenos. A expressão da ISR independe da presença de AS (VERHAGEN et al., 2006), sendo que a sinalização nesse caso, depende da presença dos hormônios vegetais ácido jasmônico e etileno (CHOUDHARY et al, 2007).

A ISR é potencializada por bactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR), das quais, as mais bem caracterizadas pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Diferentemente da SAR, a ISR não envolve o acúmulo de PR-proteínas (CHOUDHARY et al, 2007).

2.2.1 Elicitores

A Figura 2.2., adaptada de Thakur & Sohal (2013), apresenta as reações de defesa desencadeadas por um elicitor biótico.

Originalmente, o termo elicitor foi usado para moléculas capazes de induzir a produção de fitoalexinas, porém, atualmente é utilizado para os compostos estimulantes de qualquer tipo de defesa na planta (THAKUR & SOHAL, 2013). De acordo com Eder & Cosio (1994), o efeito de um elicitor é induzir toda uma série de respostas de uma maneira paralela ou sequencial. Segundo estes autores, os indutores de respostas de defesa da planta podem ser divididos em duas categorias, dependendo da sua fonte: sinais exógenos e endógenos. Indutores exógenos são os sinais primários em interações planta-patógeno. Proteínas, glicoproteínas, oligossacarídeos, ácidos graxos, e seus derivados foram identificados como possíveis indutores exógenos. Elicitores endógenos são componentes do sistema de transdução de sinal intercelular de plantas.

Os elicitores podem ser espécie-específicos, que são moléculas codificadas por genes de avirulência (Avr) do patógeno, ou não ser espécie-específicos, como fragmentos de parede celular da planta liberados durante o processo de infecção, que provocam uma resposta de defesa para minimizar a doença (WIT, 2007).

Elicitores parecem ser reconhecidos pelas células da planta via interações com receptores específicos na membrana plasmática. Presume-se que as interações elicitor-receptor geram sinais que então ativam genes no núcleo da célula, envolvidos nas reações de defesa da planta (YOSHIKAWA et al., 1993). Diversos eventos de sinalização ocorrem após a percepção do elicitor, incluindo a fosforilação

reversível de proteínas, mudanças na atividade de proteínas de membrana, variações nas concentrações de cálcio livre no citossol e no núcleo, e produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio. Estes eventos ocorrem dentro dos primeiros minutos até poucas horas depois da percepção do elicitor. A ocorrência de diferentes eventos de sinalização permite a amplificação da transdução de sinal e garante a obtenção de reações de defesa efetivas (GARCIA-BRUGGER et al., 2006).

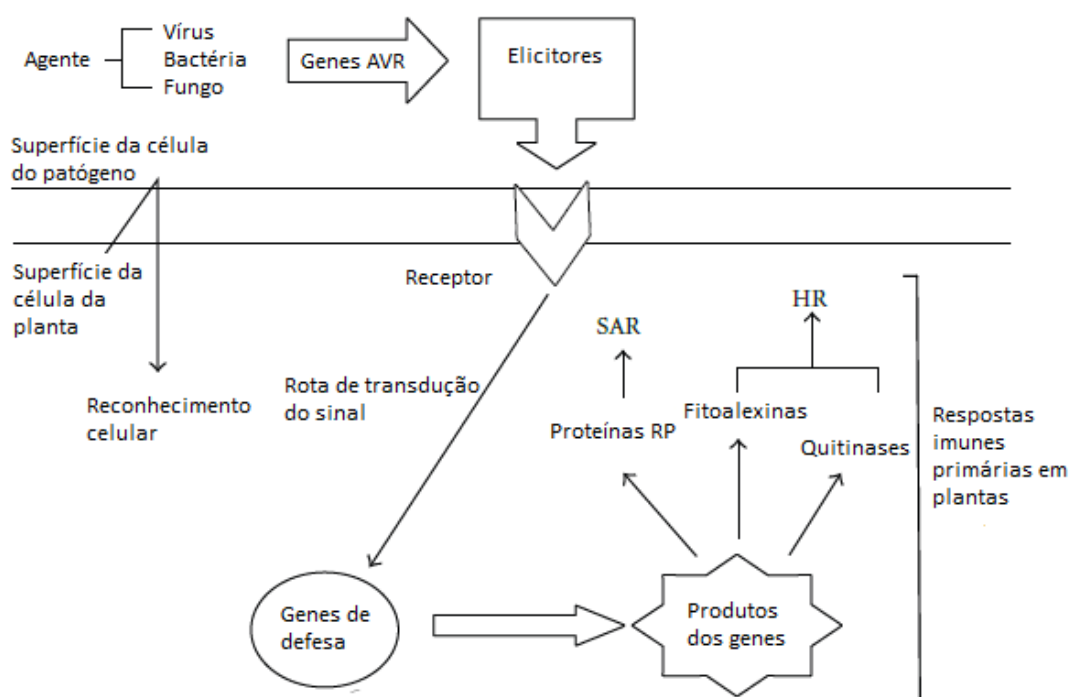


Figura 2.2 Respostas imunes primárias da planta na interação planta – patógeno (adaptada de Thakur & Sohail (2013)).

Os agentes capazes de induzir resistência em plantas podem apresentar natureza química variada, demonstrando a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (STANGARLIN et al., 1999). Uma classificação frequentemente adotada para os elicitores é a baseada na fonte da molécula elicitora, distinguindo-se entre elicitores bióticos e abióticos. Enquanto a primeira classe inclui todas as moléculas derivadas de microrganismos vivos, a segunda classe inclui fatores ambientais de estresse, como luz UV e metais pesados, além de compostos químicos com ação similar a hormônios ou moléculas sinalizadoras na planta (LANCIONI, 2009).

2.2.1.1 Elicitores de Origem Biótica

Uma grande diversidade de agentes tanto de origem biótica como abiótica estão relacionados às respostas de defesa induzida em plantas (KUC, 2001). Em relação aos agentes de origem biótica pode-se citar diversos compostos presentes em extratos vegetais (RODRIGUES et al., 2007), extratos fúngicos (IURKIV, 2009; TOILLER et al., 2010), leveduras (STANGARLIN et al., 2010), rizobactérias promotoras de crescimento de plantas – RPCP (COMPANT et al., 2005), além de raças não virulentas do patógeno (MONOT et al., 2002), assim como o próprio patógeno inativado pelo calor (BACH et al., 2003).

O Agro-Mos[®], desenvolvido pela Improcrop do Brasil, é um mananoligossacarídeo fosforilado derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que tem demonstrado eficiência no controle de doenças em plantas (DANTAS et al., 2004). Camilo et al. (2010b) estudando a eficiência de diferentes indutores de resistência na incidência de vassoura-de-bruxa no cacaueiro, verificaram redução no número de ramos infectados pela aplicação de Agro-MOS[®]. De forma semelhante, Dantas et al. (2004) obtiveram resultados satisfatórios quanto a aplicação de Agro-MOS[®] na proteção de frutos de mamão contra antracnose, podridão de *Lasiodiplodia* e podridão-de-fusarium. A eficiência da aplicação deste derivado de *S. cerevisiae* parece estar associada a ativação de enzimas relacionadas à indução de resistência, de forma que alguns pesquisadores obtiveram correlação positiva quanto ao controle da doença e a atividade enzimática, como é o caso de Gouvea et al. (2009), os quais verificaram que a aplicação Agro-MOS[®] teve efeito contra mancha-de-dendrofoma em morangueiro, com aumento significativo na atividade de quitinases e glucanases. Camilo et al. (2010a) verificaram aumento na atividade das enzimas quitinases, β -1,3 glucanases, peroxidases e polifenoloxidasas pela aplicação de Agro-MOS[®] em plantas de cacaueiro infectadas com *Moniliophthora perniciosa*.

Bacillus cereus é uma bactéria habitante do solo e um patógeno humano oportunista (HELGASON et al., 2000), sendo considerada uma bactéria promotora de crescimento vegetal (BPCV) (NIU et al., 2011). Dentre os mecanismos de ação das rizobactérias no solo, a competição por nutrientes, antibiose, produção de enzimas extracelulares e indução de resistência, são os mais citados para explicar o controle de patógenos de solo, como também de doenças foliares (ENEBAK &

CAREY, 2000). O gênero *Bacillus* é caracterizado por espécies aeróbicas formadoras de endósporos, sendo que várias delas ocorrem em solos cultivados e contribuem direta ou indiretamente na produção agrícola (KUMAR et al., 2011). Resistência induzida por BPCV tem sido demonstrada contra fungos, bactérias e vírus em *Arabidopsis*, feijão, cravo, pepino, rabanete, fumo e tomate. Diferentes isolados diferem quanto a sua habilidade em induzir resistência em diferentes espécies de plantas, assim como as plantas apresentam variação em relação a expressão de resistência sob indução por isolados específicos (VAN LOON et al., 1998). Choudhary & Johri (2008) realizaram uma revisão quanto à indução de resistência por *Bacillus* spp. em plantas cultivadas, com ênfase nos mecanismos e possível aplicação da indução de resistência no biocontrole de patógenos. Vários isolados de *Bacillus cereus*, dentre outras espécies do mesmo gênero, são conhecidos como potenciais elicitores de ISR e exibem redução significativa na incidência ou severidade de diversas doenças em diferentes hospedeiros (CHOUDHARY & JOHI 2008; KLOEPPER et al. 2004). Niu et al. (2011), verificaram que *B. cereus* AR156 desencadeia ISR em *Arabidopsis thaliana*, ativando simultaneamente as vias de sinalização salicilato-dependente e jasmonato/etileno-dependente, conduzindo a um efeito aditivo sobre a nível de proteção induzida. Halfeld-Vieira et al. (2006), verificaram a capacidade de *B. cereus* em controlar diversas doenças no tomateiro, e atribuíram tal efeito à ISR, considerando a ausência do mecanismo de antibiose contra o patógeno, o aumento significativo dos níveis de peroxidases em plantas expostas ao tratamento e a sistemicidade da proteção.

2.2.1.2 Elicitores de Origem Abiótica

Diversos compostos de origem abiótica também são relacionados à respostas de indução de resistência em plantas, como é o caso do ácido salicílico (AS) (CHEN et al., 1993), fosfitos (RIBEIRO JUNIOR et al., 2006), acibenzolar-S-metil (OOSTENDORP et al., 2001), ácido D-Laminobutírico (BABA) (ZIMMERLI et al., 2000), medicamentos homeopáticos (TOLEDO, 2009), diferentes comprimentos de onda luminosos (KHANANM et al., 2005).

O ácido salicílico (AS) representa o primeiro composto derivado de plantas demonstrado como indutor de resistência sistêmica adquirida. Posteriormente, um

análogo do AS, o ácido 2,6 dicloroisonicotínico (INA), foi o primeiro composto sintético indutor de resistência. Entretanto, tanto o AS como o INA são fitotóxicos para a maioria das plantas cultivadas e, em consequência, não têm potencial para uso comercial como protetores (ARAÚJO et al., 2005). Mais recentemente, outro análogo do AS, o acibenzolar-S-metil (éster S-metil do ácido benzo-1,2,3-tiadiazole-7 carbotiólico), um composto do grupo benzotiadiazole, revelou-se um potente indutor de resistência, conferindo proteção em condições de campo contra um amplo espectro de patógenos e em diversas espécies de plantas cultivadas (GORLACH et al., 1996, KUNZ et al., 1997). O ASM não possui propriedades antimicrobianas, em vez disso, aumenta a resistência a doenças de culturas à campo através da ativação das vias de transdução de sinal SAR em várias espécies de plantas (THAKUR & SOHAL, 2013). Testes *in vitro* demonstraram que nem ASM nem seus metabólitos apresentaram atividade antimicrobiana (RYALS et al., 1996).

A efetividade de ASM no controle de doenças em plantas já foi demonstrada para doenças virais, como no caso de ToMV e TMV em tomate e fumo (MADHUSUDHAN et al., 2008), para doenças bacterianas, como no caso de cancro bacteriano em tomate (SOYLU et al., 2003), para doenças fúngicas, como no caso de murcha-de-Verticillium em cacauzeiro (CAVALCANTI & RESENDE, 2005), e para doenças causadas por nematóides, como no caso de *Meloidogine incognita* em tomate (SILVA et al., 2004).

2.2.2 Custos da Indução de Resistência

Considerando a natureza do fenômeno de indução de resistência, onde ocorre a defesa da planta contra o patógeno através da ativação de mecanismos de defesa latentes, é possível, após uma rápida reflexão, concluir quanto a existência de custos relacionados a esta ativação. Heil & Baldwin (2002) definiram que o custo da resistência induzida é todo efeito negativo sobre a adaptabilidade da planta que resulta da expressão de características de defesa. Os tipos de custos mais comumente discutidos e relatados são os custos de alocação ou adaptativos (KUHN & PASCHOLATTI, 2010), custos ecológicos e custos genéticos. O primeiro resulta da realocação de custos, por exemplo, alocação de recursos limitados para a defesa da planta, os quais então não poderão ser utilizados para o crescimento ou outros processos de desenvolvimento relevantes (HEIL, 2001). Custo ecológico, em

contraste, ocorre quando a expressão da defesa afeta negativamente as interações ecológicas da planta com seu ambiente. A expressão de resistência a microrganismos patogênicos pode, por exemplo, prejudicar as interações da planta com fungos micorrízicos ou rizóbios. Custo genético ou pleiotrópico, ocorre quando os genes de resistência – apesar de promover a defesa da planta – afetam negativamente processos relevantes do metabolismo (WALTERS & HEIL, 2007).

Custos adaptativos e genéticos, definidos como custos “internos”, dependem e afetam o ambiente de uma planta, interferindo diretamente nos custos ecológicos. Esta interação aponta para uma estreita relação entre eles, o que origina os custos da indução de resistência (HEIL, 2002). Os custos, “internos” e ecológico são evolutivamente relevantes, tendo em vista que todos afetam o processo de desenvolvimento e conseqüentemente o desempenho da planta em condições naturais. No entanto tem sido observado progresso rápido na detecção de custos genéticos e adaptativos (HEIL, 2002), enquanto os custos ecológicos têm recebido pouca atenção (WALTERS & HEIL, 2007).

2.2.2.1 Custos Adaptativos da Indução de Resistência

De acordo com Iriti & Faoro (2006), os custos adaptativos da resistência induzida tornam-se evidentes somente quando as defesas são induzidas sob condições em que processos envolvidos no crescimento da planta são forçados a competir com os exigidos pela SAR. Isso, porque a alocação de recursos internos das plantas para processos de crescimento (metabolismo primário) e compostos de defesa (metabolismo secundário) é determinada pela competição por substratos comuns e energia (GAYLER et al., 2004; HEIL et al., 2000).

Um modelo para demonstrar o balanço energético na planta foi proposto por Gayler et al. (2004), onde assimilados são disponibilizados através da fotossíntese, e utilizados para o crescimento produzindo biomassa estrutural. Parte dos assimilados é carregada para gerar defesas constitutivas e o excedente é conduzido para tecidos de reserva. Quando a planta necessitar, estes fotoassimilados são carregados para a defesa induzível e se a disponibilidade dos mesmos for baixa, pode ocorrer a inversão por parte das reservas, e estas, voltam a ser disponíveis (BARROS et al., 2010). Deve-se, contudo, considerar as condições do ambiente em que ocorre a indução e que conseqüentemente tem influencia decisiva sobre ela,

neste contexto Gayler et al. (2008) demonstraram que, em relação à alocação de recursos para formação de compostos secundários, diferentes respostas são obtidas dependendo do estágio fenológico da planta e adubação nitrogenada, revelando que as estratégias de defesa da planta podem mudar com o estágio de desenvolvimento da mesma. Walters et al. (2008) também verificaram efeito quanto a pressão de inóculo da doença, de acordo com os autores, efeitos sobre a taxa de crescimento da planta e produção de grãos são dependentes da pressão de inóculo, com aumentos significativos nestes parâmetros observados apenas em plantas sob pressão elevada da doença. Entretanto, na ausência de infecção por patógeno, não houve efeito significativo na taxa de crescimento da planta e produção de grãos, indicando o benefício do efeito *priming*. *Priming* é definido como processo envolvido na mobilização de respostas de defesa celular quando da tentativa de infecção pelo patógeno (CONRATH et al., 2002), ou seja, a mobilização ocorre na planta induzida apenas após o contato com o agente patogênico. Há, portanto, neste caso, uma restrição temporal quanto a expressão dos genes de defesa. Tal restrição pode ter influências importantes sobre a evolução de características de defesa das plantas, bem como sobre a exploração das defesas naturais na proteção das culturas agrícolas (HEIL, 2001).

Contudo, efeito negativo do processo de indução tem sido obtido por alguns autores. Heil et al. (2000), avaliando os custos adaptativos envolvidos na indução de resistência em trigo pela aplicação de BION, verificaram que plantas tratadas alcançaram menor biomassa em relação as plantas controle, desenvolvendo menos perfilhos e espigas e conseqüentemente produzindo menor número de sementes. Os autores interpretaram tais resultados como consequência da alocação dos custos. Tais custos poderiam resultar da competição metabólica entre processos envolvidos no crescimento da planta e na síntese de compostos relacionados à defesa.

2.2.2.2 Custos Ecológicos da Indução de Resistência

Walters & Heil (2007) consideram a ocorrência de um custo ecológico relacionado à indução de resistência, capaz de causar efeitos negativos quanto às interações mutualísticas entre plantas e outros organismos. Sendo que a resistência contra microrganismos possui um amplo espectro, a indução de resistência é

propensa a interagir nas relações entre planta e microrganismos. Desta forma, as respostas de defesa de plantas induzidas podem bloquear os efeitos benéficos de interações planta-microrganismos e resultar em efeitos negativos no crescimento da planta (LIAN et al., 2000).

Respostas negativas já foram relatadas quanto ao efeito de microrganismos simbiotes sobre a efetividade do tratamento indutor. Sonnemann et al. (2005) observaram efeito negativo da inoculação do fungo micorrízico *Glomus etunicatum* na efetividade de acibenzolar-S-metil no controle de míldio em cevada.

É possível também que a indução de resistência contra o patógeno possa produzir efeitos negativos sobre microrganismos benéficos (WALTER & HEIL, 2007), como foi demonstrado por Vierheilig et al. (1994), a colonização radicular de diferentes espécies pelo fungo micorrízico *Glomus mosseae* foi prejudicada pelo aumento na atividade enzimática de β -1,3-glucanase.

Em relação às Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal, alguns estudos divergem quanto à influência de tratamentos indutores sobre esses microrganismos. Lian et al. (2000) observaram redução no número e matéria seca de nódulos e crescimento de plantas de soja quando da aplicação exógena de Ácido Salicílico na concentração de 5mM. No entanto, Zanardo (2009) observou que o tratamento com *Saccharomyces cerevisiae*, Bion e Agro-Mos não afetou a nodulação de raízes por *Bradyrhizobium elkanii*, massa fresca e seca dos nódulos e parte aérea de plantas de soja.

2.3 BACTERIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL

Muitas das bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são rizobactérias, e são assim denominadas por colonizarem agressivamente o sistema radicular das plantas (MELO, 1998). Em virtude da sua capacidade de adaptação fisiológica e versatilidade metabólica, rizobactérias são agentes fundamentais de mudanças em agroecossistemas. As interações entre o sistema radicular e as rizobactérias tem um efeito profundo sobre a sanidade das culturas, rendimento e qualidade do solo. Através da liberação seletiva de exsudados, as plantas sustentam uma comunidade de bactérias específicas na região radicular. Por sua vez, as rizobactérias são capazes de gerar uma grande variedade de metabólitos

secundários que podem ter uma influência positiva sobre as plantas, facilitando o seu estabelecimento, crescimento e desenvolvimento (STURZ & CHRISTIE, 2003).

Cerca de 25% das bactérias na rizosfera possuem efeitos benéficos às plantas, melhorando o crescimento ou suprimindo doenças (Walters & Heil, 2007). Tais efeitos podem resultar do fornecimento direto de nutrientes ou hormônios para as raízes, ou através da supressão de microrganismos nocivos via competição ou secreção de compostos tóxicos (STURZ & CHRISTIE, 2003).

São variados os mecanismos de ação das BPCV e os efeitos sobre o desenvolvimento das plantas, dentre eles, destacam-se a antibiose, produção de sideróforos, produção de reguladores vegetais, solubilização de fosfatos, fixação biológica de nitrogênio e indução de resistência (MELO, 1998; BASHAN & DE BASHAN, 2005). A Figura 2.3. apresenta importantes mecanismos de promoção de crescimento atribuídos a BPCV (KUMAR et al., 2011)

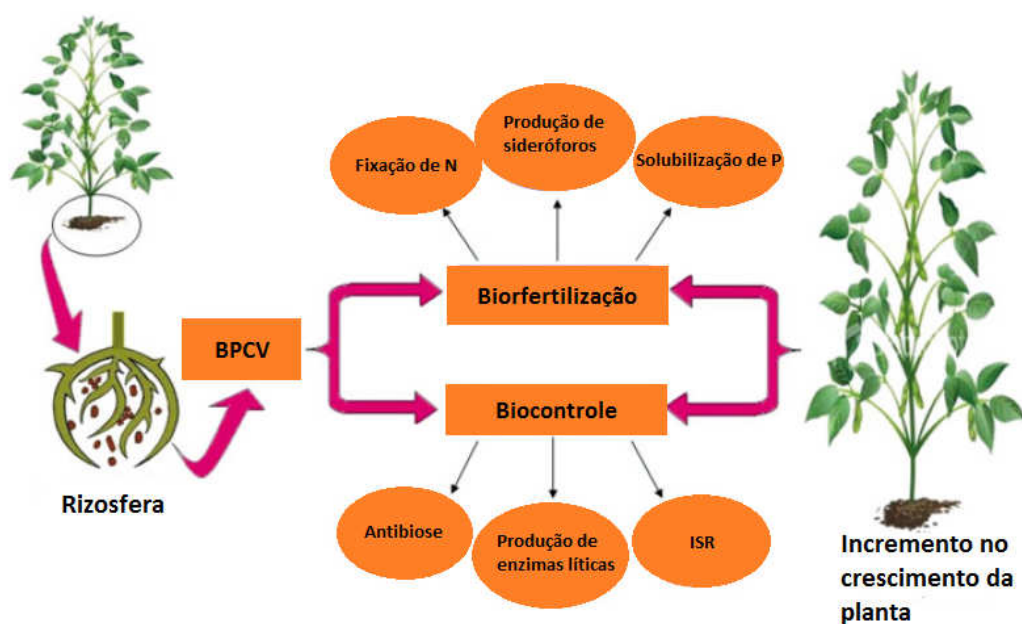


Figura 2.3 Ilustração esquemática de importantes mecanismos conhecidos para promover o crescimento da planta por BPCV. Diferentes mecanismos podem ser amplamente estudado sobre (1) Biofertilização, e (2) Biocontrole de agentes patogênicos. Biofertilização engloba: (a) fixação de N_2 , (b) produção sideróforos, (c) solubilização P inorgânico por rizobactérias. Biocontrole envolve: (a) antibiose, (b) secreção de enzimas líticas, e (c) Indução de Resistência Sistêmica (ISR) da planta hospedeira por BPCV.

Em 1991 a BPCV *Pseudomonas sp* foi reportada quanto a capacidade de induzir resistência sistêmica em plantas de cravo contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* através da síntese e acúmulo de fitoalexinas (VAN PEER et al., 1991). A indução de diferentes mecanismos de resistência vem sendo reportada em estudos

com BPCV, incluindo a indução de enzimas relacionadas à patogênese (PR-proteínas) e/ou regulando a atividade de enzimas situadas em pontos chaves do metabolismo secundário da planta (PASCHOLATI & LEITE, 1994), como foi observado por Govindappa et al. (2014), que observaram incremento na atividade das enzimas lipoxigenase, polifenilalanina amônia-liase, peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3 glucanase no tecido foliar de plantas de cártamo microbiolizadas com rizobactérias e inoculadas com *Cercospora carthami*.

2.3.1 *Azospirillum brasilense*

A denominação *Azospirillum brasilense* foi proposta por Tarrand et al. em 1978, após reclassificação da espécie *Spirillum lipoferum*, inicialmente descrita por Beijerinck em 1925 (citado por AHMED, 2010).

Azospirillum é um gênero de bactérias de vida livre, promotoras de crescimento em plantas, e tem sido constantemente isolada da rizosfera de diversas espécies gramíneas, cereais e outras culturas de diversas regiões do mundo, tanto de clima temperado ou tropical (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000). Bactérias do gênero *Azospirillum* são gram negativas e móveis, possuindo um único flagelo polar, quando cultivada em meio líquido ou, numerosos flagelos laterais, quando cultivada em meio sólido (HALL & KRIEG, 1984).

O gênero *Azospirillum* é caracterizado por espécies diazotróficas associativas, ou seja, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose (EVANS & BURRIS, 1992). Os microrganismos desse gênero colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes de várias gramíneas forrageiras e cereais (DOBEREINER & BALDANI, 1982), e por isso, denominados endófitos facultativos (BALDANI et al., 1997).

Muitos estudos têm demonstrado que o *Azospirillum* estimula o crescimento e a produtividade de várias espécies de plantas, sendo muitas delas com grande relevância agrônômica e ecológica (HUNGRIA, 2011). Em um levantamento de ensaios conduzidos por 20 anos, Okon & Labandera-Gonzales (1994) relataram que em 60% a 70% dos experimentos foram obtidos incrementos na produtividade devido à inoculação, com aumentos estatisticamente significativos na ordem de 5% a 30%.

Diversos mecanismos têm sido relacionados aos efeitos benéficos da associação de *A. brasilense* com diversas culturas. O incremento em área de superfície radicular, provocado pelo aumento significativo no comprimento dos pêlos radiculares em *Arabidopsis thaliana* foi demonstrado por Dubrovsky et al. (1994), sendo que os autores atribuíram a isso, o aumento na absorção de minerais e consequentemente o efeito BPCV de *Azospirillum brasilense*.

A fixação biológica de nitrogênio é outra característica do gênero *Azospirillum*. Cerca de 65% do N fixado anualmente no planeta se dá através da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). *A. brasilense* é uma espécie de bactéria capaz de converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em amônia, e por isso denominada diazotrófica (MARIN et al, 1999).

Além dos benefícios relacionados à FBN, é atribuído ao *Azospirillum* a produção de fitohormônios que estimulam o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas (HUNGRIA, 2011). Tien et al. (1979) verificaram que os componentes responsáveis pelo estímulo do crescimento de raízes liberados por *A. brasilense* eram ácido indol-acético (AIA), giberilinas e citocininas.

Outro efeito benéfico atribuído a *A. brasilense* é a capacidade de induzir resistência contra patógenos e insetos. Santos et al. (2014) observaram que a inoculação de *A. brasilense* em plantas de milho conferiu proteção contra o ataque de larvas de *Diabrotica speciosa*. Tortora et al. (2011), verificaram acúmulo de AS e indução de genes de defesa em plantas de morango inoculadas com *A. brasilense* REC3, tendo sido eficiente na indução de resistência contra antracnose causada por *Colletotrichum acutatum* M11. O acúmulo de AS e consequente indução de resistência também foi observado por Alen'kina et al. (2012) em raízes de plântulas de trigo.

2.4 TRIGO

Devido ao seu alto valor nutritivo, o trigo é consumido nas mais diversas regiões do mundo (ACHARYA et al., 2011).

A produção mundial de trigo para o ano/safra 2012/2013 foi de 658,7 milhões de toneladas, sendo os principais produtores: União Europeia (133,9 mi ton), China (121 mi ton) e Índia (94,8 mi ton). Quanto à exportação, destacam-se Estados

Unidos, Austrália e Canadá. E em relação à importação destaca-se a região norte da África, especialmente Egito (USDA, 2015).

A produção nacional de trigo para o ano de 2011 foi de 5,6 milhões de toneladas, com rendimento médio de 2,7 mil kg/ha. A região sul é responsável por aproximadamente 95% da produção nacional, com destaque para os estados do Paraná (48%) e Rio Grande do Sul (43,5%) (IBGE, 2012). Considerando que as condições climáticas são desfavoráveis ao cultivo do cereal no Brasil, boa parte do trigo consumido no país é importado. Para o ano de 2012/2013, o Brasil importou aproximadamente 7,4 mi ton de trigo (USDA, 2015).

Estimativas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento prevêem uma taxa de aumento de consumo do trigo de 1,31% ao ano. Ainda assim, acredita-se na possibilidade de redução das importações, uma vez que o Brasil vem investindo na autossuficiência da produção interna do cereal. Em 2009, a política de incentivos lançada pelo ministério propiciou aumento de 50% em relação à safra do ano anterior (MAPA, 2015). Conforme dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento a produção interna de trigo projetada para 2018/2019 é de 7,89 milhões de toneladas, enquanto o consumo é estimado em 12,25 milhões de toneladas (MAPA, 2015).

2.4.1 Mancha Marrom ou Helmintosporiose em Trigo

Dentre as principais doenças fúngicas da cultura do trigo destaca-se a helmintosporiose, causada pelo fungo *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.), Drechs. ex. Dastur, anamorfo: *Bipolaris sorokiniana* (Sacc in. Sorok) Shoem (REIS et al., 2005). O fungo *C. sativus* é o telemorfo (fase sexual) de *B. sorokiniana* (anamorfo), que é o agente causal da ampla variedade de doenças. *B. sorokiniana* pertence à divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Hyphomycetes, subclasse Sporomycetidae, Ordem Moniliales e família Dematiaceae. Após a descoberta do estágio perfeito, *C. sativus*, o fungo foi transferido para a subdivisão Ascomycotina, Classe Loculoascomycetes, Ordem Pleosporales e família Pleosporaceae (ACHARYA et al., 2011).

A helmintosporiose pode ocorrer em qualquer parte ou estágio de desenvolvimento da planta de trigo. Quando ataca as raízes de trigo, recebe o nome de podridão comum das raízes, nas folhas é comumente denominada mancha

marrom, nos grãos causa a “ponta-preta”, o patógeno causa também morte de plântulas (FERNANDES et al., 1999; ACHARYA et al., 2011; KUMAR et al., 2002). Os sintomas da mancha marrom iniciam com pequenas manchas ovais (3-4 mm), de coloração marrom-escuro a negra, em folhas, bainhas e colmos. Essas manchas aumentam de tamanho e tornam-se tipicamente elípticas com abundante esporulação. Devido à formação de numerosos conídios castanho-escuros, as lesões aparecem quase negras. Quando as lesões coalescem, a folha toda fica crestada e seca prematuramente (MEHTA, 1978; DUVEILLER & DUBIN, 2002).

Bipolaris sorokiniana é um fungo saprófita e sobrevive principalmente como conídios de paredes espessas. Nas sementes, o patógeno sobrevive tanto externamente, como conídios, quanto internamente na forma de micélio, bem como em resíduos de culturas infectadas, plantas voluntárias, hospedeiros secundários e conídios dormentes livres no solo (REIS, 1991). A fase sexual do fungo não é importante para o ciclo da doença (ACHARYA et al., 2011), sendo que na natureza, a ocorrência do teleomorfo foi relatado apenas na Zambia (DUVEILLER & DUBIN, 2002).

De acordo com Acharya et al. (2011), o desenvolvimento e severidade da doença estão diretamente relacionados à densidade de semeadura, irrigação, baixa fertilidade do solo, semeadura superficial, fase de crescimento da cultura, chuva ao final do ciclo da cultura, estresse térmico durante a fase de enchimento de grãos, alta temperatura e umidade relativa. As perdas causadas por esta doença podem chegar a até 80% (REIS et al., 2005).

A mancha marrom é provavelmente a mais importante doença foliar de trigo nas regiões de alta temperatura e alta umidade relativa onde o cereal é cultivado (DUVEILLER & DUBIN, 2002; REIS et al., 2005). Tais regiões são classificadas como ME5B de acordo com o Plano Estratégico do Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), que adotou a classificação das regiões de cultivo do cereal conforme suas características próprias e estabelecendo 12 Mega Ambientes (ME) (RAJARAM et al., 2002). Kumar et al. (2002) citam dois fenômenos que devem ser considerados em relação a ocorrência e distribuição da doença, um deles relacionado a demanda crescente de alimento, o que fez com que trigo se estendesse para áreas não tradicionais de produção, outro refere-se à capacidade de aclimação do patógeno à ambientes frios. Na Figura 2.4 observa-se a distribuição da doença pelos diferentes continentes.



Figura 2.4. Mapa de distribuição de *Bipolaris sorokiniana* no mundo (adaptado de KUMAR et al., 2002).

O controle integrado da doença é o melhor método de controle da mancha-marrom, integrando o uso de: práticas culturais, rotação de culturas, tratamento de sementes, controle biológico, fungicidas e variedades resistentes (ACHARYA et al., 2011). De acordo com Kumar et al. (2002), considerando-se a distribuição do cultivo de trigo para áreas não tradicionais de produção, faz-se necessário lançar mão de estratégias de controle para evitar as perdas causadas pelas doenças. Os autores citam, como alternativas promissoras, a utilização da indução de resistência e a utilização de microrganismos promotores de crescimento em plantas. AMINUZZAMAN & HOSSAIN (2007) observaram redução da severidade de mancha marrom e aumento no rendimento de grãos de trigo, quando tratado com acibenzolar-S-metil e em combinação deste com Propiconazole ou Azoxystrobin.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ENSAIO *IN VITRO*

3.1.1 Inibição do Crescimento Micelial e da Esporulação de *B. sorokiniana*

Os tratamentos ASM (200 mg produto comercial Bion® L⁻¹), MOS (5 mL produto comercial AgroMos® L⁻¹), *B. cereus* (10⁸ ufc mL⁻¹) e água, foram incorporados em meio de cultivo BDA (batata dextrose ágar) autoclavado a 120°C e 1 atm por 20 min. Uma hora após o meio ter sido vertido em placas de Petri, um disco de 7 mm de diâmetro contendo micélio de *B. sorokiniana*, com 7 dias de idade em BDA, foi transferido para o centro de cada placa, as quais foram vedadas com filme plástico e mantidas no escuro a 25°C. As avaliações foram realizadas através de medições diárias do diâmetro das colônias (média de duas medidas diametralmente opostas), 24h após a instalação do experimento e perduraram até o momento em que as colônias atingiram 3/4 da superfície do meio de cultura (STANGARLIN et al., 1999). Ao término do bioensaio foi avaliada a esporulação de cada uma destas colônias. Para isto, foi preparada uma suspensão de esporos, obtida através da adição de 10 mL de água em cada placa, seguida de raspagem da colônia e filtragem em gaze, sendo determinado o número de conídios com auxílio de uma câmara de Neubauer ao microscópio ótico. Os resultados são expressos em número de esporos cm² de colônia (FRANZENER et al., 2003).

3.2 ENSAIO *IN VIVO*

3.2.1 Localização do Experimento

O experimento foi conduzido sob cultivo protegido, na Estação de Horticultura e Cultivo Protegido "Prof. Dr. Mário César Lopes", a qual pertence ao Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus de Marechal Cândido Rondon – PR. A estação está localizada nas coordenadas 54° 22' W longitude, latitude 24° 46'S e altitude de 420 m.

3.2.2 Delineamento Experimental

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema fatorial 4 x 2 x 2, com quatro repetições. O primeiro fator “Indutores de Resistência” foi constituído pelos indutores acibenzolar-S-metil (ASM) (200 mg L⁻¹ do produto comercial Bion[®]), mananoligossacarídeo fosforilado (5 ml L⁻¹ do produto comercial Agro-Mos[®]), *B. cereus* (10⁸ ufc mL⁻¹) e a testemunha água. O segundo fator “Patógeno” foi constituído pela presença ou ausência do patógeno *B. sorokiniana* (10⁴ conídios mL⁻¹) (TRILLER & MEHTA, 1997). O terceiro fator “BPCV” constituiu-se pela presença ou ausência da bactéria promotora de crescimento vegetal *A. brasilense* AbV5+AbV6 (4 mL por 1.000 sementes do produto comercial Nitro1000 Gramíneas).

A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo 5 plantas, totalizando 64 vasos.

Foram realizados três ensaios, dois deles no período de 20 de março a 20 de julho de 2014, tendo sido realizadas as coletas para análises bioquímicas, avaliação dos parâmetros biométricos, componentes de produção, trocas gasosas e quantificação de *A. brasilensis*; e um deles no período de 20 de março a 20 de maio de 2015, para avaliação da severidade da doença.

3.2.3 Ambiente Experimental

Os ensaios foram conduzidos em casa de vegetação sob ambiente semi controlado através de sistema automatizado, mantendo-se a temperatura máxima em torno de 21°C. As irrigações foram realizadas manualmente sempre que necessário, mantendo o solo próximo à capacidade de campo (BONFIM-SILVA et al., 2011).

Foram utilizados vasos de polietileno, cilíndricos, com capacidade para 8 dm³ de substrato. O substrato utilizado foi composto de uma mistura de solo e areia na proporção de 2:1. O solo utilizado nos ensaios foi coletado no horizonte A de um LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico (SANTOS et al., 2013) com textura argilosa (578,0 g kg⁻¹ de argila). A adubação foi realizada conforme recomendação de Waugh & Fitts (1966), sendo adicionados 687 mg dm⁻³ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples, 180 mg dm⁻³ de K₂O na forma de cloreto de potássio e 97 mg dm⁻³ de N na forma de ureia.

3.2.4 Inoculação com *A. brasilense* e Semeadura

A inoculação das sementes com *A. brasilense* foi realizada através da aplicação de 4 mL do produto comercial Nitro1000 Gramíneas (*A. brasilense* estirpes AbV5 + AbV6) para cada 1.000 sementes. A inoculação foi realizada pela adição direta do produto sobre as sementes, seguida de agitação constante dentro de sacos plásticos para distribuição homogênea do inoculante (LEMOS, 2011). As sementes inoculadas foram semeadas 24 h após a inoculação.

Foram semeadas 12 sementes de trigo da variedade CD 150 por vaso e 10 dias após a emergência (DAE) foi realizado desbaste, mantendo cinco plantas por vaso.

3.2.5 Aplicação dos Indutores de Resistência e Inoculação com *B. sorokiniana*

Aos 25 DAE as plantas receberam os tratamentos indutores, sendo acibenzolar-S-metil (ASM) (200 mg L⁻¹ do produto comercial Bion®), mananoligossacarídeo fosforilado (5 ml L⁻¹ do produto comercial Agro-Mos®), *B. cereus* (10⁸ ufc mL⁻¹) e a testemunha água.

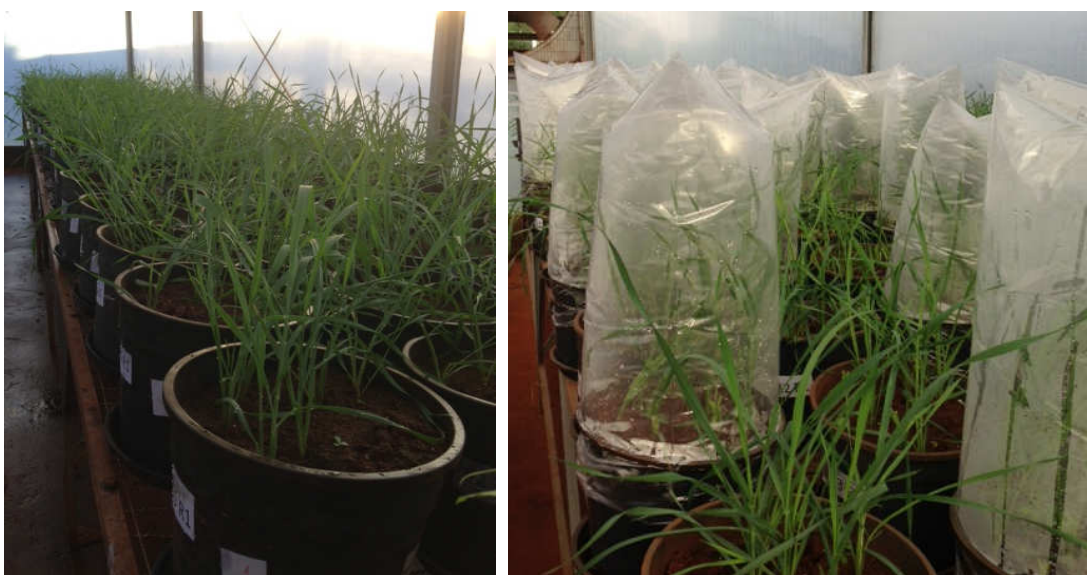


Figura 3.1 Ambiente de cultivo e inoculação de *B. sorokiniana*.

Vinte e quatro horas após o tratamento, as plantas foram inoculadas com o patógeno *B. sorokiniana* (FRANZENER et al., 2003), o isolado utilizado foi fornecido pela Embrapa Trigo. A inoculação foi realizada utilizando-se um atomizador contendo uma suspensão de esporos de *B. sorokiniana*, obtidos de colônias com idade de 10

dias, na concentração de 10^4 conídios mL^{-1} (TRILLER & MEHTA, 1997). À suspensão de esporos foi adicionado espalhante Tween-20 na proporção de 1 gota para 200 mL de suspensão (METHA et al., 1996). Após a inoculação, as plantas de trigo foram mantidas em câmara úmida por 15 horas (FRANZENER et al., 2003) e após esse período permaneceram em casa de vegetação.

3.2.6 Avaliações

3.2.6.1 Análises Bioquímicas

Para as análises bioquímicas foram coletadas amostras de aproximadamente 0,5 g de tecido foliar, cada uma proveniente de uma planta, para cada tempo de coleta (0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h após o tratamento). As amostras foram pesadas e congeladas para posterior análise.

3.2.6.1.1 Determinação de enzimas relacionadas à defesa

Obtenção da preparação enzimática

Amostras com peso de aproximadamente 0,5 g foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) em almofariz de porcelana previamente resfriado e acrescentado 0,04 g de polivinil pirrolidona durante a maceração mecânica. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g, a 4°C, durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a -18 °C para posteriores análises bioquímicas.

Atividade de peroxidases

A atividade de peroxidases foi determinada a 30°C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução consistiu de 2,95 mL do substrato para enzima (306 µL de peróxido de hidrogênio p.a., 12,5 mL de guaiacol 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0)) e 0,05 mL de preparação enzimática. A cubeta de referência continha 3 mL do substrato para enzima. A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm, pelo período de 2 min.

A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de abs. $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Umesha (2006), na qual 100 μL da preparação enzimática foi acrescida de 400 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de uma solução de L-fenilalanina 0,05 M (825,9 mg diluído em 100 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8)). Essa mistura foi incubada a 40°C durante 2 h. Ao final desse período adicionou-se 60 μL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se de leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de fenilalanina amônia-liase consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100 μL de extrato protéico e 900 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido trans-cinâmico ($y = 0,0095x + 0,0255$, onde y é a absorbância a 290 nm e x a concentração de ác. trans-cinâmico (μg)) e expressa em mg de ácido trans-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

Atividade de β -1,3-glucanase

A atividade de β -1,3-glucanases foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina (VOGELSANG & BARZ, 1993). A reação envolveu 100 μL da preparação enzimática, 50 μL de tampão fosfato de sódio 0,01M (pH 6,0) e 150 μL de laminarina (2 mg mL^{-1}), a qual ocorreu a 40°C durante 1 h. O controle passou pelo mesmo processo, porém a adição de laminarina foi feita somente após a incubação. Os açúcares formados foram quantificados pelo método de Lever (1972), que consiste em extrair uma alíquota de 30 μL da solução anterior e acrescentar a esta 1,5 mL da solução de hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico 0,5% (HAPH) (0,5 g de hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico diluída em 20 mL de HCl 0,5 M e acrescida de 80 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi mantida a 100°C durante 10 min, resfriada, e determinada a absorbância a 410 nm. A atividade de β -1,3-glucanases consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle, a qual foi plotada em curva padrão para glicose ($y =$

$0,002x + 0,0046$, onde y é a absorbância a 410 nm e x a concentração de açúcares redutores (μg) e expressa em equivalente mg de glicose $\text{h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$.

Determinação de proteínas totais

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), consistindo de 600 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200 μL de preparação enzimática e 200 μL de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue G-250, 125 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 125 mL de água destilada). Após adicionar o reagente sob agitação e incubar as amostras por 5 min, foi efetuada leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Cada amostra foi formada por três réplicas. A cubeta de referência consistiu de 800 μL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 μL de reagente. A concentração de proteína foi determinada pelo emprego de curva padrão ($y = 0,0483x + 0,0275$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína (μg)). As atividades enzimáticas foram relacionadas aos teores de proteínas totais.

3.2.6.2 Trocas Gasosas

As avaliações de taxa de assimilação líquida de CO_2 (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração foliar (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração interna de CO_2 (C_i) ($\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foram realizadas utilizando-se um analisador portátil de fotossíntese por radiação infravermelha (Infra Red Gas Analyser – IRGA, modelo Li-6400XT, LiCor).

As avaliações iniciaram-se no dia do tratamento com os indutores de resistência e perduraram por sete dias, sendo realizadas em folhas totalmente expandidas e expostas à luz solar direta, sempre entre o período das 9 e 11 h.

A densidade de fótons do meio externo apresentou as seguintes médias do primeiro ao sétimo dia de avaliação, respectivamente: $183,95 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $167,59 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $106,22 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $203,18 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $125,25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $160,86 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e $158,65 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. A temperatura média entre o primeiro e sétimo dias de amostragem foram, respectivamente: 24°C , 27°C , $23,5^\circ\text{C}$, 28°C , 24°C , 29°C e $27,5^\circ\text{C}$. O fluxo de fótons (PPFD) mantido na câmara do IRGA foi de $1.200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas duas avaliações.

3.2.6.3 Severidade da Doença

A severidade da doença foi determinada através da adaptação da escala diagramática proposta por Lenz et al. (2010), sendo atribuídos valores percentuais pelo avaliador de acordo com a área foliar comprometida pela doença. As avaliações foram realizadas quando do surgimento dos primeiros sintomas e perduraram durante 15 dias. O resultado de cada avaliação consistiu da média das avaliações realizadas em três folhas distintas previamente selecionadas de cada parcela.

A partir dos dados de severidade da doença foram determinadas as curvas de progresso da doença e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), conforme equação proposta por Campbell & Madden (1990) apud Marques et al. (2011):

$$AACPD = \sum_i^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) * 0,5][t_{i+1} - t_i]$$

Onde: n = número de avaliações; y = severidade da doença mancha marrom (%); t = tempo (dias).

3.2.6.4 Análises Biométricas e Produção

Quando as plantas atingiram a fase de florescimento, foram coletadas três plantas por parcela para realização de análises biométricas, as quais consistiram de: avaliação de altura de planta, onde tomou-se por base a distância da superfície do solo até a inserção da folha bandeira; número de perfilhos e número de perfilhos viáveis; diâmetro do colmo, medido a 3 cm do solo com o auxílio de paquímetro digital; comprimento da espiga e comprimento da folha bandeira, ambos com o auxílio de régua graduada; e área foliar, através da medição direta pelo medidor de área foliar LiCor LI 3100.

As plantas foram seccionadas em colmo + bainha, folhas e espigas; em seguida, as diferentes partes da planta foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C até atingirem massa constante, após o que foi determinada a massa utilizando-se uma balança de precisão e obtendo-

se, assim: fitomassa de folhas; fitomassa de bainha mais colmo e fitomassa de espigas.

Aos 120 DAS foram coletadas as três plantas de cada parcela, para determinação dos seguintes componentes de produção: número de espigas por planta; massa de 100 grãos e massa de grãos por planta.

3.2.6.5 Isolamento e Quantificação de Microrganismos Diazotróficos

Foram realizados isolamento e quantificação de microrganismos diazotróficos a partir do produto comercial Nitro1000 Gramíneas utilizado na inoculação das sementes de trigo e a partir do solo e raízes em três diferentes momentos: previamente a montagem do experimento, no momento da inoculação dos indutores de resistência e no florescimento da cultura.

Para tanto uma amostra de um grama de solo ou raízes, ou um mL de inoculante foi homogeneizada em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85 NaCl), obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir desta efetuou-se diluições sucessivas, tomando-se 100 μL da diluição anterior e adicionando-se 900 μL de solução salina. As diluições obtidas contemplaram 10^{-1} até 10^{-8} . Através da técnica de micro gota (10 μL por gota), distribuiu-se as diluições sobre meio de cultura NFb (DOBEREINER et al., 1976), com três repetições por diluição. As placas foram incubadas a 30 °C durante 120 horas, quando realizou-se a contagem de colônias desenvolvidas, expresso em unidades formadoras de colônia (UFC) g^{-1} solo ou g^{-1} raízes, ou unidades formadoras de colônia (UFC) mL^{-1} de inoculante.

3.3 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SISVAR Versão 5.3 (FERREIRA, 2014). Foi empregado teste de Tukey, para comparação entre os tratamentos, quando o valor de F foi significativo. Para representação dos gráficos foi utilizado o programa computacional SigmaPlot Versão 12.0 (SYSTAT SOFTWARE, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO *IN VITRO*

4.1.1 Inibição do Crescimento Micelial e da Esporulação de *B. sorokiniana*

Os produtos testados exerceram efeito diferenciado sobre o índice de crescimento micelial (ICM) de *B. sorokiniana* (Tabela 4.1). O produto MOS inibiu totalmente o crescimento micelial na dose testada (5 mL L⁻¹ de produto comercial AgroMos®), e consequentemente a esporulação do fungo. Tal resultado se deve, provavelmente, ao efeito tóxico do produto sobre *B. sorokiniana*, devido à presença de Cu em sua formulação. Resultado semelhante foi obtido por Costa et al. (2010), os quais obtiveram inibição total do crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* em doses superiores a 3,6 mL L⁻¹. MOS também mostrou-se eficiente na inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* em doses superiores a 0,250 mg mL⁻¹ (DINIZ et al., 2012). Campos Neto (2013) verificou redução na esporulação de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* quando da utilização de concentrações acima de 0,5 mL L⁻¹ de MOS.

Tabela 4.1 Índice de Crescimento Micelial (ICM) e Esporulação de *Bipolaris sorokiniana* em meio BDA acrescido dos indutores de resistência.

	ICM ¹	Esporulação ^{1,2} (esporos cm ⁻²)
ASM	2,90 c	2,98 b
MOS	0,00 d	0,00 c
<i>B. cereus</i>	5,05 b	5,75 b
Água	7,98 a	10,58 a
CV%	11,65	26,81

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

² Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$, onde x é a esporulação de *B. sorokiniana* ($\times 10^3$).

ASM (200 mg L⁻¹ de produto comercial Bion®) apresentou uma redução de 64% no ICM e 72% na esporulação do fungo em relação à testemunha Água. De forma semelhante, Costa et al. (2010) obtiveram 33,3% de inibição no crescimento micelial de *Moniliophthora perniciosa* com uma dose de 0,1 g L⁻¹ de ASM. Campos Neto (2013) observou redução na esporulação de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* quando utilizadas concentrações acima de 0,01 mg L⁻¹ de ASM. Entretanto, Cruz et al. (2011) não

obtiveram interferência no crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersii* pela aplicação de 5 mg i.a. L⁻¹ de ASM.

B. cereus apresentou redução de 37% no crescimento micelial e 46% na esporulação de *B. sorokiniana* em relação à testemunha Água. *B. cereus* tem sido descrita por diversos autores como biocontroladora de fitopatógenos, um exemplo é a redução na severidade da mancha foliar causada por *Bipolaris* sp em *Basella alba* (SAHA et al, 2013). O gênero *Bacillus* é reconhecido como importante grupo entre as BPCV, assim como seu potencial como antagonista e agente de biocontrole. Os mecanismos envolvidos no controle são os mais diversos, entre eles a produção de sideróforos (BENEDUZI et al., 2012) e compostos antibióticos (LIMA, 2012), síntese de enzimas hidrolíticas (HUANG et al., 2005), competição por nutrientes e/ou nichos de colonização, regulação hormonal e indução de resistência (BENEDUZI et al., 2012; KLOEPPER et al., 2004). Huang et al.(2005), identificaram pelo menos duas quitinases produzidas por *B. cereus* e efetivas no controle de *Botrytis elliptica*, agente causal da mancha foliar em lírio. Silva et al. (2008) objetivando verificar o mecanismo de controle de diferentes isolados de microrganismos biocontroladores de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, observaram a eficiência da inibição do crescimento de sete isolados do patógeno através de antibiose por *B. cereus* DFs769.

4.2 ENSAIOS *IN VIVO*

4.2.1 Severidade da Doença

As avaliações de severidade foram realizadas nos tratamentos onde foi inoculado o patógeno *B. sorokiniana*, considerando que os tratamentos com ausência do patógeno não apresentaram sintomas da doença mancha marrom.

Houve interação significativa tanto para o fator “Indutores de Resistência” como para o fator “BPCV” (Tabela 4.2).

Quando da presença de *A. brasiliense*, os tratamentos que se apresentaram efetivos no controle da mancha marrom foram ASM e MOS. E quando da ausência de inoculação com a BPCV, os tratamentos MOS e *B. cereus* se mostraram superiores no controle da doença. A capacidade de reduzir a doença através da ativação de mecanismos de resistência pela aplicação dos indutores ASM, MOS e *B. cereus* é amplamente conhecida (GORLACH et al., 1996; SOYLU et al., 2003; HALFELD-

VIEIRA et al., 2006; KUHN & PASCHOLATI, 2010; COSTA et al, 2010; MONTEIRO & PEREIRA, 2010; NIU et al., 2011), sendo efetiva contra uma infinidade de patógenos e nos mais diversos patossistemas. Santos et al. (2011) obtiveram redução na severidade das manchas foliares (*Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera tritici-repentis*), ferrugem das folhas (*Puccinia triticina*) e oídio (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) em trigo pelo tratamento com ASM. MOS mostrou-se efetivo na proteção de mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa*, ativando enzimas relacionadas à respostas de defesa da planta (COSTA et al., 2010). *B. cereus* mostrou-se eficiente na proteção de milho contra *Bipolaris maydis* (HUANG et al., 2010).

Tabela 4.2 Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) em função do tratamento com indutores de resistência, na presença ou ausência da BPCV *A. brasilense*.

AACPD					
	(+) <i>A. brasilense</i>		(-) <i>A. brasilense</i>		Média
ASM	61,78	b B	133,78	ab A	97,78
MOS	64,88	b A	32,10	c A	48,49
<i>B. cereus</i>	201,10	a A	76,62	bc B	138,86
Água	178,10	a A	151,78	a A	164,94
Média	126,46		98,57		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (+): presença; (-): ausência. CV (%) = 32,07.

Observa-se (Tabela 4.2) que para o tratamento com ASM há uma menor severidade da doença na presença de *A. brasilense*, ao contrário do que ocorre com o tratamento *B. cereus*, o qual apresenta maior severidade da doença quando da inoculação com *A. brasilense*.

Tem sido reconhecida a eficiência do gênero *Azospirillum* na indução de resistência em plantas (YASUDA et al., 2009), sendo que especificamente a espécie *A. brasilense* tem demonstrado resultados positivos, tanto na indução de resistência à insetos praga (ALBUQUERQUE et al., 2015) quanto à fitopatógenos (TORTORA et al., 2011; ALLEN'KINA et al., 2012). Entretanto, são escassos os trabalhos que investigam as interações entre BPCV e indutores de resistência, principalmente quanto a interferência de BPCV sobre a ação de indutores de resistência na planta e na efetividade do controle da doença.

Assim como no presente trabalho, onde a combinação ASM – BPCV *A. brasilense* reduziu a severidade da doença, Myresiotis et al. (2012) investigando a

eficiência do controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* em tomate pela aplicação de BPCV do gênero *Bacillus*, isoladamente ou em combinação com ASM, verificaram que para todos os isolados de BPCV testados (*B. amyloliquefaciens* IN937a, *B. pumilus* SE34, *B. subtilis* FZB24 e *B. subtilis* GB03), houve maior redução na severidade da doença quando os mesmos foram combinados com ASM. Da mesma forma, ASM apresentou maior eficiência no controle da doença quando combinado aos isolados de BPCV em relação à sua aplicação isolada.

Myresiotis et al. (2014), estudando a persistência no solo, absorção e translocação do indutor de resistência ASM em plantas de tomate, verificaram aumento na eficiência de absorção e translocação de ASM na presença das BPCV *B. subtilis* GB03 e *B. pumilus* SE34, o que explica em partes, o resultado obtido por Myresiotis et al. (2012).

No entanto, respostas negativas também já foram relatadas quanto ao efeito de microrganismos simbiotes sobre a efetividade do tratamento indutor. Sonnemann et al. (2005) visando o controle de míldio em cevada, observaram efeito negativo da inoculação do fungo micorrízico *Glomus etunicatum* na efetividade de acibenzolar-S-metil. Da mesma forma, no presente trabalho, a inoculação da BPCV *A. brasilense* não apresentou efeito no controle de mancha marrom por *B. cereus*.

4.2.2 Isolamento e Quantificação de Diazotróficos

O solo utilizado nos ensaios apresentava $1,1 \times 10^7$ ufc g⁻¹ solo de microrganismos diazotróficos e o inoculante apresentou $1,33 \times 10^8$ ufc mL⁻¹ produto de *A. brasilense*.

Aos 25 dias após a emergência (DAE), no momento do tratamento indutor, foi realizada a primeira quantificação de microrganismos diazotróficos nas raízes (Tabela 4.3). Houve interação tripla entre os fatores “Indutores de Resistência”, “Patógeno” e “BPCV”. Observa-se maior quantidade de bactérias para a testemunha Água em relação ao tratamento com *B. cereus* quando as plantas não foram inoculadas com *A. brasilense* e na ausência do patógeno *B. sorokiniana*. Assim como, superioridade da testemunha Água quando não inoculada com *A. brasilense* e na ausência do patógeno em relação ao tratamento com a presença do patógeno. Tal fato pode estar relacionado a uma possível relação antagônica entre *B. cereus*, assim como o patógeno *B. sorokiniana*, e os microrganismos diazotróficos. Porém, não observou-se

interferência entre os tratamentos indutores e *A. brasilense* especificamente, considerando-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos inoculados com a BPCV

Tabela 4.3 Quantificação de microrganismos diazotróficos (ufc g⁻¹ raízes) no momento do tratamento das plantas com os indutores de resistência (primeira avaliação nas raízes) e no momento do florescimento (segunda avaliação nas raízes).

	Primeira avaliação (ufc g ⁻¹ raízes) ³				Segunda avaliação (ufc g ⁻¹ raízes) ³	
	(+)A.b. ¹		(-)A.b.		(+)B.s.	(-)B.s
	(+)B.s.	(-)B.s	(+)B.s.	(-)B.s		
ASM	7,1 ² aA	1,8 aA	12,0 aA	16,6 abA	3,4 aB	8,1 aA
MOS	3,2 aA	0,6 aA	3,0 aA	29,1 abA	2,0 aA	2,7 aA
<i>B. cereus</i>	9,1 aA	4,6 aA	0,5 aA	2,8 b A	2,6 aA	2,7 aA
Água	11,8 aA	6,8 aA	6,3 aB	48,8 a A	3,0 aA	4,5 aA

¹(+)A.b.= Plantas inoculadas com *A. brasilense*; (-)A.b.= Plantas não inoculadas com *A. brasilense*; (+)B.s.= Plantas inoculadas com *B. sorokiniana*; (-)B.s.= Plantas não inoculadas com *B. sorokiniana*.

²Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

³Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$, onde x é a quantidade (ufc) de diazotróficos ($\times 10^7$).

Bacillus cereus é uma bactéria habitante do solo (HELGASON et al., 2000), sendo também considerada uma bactéria promotora de crescimento vegetal (BPCV) (NIU et al., 2011). Dentre os mecanismos de ação que podem estar envolvidos na redução de diazotróficos observada, estão a competição por nutrientes, antibiose, produção de enzimas extracelulares e indução de resistência (ENEBAK & CAREY, 2000; BENEDUZI et al., 2012). Porém, são raros os trabalhos que investigam a ação de fitopatógenos sobre o desempenho de BPCV. Souza et al. (2011), estudando o efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção de cana-de-açúcar infectadas pelo raquitismo das soqueiras, observaram que, ao contrario do esperado, a inoculação com *A. brasilense* estirpe AbV5 + *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* apresentou resultado negativo. Esperava-se que *A. brasilense* colonizasse os vasos do xilema durante o ciclo da cultura e tivesse um efeito na redução da colonização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, porém, seus níveis populacionais foram muito baixos e não detectados para a maioria dos tratamentos.

Observa-se que a testemunha absoluta apresentou a maior média na segunda avaliação ($4,88 \times 10^7$ ufc g⁻¹ solo), e juntamente com ASM ($1,66 \times 10^7$ ufc g⁻¹ solo) e

MOS ($2,91 \times 10^7$ ufc g⁻¹ solo), ambos não inoculados com *A. brasilense* e *B. sorokiniana*, foram os únicos tratamentos que tiveram incremento na quantidade de diazotróficos em relação a primeira avaliação ($1,1 \times 10^7$ ufc g⁻¹ solo). Corsini et al. (2013), obtiveram resultado semelhante na cultura do arroz quando da inoculação de *A. brasilense*. Os autores observaram incremento na quantidade de diazotróficos para os tratamentos onde não houve inoculação de *A. brasilense*. Tal fato pode estar relacionado à presença de plantas de trigo (hospedeiro) que favoreceu o aumento na concentração de bactérias nativas.

Na fase de florescimento foi realizada a segunda e última quantificação de diazotróficos na raízes (Tabela 4.3). Houve interação dupla entre “Indutores de Resistência” e “Patógeno”, de forma que o tratamento com o indutor ASM na ausência do patógeno apresentou maior média em relação ao mesmo tratamento na presença do patógeno. Isso remete novamente a uma possível interação negativa entre o patógeno e a BPCV, indicando também que o indutor ASM não afetou negativamente a colonização por diazotróficos.

4.2.3 Enzimas Relacionadas à Defesa

4.2.3.1 Atividade de Peroxidasases

A atividade de peroxidase apresentou interação tripla e MOS teve incremento significativo no primeiro dia após o tratamento (DAT) com os indutores de resistência, exceto quando da ausência de inoculação com *A. brasilense* e *B. sorokiniana*. Essa tendência se manteve no segundo DAT, porém quando da ausência de inoculação com *A. brasilense* e *B. sorokiniana*, o tratamento *B. cereus* mostrou-se superior à Água e ASM. No terceiro e quarto DAT, MOS mostrou-se superior, exceto quando da ausência de inoculação com *A. brasilense* e *B. sorokiniana*. No quinto DAT houve superioridade de MOS em relação aos demais tratamentos quando da ausência do patógeno e presença da BPCV, e superioridade de MOS em relação à Água quando da ausência do patógeno e da BPCV.

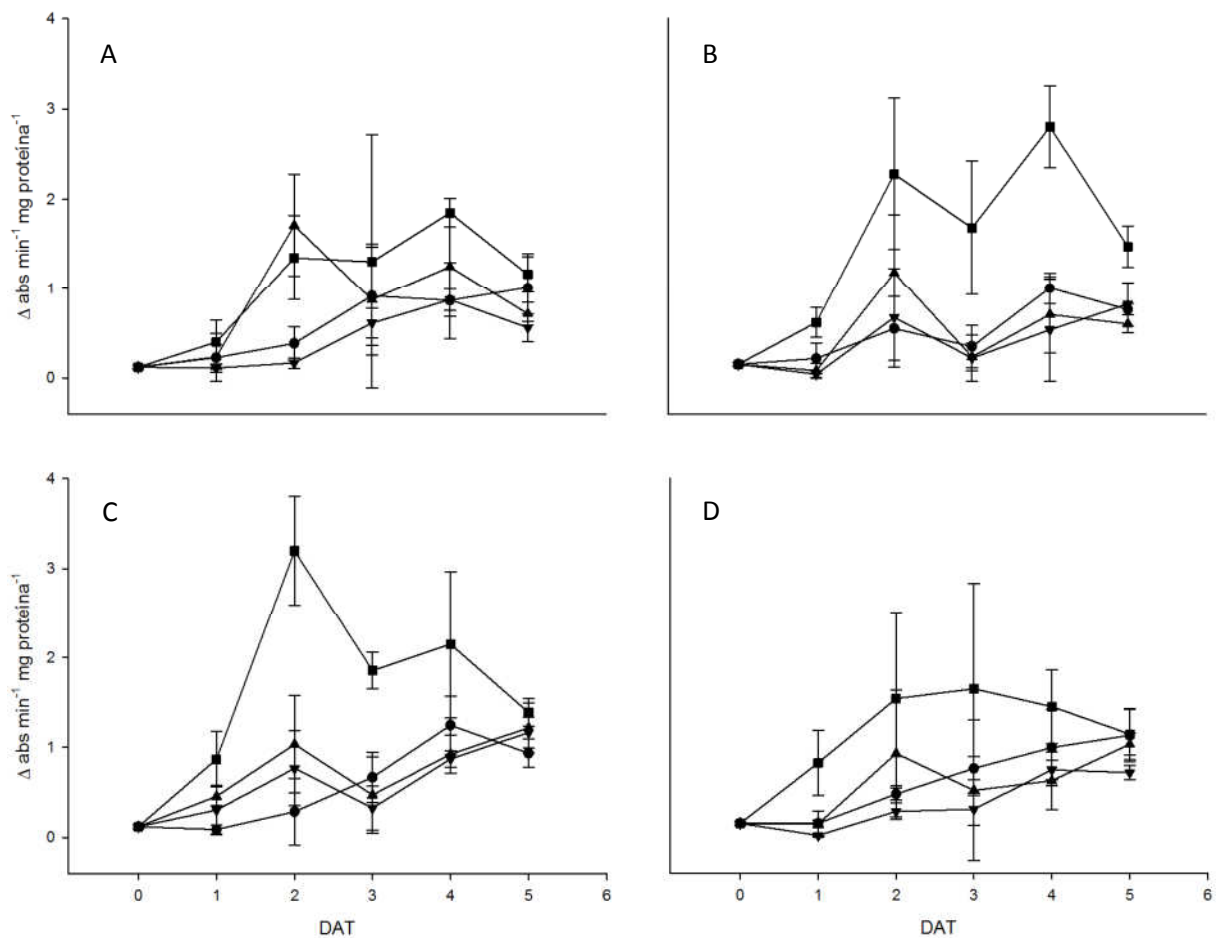


Figura 4.1 Atividade de peroxidase em trigo tratado com indutores de resistência. Plantas não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *B. sorokiniana*. Plantas não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *A. brasilense*. Os tratamentos foram realizados 24 h (0 DAT) antes da inoculação do patógeno (1 DAT). (●-): ASM; (■-): MOS; (▲-): *B. cereus*; (▼-): Água. Barras representam o erro padrão.

Observa-se que a atividade de peroxidase foi visivelmente superior para os tratamentos com MOS em relação aos demais. Da mesma forma, Pereira et al. (2013) obtiveram incrementos significativos na atividade de peroxidase em mudas de cacau tratadas com ASM e MOS contra *Moniliophthora perniciosa*, sendo que MOS mostrou-se mais efetivo na indução da atividade desta enzima que o ASM. Costa et al. (2010), também observaram incremento na atividade de peroxidases pelo tratamento com MOS e ASM em mudas de cacaueiro inoculadas com *Moniliophthora perniciosa*.

As peroxidases estão envolvidas nos processos de lignificação, suberificação, catabolismo da auxina (HIRAGA et al., 2001), respostas de hipersensibilidade, produção de fitoalexinas, grande parte destes, envolvidos na

defesa contra a infecção por patógenos (NICHOLSON & HAMMERSCHMIDT, 1992). A atividade desta enzima é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, ao ataque de patógenos e aos tratamentos com indutores, motivos pelos quais são frequentemente utilizadas como marcadores enzimáticos para estudos de resistência induzida (COSTA et al., 2010).

Considerando-se que houve redução significativa na severidade da doença mancha marrom quando da aplicação de MOS nas plantas de trigo, pode-se inferir que o aumento na atividade dessa enzima esteja relacionado ao controle da doença.

4.2.3.2 Atividade de Fenilalanina Amônia-liase

Em relação à atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (Figura 4.2), observa-se que no primeiro, segundo, quarto e quinto dias após o tratamento (DAT), houve interação tripla entre os fatores “Indutor de Resistência”, “Patógeno” e “BPCV”. No primeiro DAT, MOS mostrou-se superior a testemunha Água quando da ausência de *A. brasilense* e *B. sorokiniana*. No segundo DAT houve superioridade de MOS em relação ao ASM, quando da ausência do patógeno e presença de *A. brasilense*. No terceiro DAT não foi observada diferença significativa entre os tratamentos. No quarto DAT houve superioridade do tratamento *B. cereus* em relação aos demais, quando na ausência de *B. sorokiniana* e presença de *A. brasilense*. E superioridade de *B. cereus* e MOS em relação à testemunha Água, quando da ausência do patógeno e da BPCV. No quinto DAT houve superioridade do tratamento *B. cereus* em relação ao ASM, quando da presença do patógeno e da BPCV.

Observa-se uma tendência ao incremento na atividade de fenilalanina amônia-liase pelo MOS quando da ausência do patógeno e da BPCV, e pelo tratamento *B. cereus* quando da ausência do patógeno e presença da BPCV. Considerando o fato de que houve incremento na atividade da fenilalanina amônia-liase somente para os tratamentos com ausência do patógeno, pode-se inferir que o controle da doença mancha marrom não teve relação com a indução da rota dos fenilpropanóides. A PAL é considerada uma enzima chave na rota dos fenilpropanóides (RITTER & SCHULZ, 2004), de forma que a reação que ela cataliza é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2004), como ésteres, coumarinas, flavonóides e ligninas (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008), muitos deles, diretamente relacionados à proteção contra fitopatógenos. No entanto, a indução de

mecanismos de resistência na ausência do patógeno pode ser associada a um possível custo adaptativo (HEIL & BALDWIN, 2002), com alocação de recursos para formação de compostos de defesa (metabolismo secundário), competindo assim por substrato e energia com os processos de crescimento (metabolismo primário) (GAYLER et al., 2004).

Semelhantemente ao que ocorreu no presente trabalho quando da presença do patógeno, Kuhn (2007), não verificou incremento na atividade de PAL em plantas de feijão tratadas com ASM e *B.cereus* e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

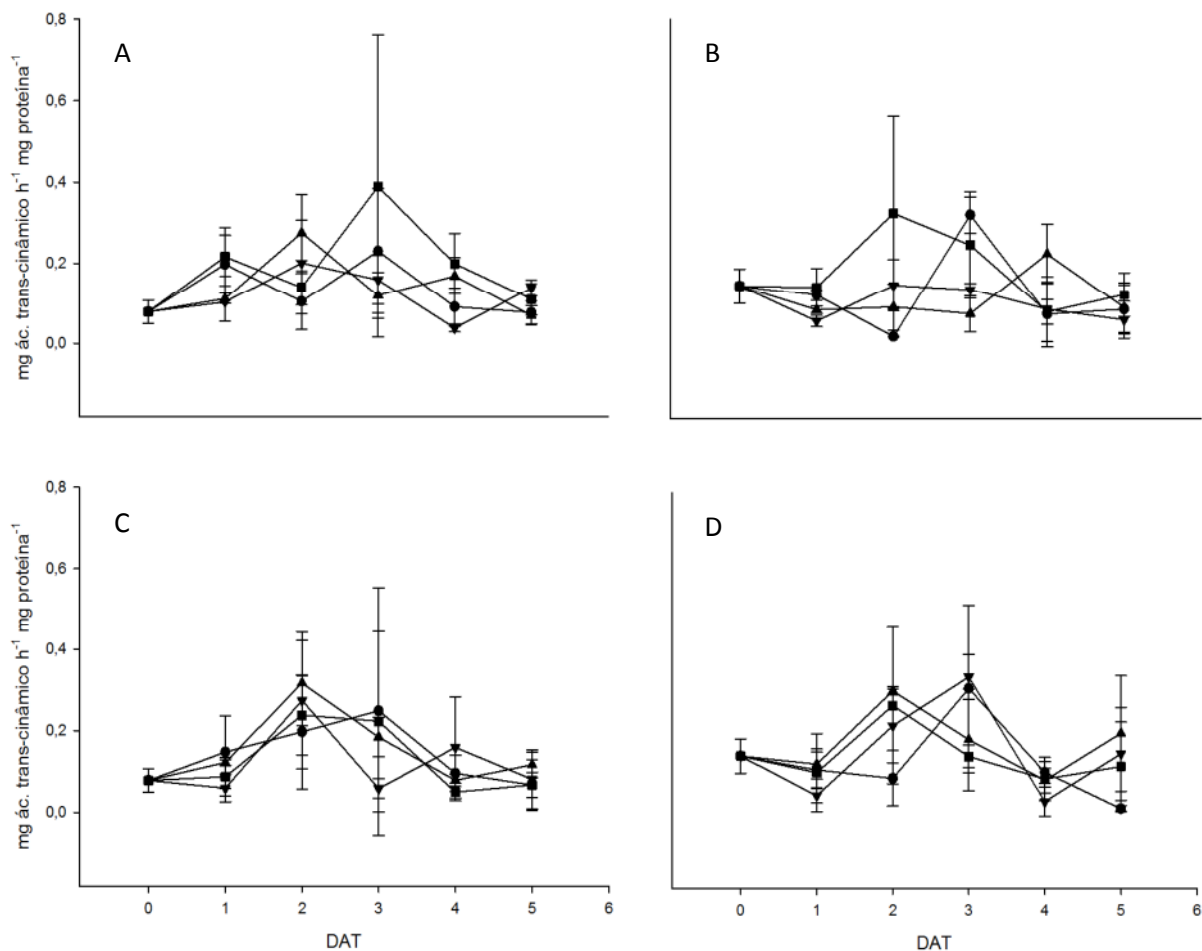


Figura 4.2 Atividade de fenilalanina amônia-liase em trigo tratado com indutores de resistência. Plantas não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *B. sorokiniana*. Plantas não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *A. brasilense*. Os tratamentos foram realizados 24 h (0 DAT) antes da inoculação do patógeno (1 DAT). (-●-): ASM; (-■-): MOS; (-▲-): *B. cereus*; (-▼-): Água. Barras representam o erro padrão.

Barbosa (2006), investigando a indução de enzimas relacionadas à defesa pela aplicação de ASM e MOS em algodoeiro visando o controle de ramulose, verificou que não houve incremento na atividade de fenilalanina amônia-liase por ambos os produtos. Assim como, Barbosa et al. (2008), não verificaram incremento na atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de algodão tratadas com ASM, MOS e Ácido Jasmônico, pelo contrário, houve redução na atividade da enzima pelo tratamento com ASM. Rios (2012), não verificou incremento na atividade de PAL em trigo tratado com Ácido Jasmônico, ASM e Etileno e inoculado com *Pyricularia oryzae*.

4.2.3.3 Atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase (Figura 4.3) apresentou interação tripla entre os fatores “Indutor de Resistência”, “Patógeno” e “BPCV” no primeiro, segundo, terceiro e quarto DAT. No primeiro DAT houve superioridade apenas para o tratamento ASM na presença do patógeno e inoculado com a BPCV em relação à ASM na presença do patógeno e não inoculado com a BPCV. No segundo DAT houve superioridade do tratamento MOS em relação a testemunha Água, quando da presença do patógeno e presença da BPCV. No terceiro DAT, os tratamentos *B. cereus* na presença de *A. brasilense*, *B. cereus* na ausência de *A. brasilense* e MOS na presença de *A. brasilense*, mostraram-se superiores quando da inoculação com *B. sorokiniana* em relação ao mesmo tratamento não inoculado. Quatro DAT, *B. cereus* mostrou-se superior aos demais tratamentos quando da não inoculação do patógeno e na presença de *A. brasilense*. Porém, foi inferior a ASM quando da presença de *B. sorokiniana* e *A. basilense*. Para o quinto DAT, não houve diferença significativa entre os tratamentos.

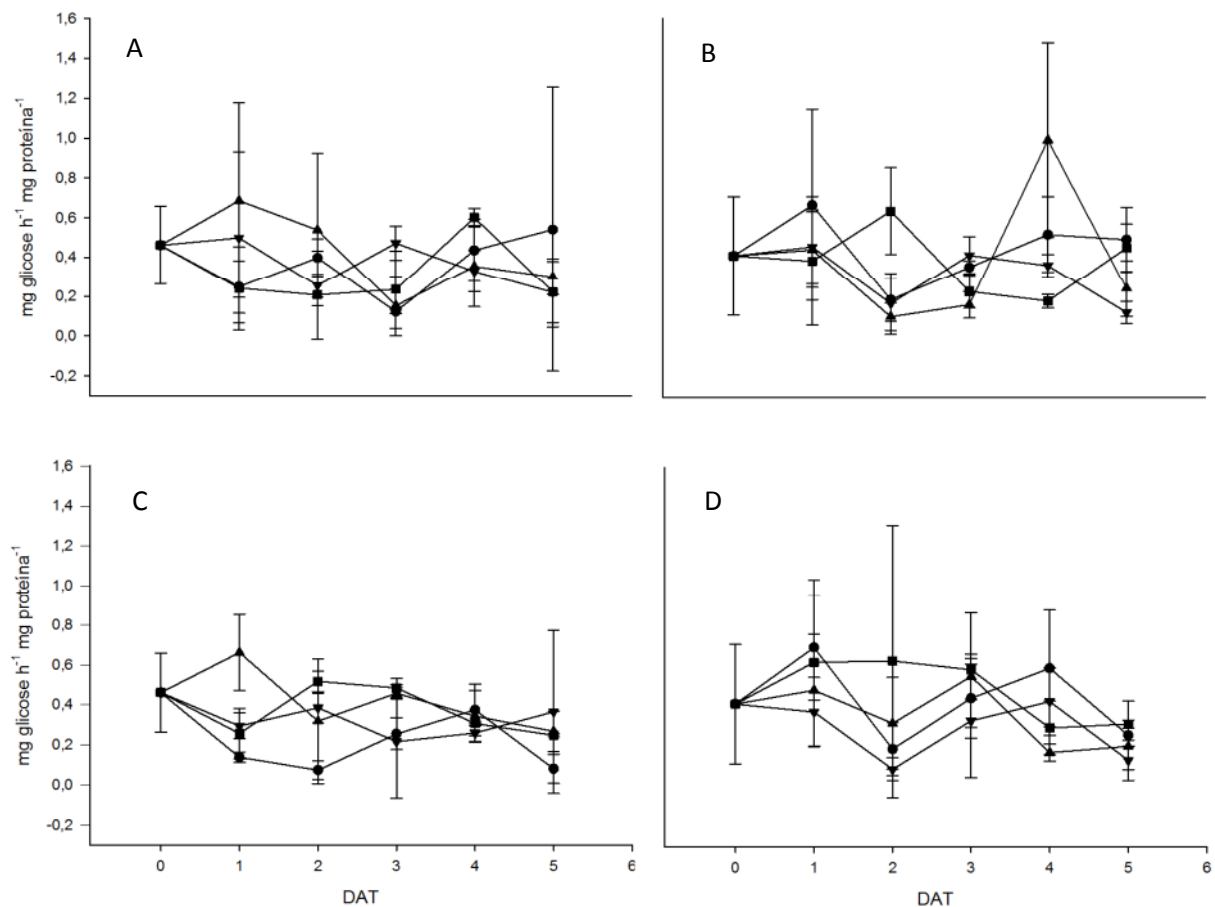


Figura 4.3 Atividade de β -1,3 glucanase em trigo tratado com indutores de resistência. Plantas não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *B. sorokiniana*. Plantas não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *A. brasilense*. Os tratamentos foram realizados 24 h (0 DAT) antes da inoculação do patógeno (1 DAT). (-●-): ASM; (-■-): MOS; (-▲-): *B. cereus*; (-▼-): Água. Barras representam o erro padrão.

Observa-se que houve certa inconsistência no padrão dos resultados obtidos para a atividade de β -1,3 glucanase. Porém um dado importante que deve ser observado, exceto no quarto DAT para *B. cereus* inoculado com *A. brasilense*, os tratamentos que apresentaram superioridade na atividade de β -1,3 glucanase, todos contavam com a inoculação do patógeno *B. sorokiniana*. A ativação da expressão da β -1,3- glucanase como resposta de resistência a patógenos foi descrita inicialmente para interações entre plantas e fungos patogênicos (COSTA et al., 2010 b). Em plantas de tabaco infectadas com *Colletotrichum destructivum* e pimentadeiras infectadas por *Colletotrichum coccodes*, foi verificada a ativação do gene pr-2 após 48

h de infecção (DEAN, 2002). Em trigo inoculado com *Fusarium graminearum*, níveis máximos de acúmulo de mRNA codificando a β -1,3- glucanase foram verificados após 24 h de infecção (LI et al., 2001). Costa et al. (2010) observaram aumento na atividade da enzima β -1,3 glucanase em porta-enxertos de videira resistentes e inoculados com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *herbemontis*. Tais dados vêm de encontro ao que foi observado no presente trabalho. Isso se deve ao fato de que as β -1,3-glucanases são enzimas que hidrolisam polímeros de β -1,3-glucana, composto esse, que juntamente com a quitina, são os principais componentes que dão resistência à parede celular dos fungos (CORNELISSEN & MELCHERS, 1993). Dessa forma, o patógeno age como elicitor, fato que foi comprovado por Bach & Kimati (1999), os quais isolaram uma toxina, caracterizada como proteína, a partir de *B. sorokiniana* capaz de induzir a atividade de β -1,3-glucanases em plantas de trigo resistentes a doença mancha marrom.

4.2.4 Trocas Gasosas

4.2.4.1 Taxa de Assimilação Líquida CO₂ (A)

A taxa de assimilação líquida de CO₂ (Figura 4.4), não apresentou diferença entre os tratamentos até o quarto dia após o tratamento (DAT), momento no qual houve interação tripla entre “Indutores de Resistência”, “Patógeno” e “BPCV”, de forma que a testemunha Água mostrou-se superior ao MOS quando da ausência do patógeno porém na presença de *A. brasilense*. A testemunha Água na ausência do patógeno foi superior quando inoculada com *A. brasilense*, em relação às plantas não inoculadas com a BPCV. E quando comparado o tratamento Água na presença de *A. brasilense*, houve superioridade para as plantas não inoculadas com o patógeno em relação às aquelas inoculadas. No quinto DAT também houve interação tripla, sendo que o tratamento *B. cereus* foi superior à Água e MOS quando da presença do patógeno e ausência da BPCV.

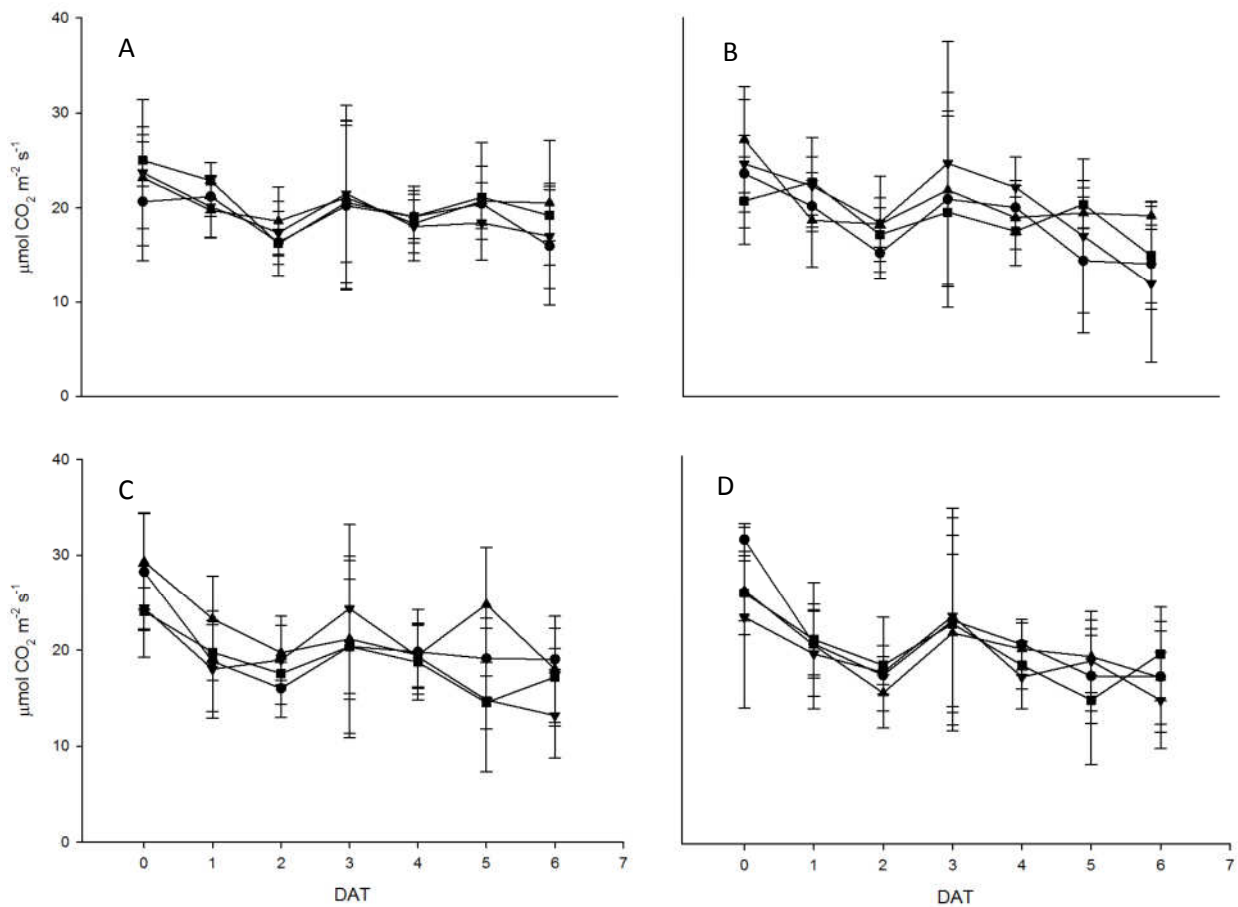


Figura 4.4 Taxa de assimilação líquida CO₂ (A) em trigo tratado com indutores de resistência. Plantas não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *B. sorokiniana*. Plantas não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *A. brasilense*. Os tratamentos foram realizados 24 h (0 DAT) antes da inoculação do patógeno (1 DAT). (-●-): ASM; (-■-): MOS; (-▲-): *B. cereus*; (-▼-): Água. Barras representam o erro padrão.

Analisando os dados obtidos no quarto DAT é possível realizar uma análise bastante importante sobre os resultados. O primeiro ponto a ser observado é a maior taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) quando da ausência do patógeno. Sabe-se que a presença de um patógeno desafiador provoca redução na fotossíntese da planta, observando-se reduções nas proteínas relacionadas à fotossíntese (Rubisco, Rubisco ativase e ATP sintase), sendo considerado um mecanismo efetivo de defesa contra o patógeno (GARAVAGLIA et al., 2010). O que está possivelmente relacionado à alocação de substrato e energia para a defesa (HEIL et al., 2000; GAYLER et al., 2004). Nesse sentido, remete-se o fenômeno denominado lesão virtual, onde a redução na fotossíntese está associada não somente a redução na área foliar verde,

e que pode ser observada também em folhas com ausência de lesões (BASTIAANS, 1991; CALVET et al., 2005). No presente trabalho pode-se inferir que o resultado segue essa tendência, considerando-se que as avaliações foram realizadas até cinco dias após a inoculação com o patógeno, momento esse onde as plantas ainda não apresentavam sintomas visíveis da doença, e, portanto, a redução na assimilação líquida de CO_2 esteja relacionada a injúrias bioquímicas na maquinaria fotossintética, baixa condutância estomática ou incremento em aceptores alternativos de elétrons (RIBEIRO et al., 2003).

O segundo ponto a ser observado é relativo à maior taxa de assimilação de CO_2 na presença de *A. brasilense*, o que pode estar relacionado à fixação de N promovido pela bactéria (MARIN et al, 1999; HUNGRIA, 2011) e consequente equilíbrio na fonte de substrato tanto para o metabolismo primário quanto secundário. Heil et al. (2000) comprovaram que o custo adaptativo é maior em ambientes onde o N é escasso. O terceiro ponto refere-se à redução na taxa de assimilação de CO_2 pelo tratamento MOS, o que remete novamente a alocação de recursos para a defesa induzida, nesse caso (GAYLER et al., 2004).

Kuhn (2007), não observou alteração na taxa de assimilação líquida de CO_2 em feijoeiro tratado com os indutores de resistência ASM e *B. cereus*.

4.2.4.2 Concentração Interna de CO_2 (C_i)

Em relação a concentração interna de CO_2 (Tabela 4.5), houve interação dupla entre os “Indutores de Resistência” e “BPCV” no segundo DAT, sendo que na presença de *A. brasilense*, houve superioridade da testemunha Água em relação ao MOS.

Para o terceiro e quarto DAT, houve interação tripla entre os fatores. De forma que no terceiro DAT para o tratamento ASM na ausência de *A. brasilense*, o tratamento não inoculado com o patógeno mostrou-se superior ao inoculado.

No quarto DAT, houve superioridade da testemunha Água na ausência da BPCV quando da não inoculação do patógeno em relação ao mesmo tratamento com inoculação do patógeno. Assim como houve superioridade do tratamento MOS na ausência da BPCV quando da não inoculação do patógeno em relação ao mesmo tratamento com inoculação do patógeno.

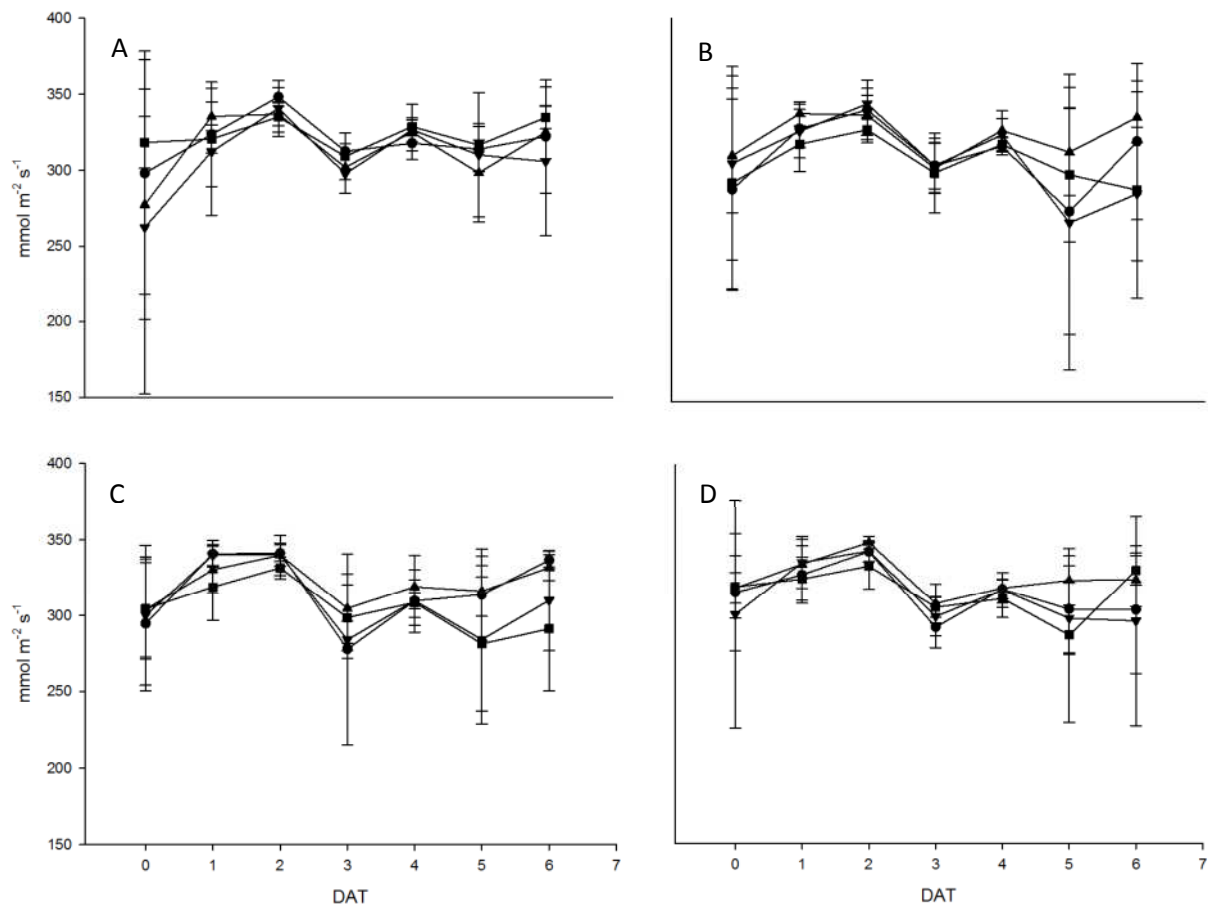


Figura 4.5 Concentração Interna de CO_2 (C_i) em trigo tratado com indutores de resistência. Plantas não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *B. sorokiniana*. Plantas não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *A. brasilense*. Os tratamentos foram realizados 24 h (0 DAT) antes da inoculação do patógeno (1 DAT). (○-): ASM; (■-): MOS; (▲-): *B. cereus*; (▼-): Água. Barras representam o erro padrão.

De acordo com Taiz e Zeiger (2004), a produtividade de uma planta pode ser analisada como o produto da energia solar interceptada e do CO_2 fixado. Dessa forma, na presença de quantidade adequada de luz e ausência de estresse, concentrações intercelulares mais altas de CO_2 sustentam taxas fotossintéticas elevadas, enquanto que em concentrações muito baixas a fotossíntese é limitada.

Um ponto interessante a ser observado, é a maior concentração interna de CO_2 no terceiro e quarto DAT sempre para os tratamentos com ausência do patógeno em relação aqueles com a presença do mesmo. Da mesma forma, o MOS também apresentou redução na concentração interna de CO_2 no segundo DAT.

4.2.4.3 Transpiração Foliar (E)

Para o segundo DAT não houve interação entre os fatores, sendo que apenas o fator “Indutores de Resistência” foi significativo, sendo que Água e *B. cereus* mostraram-se superiores ao MOS.

No quarto, quinto e sexto DAT houve interação tripla entre “Indutores de Resistência”, “Patógeno” e “BPCV”.

No quarto DAT, houve superioridade da testemunha Água na presença da BPCV quando da não inoculação do patógeno em relação ao mesmo tratamento com inoculação do patógeno. Assim como, houve superioridade do tratamento MOS na ausência da BPCV quando da não inoculação do patógeno em relação ao mesmo tratamento com inoculação do patógeno.

No quinto DAT houve superioridade do tratamento MOS na ausência da BPCV quando da não inoculação do patógeno em relação ao mesmo tratamento com inoculação do patógeno.

No sexto DAT houve superioridade do tratamento *B. cereus* sobre a testemunha Água, quando da não inoculação do patógeno, porém inoculados com *A. brasiliense*.

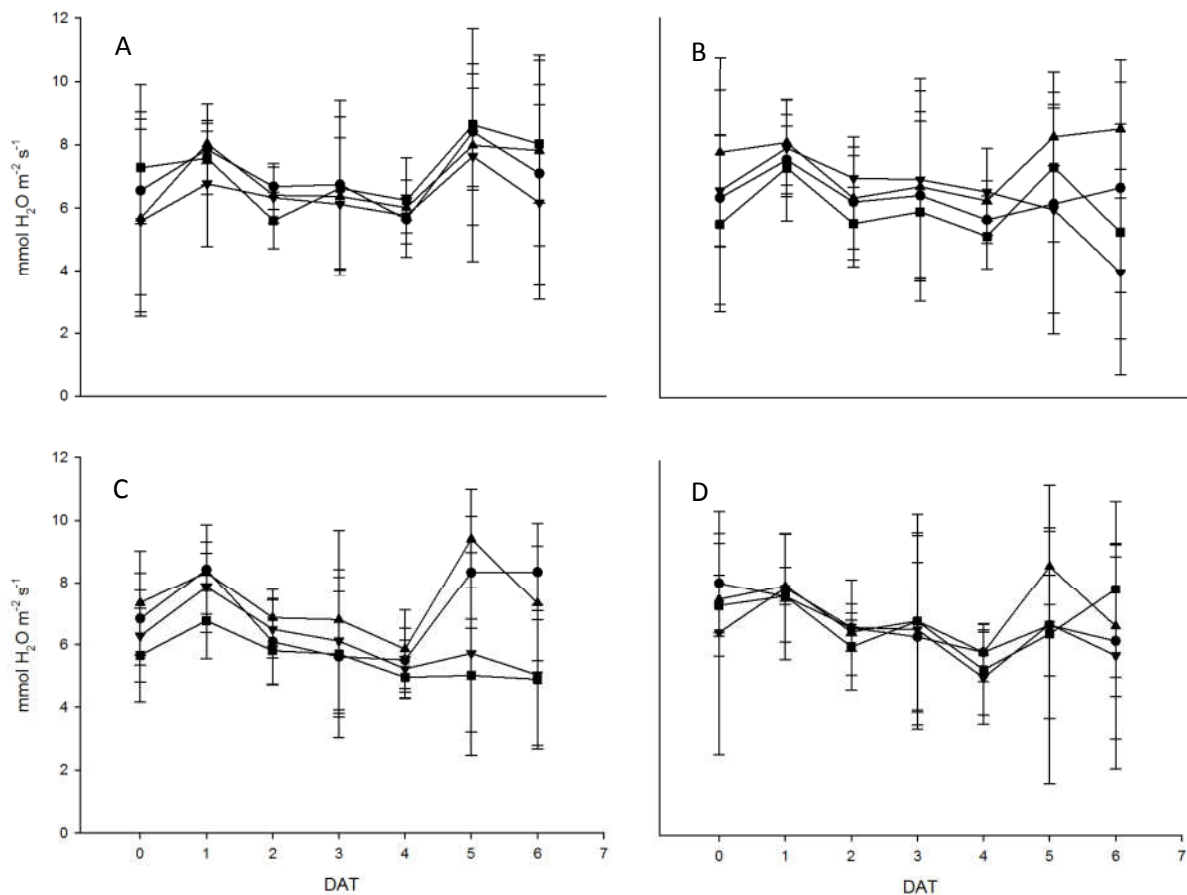


Figura 4.6 Taxa Transpiração Foliar (E) em trigo tratado com indutores de resistência. Plantas não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *B. sorokiniana*. Plantas não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *A. brasilense*. Os tratamentos foram realizados 24 h (0 DAT) antes da inoculação do patógeno (1 DAT). (●): ASM; (■): MOS; (▲): *B. cereus*; (▼): Água. Barras representam o erro padrão.

Observa-se que para o quarto e quinto DAT houve superioridade sempre que da ausência do patógeno. No entanto, Guerra et al. (2014), obtiveram resultados diferentes quando da avaliação de duas variedades de algodão infectadas por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, em uma delas não se verificou alteração na transpiração foliar em função da inoculação do patógeno, ao passo que a segunda apresentou aumento na transpiração foliar pela inoculação do fungo.

A transpiração de folhas doentes pode ser maior ou menor que aquela de folhas saudáveis (DUNIWAY & DURBIN, 1971; GUERRA et al., 2014). O aumento da transpiração pode ser ocasionado pela destruição da cutícula, pelo aumento da

permeabilidade da membrana das células da folha e pela inibição do fechamento dos estômatos. A redução da transpiração pode ser resultante do fechamento induzido dos estômatos pela doença, redução dos espaços do mesófilo pelas hifas ou hipertrofia das células do mesófilo, obstrução dos tecidos condutores e estômatos, desfolha e/ou murcha e seca precoce das folhas (GODOY et al., 2001).

A menor *E* apresentada pelo MOS no segundo DAT indica houve uma menor perda de vapor d'água em relação às demais plantas, o que pode estar associado a indução de mecanismos de defesa estruturais.

4.2.4.4 Condutância estomática (g_s)

A condutância estomática (Figura 4.7) apresentou interação dupla no segundo DAT entre “Indutores de Resistência” e “Patógeno”, de forma que na ausência do patógeno o tratamento MOS apresentou menor média em relação a testemunha Água.

No quarto DAT houve interação tripla entre “Indutores de Resistência”, “Patógeno” e “BPCV”. Quando da ausência do patógeno e presença de *A. brasilense*, o tratamento MOS mostrou-se inferior a testemunha Água. E no caso da testemunha Água inoculada com *A. brasilense*, houve superioridade quando da ausência do patógeno em relação ao mesmo tratamento com a presença do patógeno.

No quinto DAT, também houve interação tripla entre “Indutores de Resistência”, “Patógeno” e “BPCV”. Quando da presença do patógeno, porém ausência de *A. brasilense*, o tratamento *B. cereus* foi superior ao MOS.

Em todos os casos onde houve diferença estatística, o tratamento MOS esteve associado a menor condutância estomática. O processo de abertura e fechamento dos estômatos está relacionado principalmente com a intensidade de luz e o estado de hidratação da folha. Dessa forma, o funcionamento dos estômatos influencia diretamente a produtividade do vegetal, de forma que controla a absorção de CO₂ (COSTA & MARENCO, 2007).

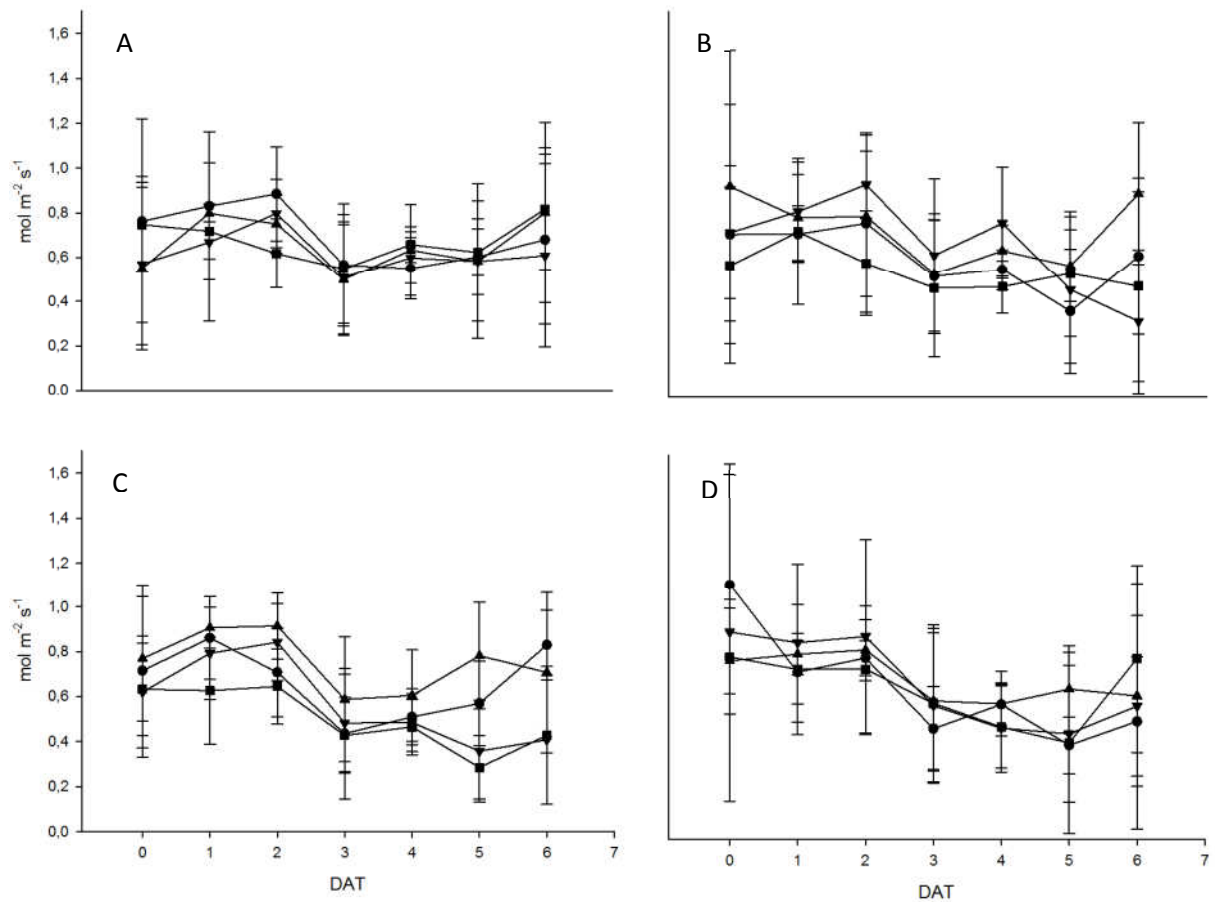


Figura 4.7 Condutância estomática (g_s) em trigo tratado com indutores de resistência. Plantas não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *B. sorokiniana*. Plantas não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *A. brasilense*. Os tratamentos foram realizados 24 h (0 DAT) antes da inoculação do patógeno (1 DAT). (●): ASM; (■): MOS; (▲): *B. cereus*; (▼): Água. Barras representam o erro padrão.

4.2.5 Análises Biométricas e Componentes da Produção

As avaliações biométricas consistiram da avaliação da área foliar (Tabela 4.4), diâmetro do colmo, comprimento da folha bandeira, massa seca colmo + bainha, massa seca de folhas (Tabela 4.5) e altura de planta (Tabela 4.6) na fase de florescimento da cultura.

Para a variável área foliar (Tabela 4.4) houve interação dupla entre os fatores “Indutor de Resistência” e “BPCV”. Observa-se que, para as plantas não inoculadas com *A. brasilense*, a área foliar das plantas tratadas com ASM foi menor em relação à testemunha e *B. cereus*.

Tabela 4.4 Área foliar (cm²) em função do tratamento com indutores de resistência, na presença ou ausência da BPCV *A. brasilense*.

	(+) <i>A. brasilense</i>	(-) <i>A. brasilense</i>
ASM	559,57 a	454,67 b
MOS	434,04 a	535,69 ab
<i>B. cereus</i>	476,74 a	623,97 a
Água	526,25 a	621,04 a

¹Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV (%) = 21,07.

Para as variáveis comprimento de folha bandeira, diâmetro do colmo, massa seca colmo + bainha, massa seca de folhas (Tabela 4.5) e altura de planta (Tabela 4.6), houve interação tripla entre os fatores “Indutor de Resistência”, “Patógeno” e “BPCV”. O comprimento da folha bandeira apresentou maior média para a testemunha Água em relação aos demais tratamentos em todas as combinações, porém houve diferença estatística somente em relação à ASM e quando da ausência de *B. sorokiniana* e ausência de *A. brasilense*.

Tabela 4.5 Comprimento da folha bandeira (cm), diâmetro de colmo (cm), massa seca de colmo + bainha (g planta⁻¹) e massa seca de folhas (g planta⁻¹) em função do tratamento com indutores de resistência, na presença ((+)B.s.) ou ausência ((-)B.s.) do patógeno *B. sorokiniana* e presença ((+)A.b.) ou ausência ((-)A.b.) da BPCVP *A. brasilense*.

	Compr. folha bandeira (cm)				Diâmetro do colmo (cm)			
	(+)B.s.		(-)B.s.		(+)B.s.		(-)B.s.	
	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.
ASM	24,21	24,54	22,41	22,75 B	2,91	2,96 AB	2,62	2,71
MOS	22,83	26,12	23,87	24,45 AB	2,70	3,02 AB	2,51 b	3,04 a
<i>B. cereus</i>	24,58	25,24	22,58	25,45 AB	3,03 a	2,51 bB	2,96	2,87
Água	25,95	27,91	27,08	27,83 A	2,87	3,12 A	2,98	3,28
	Massa seca colmo + bainha (g planta ⁻¹)				Massa seca folhas (g planta ⁻¹)			
	(+)B.s.		(-)B.s.		(+)B.s.		(-)B.s.	
	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.
ASM	7,70	7,95	8,46	8,80	7,33	7,37	7,25	7,42
MOS	6,10 b	9,02 a	7,37	7,63	5,31 b	8,74 a	7,00	8,05
<i>B. cereus</i>	8,27	9,02	8,15	8,59	7,34	8,50	7,38	8,97
Água	8,86	8,02	9,08	8,24	7,78	8,23	8,75	8,75

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A redução na dimensão da folha bandeira pode provocar um impacto significativo na produção do trigo, visto que os produtos da fotossíntese elaborados nas folhas situadas na porção superior do colmo, principalmente a folha bandeira, são responsáveis pela maior parte da produção. Redução de aproximadamente 10% no rendimento do trigo foi observada quando destacada a folha bandeira (SOUZA et al., 2013).

Em relação ao diâmetro do colmo, houve superioridade da testemunha Água em relação à *B. cereus* quando as plantas foram inoculadas com o patógeno, porém não inoculadas com a BPCV. Quando o tratamento *B. cereus* foi aplicado na presença de *B. sorokiniana*, houve superioridade para as plantas inoculadas com *A. brasilense* em relação às não inoculadas. Em relação às plantas não inoculadas com o patógeno, houve superioridade para o tratamento MOS quando da ausência de *A. brasilense* em relação a presença da bactéria.

Para massa seca de colmo + bainha e massa seca de folhas, apenas o tratamento MOS inoculado com o patógeno e não inoculado com *A. brasilense* apresentou superioridade em relação ao MOS inoculado com o patógeno e não inoculado com *A. brasilense*.

Em relação à altura de planta, houve superioridade da testemunha Água na ausência do patógeno e presença de *A. brasilense* em relação ao tratamento com presença de *A. brasilense*.

Debona et al. (2009), trabalhando com aplicação de ASM via tratamento de sementes de soja para o controle de ferrugem asiática, não verificou alterações quanto ao comprimento e massa seca de parte aérea, no entanto, houve redução significativa no comprimento e massa seca de raízes aos 21 dias após a emergência.

Ongena et al. (1999), trabalhando com pepino submetido ao indutor biótico *Pseudomonas putida*, observaram acentuada redução da severidade de *Pythium aphanidermatum*, porém, não houve redução da massa fresca de parte aérea e ocorreu aumento da massa seca de raízes das plantas induzidas.

As análises de produção consistiram da avaliação do número de espigas por planta, massa total de grãos e massa de 100 grãos (Tabela 4.6). Quanto ao número de espigas por planta, quando as plantas não foram inoculadas com a BPCV, porém na presença do patógeno, houve superioridade do tratamento ASM em relação a *B. cereus*. O tratamento *B. cereus* na ausência de *A. brasilense* foi superior na ausência do patógeno em relação ao mesmo tratamento na presença de *B. sorokiniana*.

Para a variável massa de 100 grãos, quando da inoculação de *A. brasilense*, houve superioridade do tratamento ASM em relação à testemunha Água, tanto na presença como na ausência do patógeno. Porém, as plantas não inoculadas com o patógeno e tratadas com MOS apresentaram média superior àquelas na ausência do patógeno.

Tabela 4.6 Altura de plantas de trigo (cm), massa total de grãos (g planta⁻¹), número de espigas por planta e massa de 100 grãos (g), em função do tratamento com indutores de resistência, na presença ((+)B.s.) ou ausência ((-)B.s.) do patógeno *B. sorokiniana* e presença ((+)A.b.) ou ausência ((-)A.b.) da BPCVP *A. brasilense*.

	Altura de planta (cm)				Massa total de grãos (g planta ⁻¹)			
	(+)B.s.		(-)B.s.		(+)B.s.		(-)B.s.	
	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.	(+)A.b.	(-)A.b.
ASM	63,75	63,33	64,00	63,62	13,18	14,67	14,59	13,88
MOS	62,75	65,83	64,95	68,25	14,08	14,40	15,04	17,19
<i>B. cereus</i>	66,29	67,16	63,20	66,16	14,81	15,23	16,45	17,37
Água	65,66	68,41	70,41 a	64,58 b	14,45	16,88	12,64	19,01
	Número de espigas por planta				Massa de 100 grãos (g)			
	(+)A.b.		(-)A.b.		(+)A.b.		(-)A.b.	
	(+)B.s.	(-)B.s.	(+)B.s.	(-)B.s.	(+)B.s.	(-)B.s.	(+)B.s.	(-)B.s.
ASM	37,25	40,25	42,75 A	35,25	2,74 A	2,60 A	2,18	2,13
MOS	38,50	35,50	33,25 AB	34,75	1,88 bB	2,40 aAB	2,34	2,14
<i>B. cereus</i>	33,00	40,50	29,00 bB	40,25 a	2,17 AB	2,30 AB	2,28	2,29
Água	29,25	33,50	33,75 AB	41,25	2,00 B	1,87 B	2,42	2,53

Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em relação à massa total de grãos, não houve diferença entre os tratamentos.

Heil et al. (2000) aplicando ASM em trigo sob diferentes condições de fornecimento e doses N, concluíram que a indução de resistência sob condições de ausência do patógeno, teve efeito negativo no crescimento e/ou produção das plantas, independentemente das condições de crescimento ou fertilização. Entretanto, maior impacto foi observado em condições de déficit nutricional.

Ferro (2009) verificou que o emprego de isolados de *Bacillus* na cultura do algodão visando o controle de mancha-angular e ramulose provocou impacto na produtividade quando da aplicação de *B. subtilis* ALB629.

Apesar da superioridade apresentada pelo ASM em relação à massa de 100 grãos, não houve diferença estatística quando avaliada a massa total de grãos por planta, indicando que não houve um impacto na produção pela utilização dos indutores, inoculação do patógeno ou inoculação da BPCV. Entretanto quando analisamos os resultados referentes ao diâmetro do colmo, comprimento da folha bandeira e área foliar, observamos uma superioridade da testemunha Água em relação aos indutores de resistência, e no caso da área foliar e do comprimento da folha bandeira, percebe-se que houve superioridade da Testemunha água em relação ao ASM quando da não inoculação do patógeno. Esse resultado pode ser associado ao custo adaptativo da planta, alocando recursos internos para o metabolismo secundário em detrimento do metabolismo primário (GAYLER et al., 2004).

Heil et al. (2000) afirmam que divergências verificadas em diversos estudos quanto a alocação de recursos para a defesa e o consequente impacto no desenvolvimento e produção da cultura, tem relação com a fase de desenvolvimento da planta e com as condições nutricionais.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os indutores de resistência interferiram no crescimento micelial e esporulação do fungo *B. sorokiniana*, o que indica atividade antimicrobiana dos mesmos;

- ASM, MOS e *B. cereus* mostraram-se eficientes no controle de mancha marrom em trigo, sendo que tal resultado pode estar relacionado a atividade antimicrobiana, como também ao efeito indutor de resistência;

- A aplicação de MOS induziu o aumento da atividade de peroxidases, a qual pode estar relacionada ao processo de lignificação e consequentemente indução de resistência; A atividade de peroxidases mostrou-se um eficiente indicativo do estado de indução para as plantas de trigo tratadas com ASM, MOS e *B. cereus*.

- A população de diazotróficos endofíticos não sofreu interferência pela aplicação dos indutores, nem pela inoculação de *A. brasilense*. Isso indica que as populações nativas do solo apresentaram maior influência na população endofítica do que o *A. brasilense* inoculado.

- Houve maior taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) na ausência do patógeno e presença de *A. brasilense*. MOS apresentou menor condutância estomática e consequentemente redução da A.

- A concentração interna de CO₂ e a transpiração foliar foram superiores nos tratamentos com ausência do patógeno.

- Os resultados referentes às trocas gasosas não se mostraram conclusivos, sendo as diferenças constatadas, bastante pontuais, isso se deve possivelmente a alta variação nos fatores ambientais;

- O comprimento da folha bandeira e a área foliar foram afetados pela aplicação de ASM, o que pode estar relacionado a um custo energético;

- A massa total de grãos não sofreu interferência dos tratamentos, apesar de a massa de 100 grãos ter sido superior para ASM.

6. CONCLUSÃO

- ASM, MOS e *B. cereus* mostraram-se eficientes no controle de mancha marrom em trigo;
- A aplicação de MOS induziu aumento na atividade de peroxidases em folhas de trigo;
- A população de diazotróficos endofíticos em plantas de trigo não sofreu interferência pela aplicação dos indutores e/ou inoculação de *A. brasilense*;
- A produtividade de plantas de trigo não foi afetada pelos tratamentos indutores e/ou inoculação de *A. brasilense*;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, K.; DUTTA, A.K.; PRADHAN, P. *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.: The most destructive wheat fungal pathogen in the warmer areas. **Australian Journal of Crop Science**, v.5, n.9, p.1064-1071, 2011.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**, 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 922p.

AHMED, N. **Physiological and molecular basis of Azospirillum-Arabidopsis Interaction**. 2010. 168 p. THESIS (PhD). Universitätsbibliothek der Universität Würzburg, Würzburg, 2010.

ALBUQUERQUE, F.A.; LIMA, J.M.; CAVALCANTI, R.W.G.; BORIN, A.L.D.C.; SARAIVA, J.P. *Azospirillum* spp. Como potencial indutor de resistência à *Alabama argillacea* (Hub) em plantas de algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 10., 2015, Foz do Iguaçu. **Resumos**. Brasília: ABRAPA, 2015.

ALEN'KINA, S.A.; TRUTNEVA, K.A.; NIKITINA, V.E. Change in the content of salicylic acid and in the activities of phenylalanine ammonia-Lyase and catalase in wheat seedling roots under the effect of *Azospirillum* lectins. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v.8, n.2, p.110-117, 2012.

AMINUZZAMAN, F.M.; HOSSAIN, I. Evaluation of plant activator and chemical fungicides on leaf blight (*Bipolaris sorokiniana*) development and yield of wheat. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, p.1797-1803, 2007.

ARAÚJO, J.S.P.; GONÇALVES, K.S.; OLIVEIRA, B.C.; RIBEIRO, R.L.D. Efeito do acibenzolar-S--metil sobre a murcha-bacteriana do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.1, p.5-8, 2005.

BACH, E.E.; BARROS, B.C.; KIMATI, H. Induced resistance against *Bipolaris bicolor*, *Bipolaris sorokiniana* e *Drechslera tritici-repentis* in wheat leaves by xanthan gum and heat-inactivated conidial suspension. **Journal of Phytopathology**, v.151, p.411-418, 2003.

BACH, E.E.; KIMATI, H. Purification and characterization of toxins from wheat isolates of *Drechslera tritici-repentis*, *Bipolaris bicolor*, and *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.5 n.2, 1999.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.

BARBOSA, M.A.G.; LARANJEIRA, D.; COELHO, R.S.B. Physiological cost of induced resistance in cotton plants at different nitrogen levels. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, 2008.

BARBOSA, M.A.G. **Resistência do algodoeiro à ramulose: avaliação de linhagens, indutores químicos, enzimas envolvidas na resposta de defesa e custo fisiológico da indução**. 2006. 142 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

BARROS, F.C.; SAGATA, É.; FERREIRA, L.C.C.; JULIATTI, F.C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v.26, n.2, p.231-239, 2010.

BASHAN, Y.; DE BASHAN, L.E. Plant growth-promoting. **Encyclopedia of Soils in the Environment**, v.1, p.103-115, 2005.

BASSO, S.M.S.Â. **Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de Adesmia DC. e Lótus L.** 1999. 268p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

BASTIAANS, L. Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. **Phytopathology**, v.81, n.6, p.611-615, 1991.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetic and Molecular Biology**, v.35, n.4, supl.1, p.1044-1051, 2012.

BENICASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas (noções básicas)**. 2ª ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.

BOKSHI, A.I.; JOBLING, J.; MCCONCHIE, R. A single application of Milsana® followed by Bion® assists in the control of powdery mildew in cucumber and helps overcome yield losses. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.83, p.701–706, 2008.

BONFIM-SILVA, E.M.; SILVA, T.J. A.; CABRAL, C.E.A.; KROTH, B.E.; REZENDE, D. Desenvolvimento inicial de gramíneas submetidas ao estresse hídrico. **Revista Caatinga**, v.24, n.2, p.180-186, 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CAMILO, F.R.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; COSTA, J.C.B.; SILVA JUNIOR, M.B.; AGUIAR, M.A.G. Indutores de Resistencia contra vassoura-de-bruxa no cacauero: Avaliação em campo. **Tropical Plant Pathology**, v.35 (suplemento), p.S194, 2010.

CALVET, N.P.; UNGARO, M.R.G.; OLIVEIRA, R.F. Virtual sesion of Alternaria blight on sunflower. **Helia**, v.28, n.42, p.89–100, 2005.

CAMILO, F.R.; RESENDE, M.L.V.; COSTA, J.C.B.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; AFONSO, L.O.; PEREIRA, R.B. Ativação de enzimas de defesa por Agro-Mos® e

acibenzolar-S-metil em cacauero contra *Moniliophthora perniciosa*. **Tropical Plant Pathology**, v.35 (suplemento), p.S194, 2010.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley, 1990. 532p.

CAMPOS NETO, J.R.M. **Indução de resistência no manejo da fusariose do tomateiro em São Luís – MA**. 2013. 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2013.

CAVALCANTI, L.S.; RESENDE, M.L.V. Efeito da época de aplicação e dosagem do acibenzolar- S-metil na indução de resistência à murcha-de-Verticillium em cacauero. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.1, 2005.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap. 4. p.81-124.

CHEN, Z.; SILVA, H.; KLESSIG, D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. **Science**, v.262, n.5141, p.1883-1886, 1993.

CHOUDHARY, D.K., JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants – with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v.164, p.493–513, 2008.

CHOUDHARY, D.K.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p.289–297, 2007.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.9, p.4951–4959, 2005.

CONRATH, U.; PIETERSE, C.M.J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant–pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, v.7, n.5, p.210–216, 2002.

CORNELISSEN, B.J.C. & MELCHERS, L.S. Strategies of control of fungal disease with transgenic plants. **Plant Physiology**, v.101, p.709-712, 1993.

CORSINI, D.C.D.C.; ARF, O.; CASSIOLATO, A.M.R.; RODRIGUES, R.A.F.; SOUZA, E. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na cultura do arroz de terras altas irrigado por aspersão. In: Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 8., 2013, Santa Maria. **Resumos**, 2013.

COSTA, J.C.B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JR, P.M.; CAMILO, F.R.; MONTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacauero contra

Moniliophthora perniciosa por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, v.35, n.5, p.285-294, 2010.

COSTA, M.D.; LOVATO, P.E.; SETE, P.B. Micorrização e indução de quitinases e β -1,3-glucanases e resistência à fusariose em porta-enxerto de videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.4, p.376-383, 2010 b.

CRUZ, S.M.D.C.; RODRIGUES, A.A.C.; COELHO, R.S.B.; SARDINHA, D.H.S. Ação indutora de produtos abióticos na resistência de tomateiro e efeito sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Idesia**, v.29, n.2, p.111-118, 2011.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B.; SILVA, R.L.X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v.30, n.3, 2004.

DEAN, J.D.; GOODWIN, P.H.; HSIANG, T. Comparison of Relative RT-PCR and Northern blot analyses to measure expression of β -1,3- glucanase in *Nicotiana benthamiana* infected with *Colletotrichum destructivum*. **Plant Molecular Biology**, v.20, p.347–356, 2002.

DEBONA, D.; FIGUEIRÓ, G.G; DALLA CORTE, G.; NAVARINI, L.; DOMINGUES, L.S.; BALARDINI, R.S. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas e acibenzolar-S-methyl no controle da ferrugem asiática e crescimento de plântulas em cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.1, 2009.

DINIZ, N.B.; PAZ, D.S.; SARDINHA, D.H.S; PEREIRA, T.S.; RODRIGUES, A.A.C. Influência *in vitro* de ASM e Agro-Mos sobre o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* associado a flores tropicais. **Tropical Plant Pathology**, 38 (Suplemento), agosto 2012.

DIXON, R.A.; PAIVA, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**, v.7, p.1085–1097, 1995.

DOBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v.22, n.10, p.1464–73, 1976.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, v.34, n.7, p.869-881, 1982.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, EMBRAPA-SPI, Itaguaí, EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p.

DUBROVSKY, J.G.; PUENTE, M.E.; BASHAN, Y. *Arabidopsis thaliana* as a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp-245 on root hair growth. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, n.12, p.1657-1664, 1994.

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

DUNIWAY, J.M.; DURBIN, R.D. Some effects of *Uromyces phaseoli* on the transpiration rate and stomatal response of bean leaves. **Phytopathology**, v.61, p.114-119, 1971.

DUVEILLER, E.; DUBLIN, H.J. *Helminthosporium* leaf blights: spot blotch and tan spot. In: CURTIS, B.C.; RAJARAM, S.; MACPHERSON, G.H. (eds.). **Bread improvement and production**. FAO Plant Production and Protection Series. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2002.

EDER, J.; COSIO, E.G. Elicitors of Plant Defense Responses. **International Review of Cytology**, v.148, p.1–36, 1994.

ENEBAK, S.A.; CAREY, W.A. Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Disease**, v.84, p.306-308, 2000.

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J (Eds). **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, 1992. p.1-42.

FERNANDES, J.M.C.; PICININI, E.C. **Controlando as doenças de trigo na hora certa**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 1999. 3p.html. (Embrapa Trigo. Comunicado Técnico Online, 22). Disponível: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co22.htm.

FERREIRA, D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.38, n.2, p.109-112, 2014.

FERRO, H.M. **Bactérias endosporogências no manejo de doenças no algodoeiro**. 2009. 122p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, v.25, n.2, p.503-507, 2003.

FRANZENER, G. **Atividade antifúngica, produção de fitoalexinas em sorgo e soja e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* a partir da planta medicinal *Artemisia camphorata* (cânfora)**. 2002. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2002.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. **Science**, v.261, p.754-756, 1993.

GARAVAGLIA, B.; THOMAS, L.; GOTTIG, N.; ZIMARO, T. GAROFALO, C.G.; GEHRING, C.; OTTADO, J. Shedding light on the role of photosynthesis in pathogen colonization and host defense. **Communicative & Integrative Biology**, v.3, n.4, p.382–384, 2010.

GAYLER, S.; GRAM, T.E.E.S.; HELLE, W.R.; TREUTTER, D.; PRIESACK, E.A. Dynamical model of environmental effects on allocation to carbon-based secondary compounds in juvenile trees. **Annals of Botany**, v.101, p.1089–1098, 2008.

GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the “trade off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, v.18, p.363-371, 2004.

GODOY, C.V.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.209-215, 2001.

GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUFBEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K.H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, v.8, p.629-643, 1996.

GOUVEA, A.; KUHN, O.J.; MAZARO, S. M.; MAY-DE, M. L.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L.A.; FONSECA, V.C. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.4, p.527-533, 2009.

GOVINDAPPA, M.; RAVISHANKAR RAI, V.; LOKESH, S. Induction of resistance against *Cercospora* leaf spot in safflower by seed treatment with plant growth-promoting rhizobacteria. **Archives Of Phytopathology And Plant Protection**, v. 47, n.20, 2014.

GUERRA, A.M.N.M.; RODRIGUES, F.A.; LIMA, T.C.; GERGER, P.G.; BARROS, A.F.; SILVA, Y.C.R. Capacidade fotossintética de plantas de algodoeiro infectadas por ramulose e supridas com silício. **Bragantia**, v.73, n.1, p.50-64, 2014.

HALFELD-VIEIRA, B.A. ; VIEIRA JUNIOR, J. R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.8, 2006.

HALL, P.G.; KRIEG, N.R. Application of the indirect immunoperoxidase stain technique to the flagella of *Azospirillum brasilense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.7, n.2, p.433–435, 1984.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: RECHCIGL, N.A.; RECHCIGL, J.E. (Ed.). **Environmentally safe approaches to crop disease control**. Boca Raton: CRC - Lewis Publishers, 1997. p.177-199.

HAMMERSCHMIDT, T.R.; NUCLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p.73-82, 1982.

HEIL, M.; BALDWIN, I.T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, v.7, n.2, p.61-67, 2002.

HEIL, M. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p.137-146, 2001.

HEIL, M. Ecological costs of induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, n.4, p.345-350, 2002.

HEIL, M.; HILPERT, A.; KAISER, W.; LINSSENMAIR, E. Reduced growth and seed set following chemical induction of pathogen defence: does systemic acquired resistance (SAR) incur allocation costs? **Journal of Ecology**, v.88, n.4, p.645-654, 2000.

HELGASON, E.; OKSTAD, O.A.; CAUGANT, D.A.; JOHANSEN, H.A.; FOUET, A.; MOCK M.; HEGNA, I.; KOLSO A.B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*--one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.6, p.2627-2630, 2000.

HIRAGA, S; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y; MATSUI, H. A Large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, v.42, n.5, p.462-468, 2001.

HOLTON, T.A.; CORNISH, E.C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell**, v.7, p.1071-1083, 1995.

HUANG, C-J.; YANG, K-H.; LIU, Y-H.; LIN, Y-J; CHEN, C-Y. Suppression of southern corn leaf blight by a plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* C1L. **Annals of Applied Biology**, v.157, n.1, p.45-53, 2010.

HUANG, C-J.; WANG, T-K.; CHUNG, S-C.; CHEN, C-Y. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.38, n.1, p.82-88, 2005.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. Documentos 325.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil / Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola**. Rio de Janeiro, v.25, n.02, p.1-88, 2012.

IRITI, M.; FAORO, F. Fitness costs of chemically-induced resistance: double edged sword or (un)stable equilibrium? **Journal of Plant Pathology**, v.88, n.1, p.5-6, 2006.

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para controle de ferrugem asiática em soja**. 2009. 115p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2009.

KHANANM, N. N.; KIHARA, J.; HONDA, Y.; TSUKAMOTO, T.; ARASE, S. Studies on red light-induced resistance of broad bean to *Botrytis cinerea*: I. Possible production of suppressor and elicitor by germinating spores of pathogen. **Journal of General Plant Pathogen**, v.71, p.285-288, 2005.

KLOEPPER, J.W.; RYU, C-M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v.94, p.1259–1266, 2004.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.7-1, 2001.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, 2010 .

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. 138p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem, In: MAHESHWARI, D.K. (Ed), **Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems**, New York: Springer, 2011. p.37–59.

KUNZ, W.; SCHURTER, R.; MAETZKE, T. The Chemistry of Benzothiadiazole Plant Activators. **Pesticide Science**, v.50, n.4, p.275–282, 1997.

LAMB, C.J.; LAWTON, M.A.; DRON, M.; DIXON, R.A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, v.56, n.2, p.215–224, 1989.

LANCIONI, P. **Studies on biotic and abiotic elicitors inducing defense responses in tomato**. 2009. 125p. Tese (Doutorado) - Università di Bologna, Bologna, 2009.

LEUBNER-METZGER, G.; MEINS, F. Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2), In: **Pathogenesis-related proteins in plants**. DATTA, S.K.; MMUTHUKRISHNAN, S. (Eds) CRC Press, 1999. p.49–76

LAWTON, K.A.; FRIEDRICH, L.; HUNT, M.; WEYMANN, K.; DELANEY, T.; KESSMANN, H.; STAUB, T.; RYALS, J. Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. **The Plant Journal**, v.10, p.71-82, 1996.

LEMONS, J.M. **Resposta de cultivares de trigo à inoculação em sementes com *Azospirillum brasilense*, e à adubação nitrogenada em cobertura**. 2011. 62p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2011.

LENZ, G.; BALARDIN, R.S.; DALLA CORTE, G.; MARQUES, L.N.; DEBONA, D. Escala diagramática para avaliação de severidade de mancha-parda em arroz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.4, p.752-758, 2010.

LI, W.L.; FARIS, J.D.; MUTHUKRISHNAN, S.; LIU, D.J.; CHEN, P.D.; GILL, B.S. Isolation and characterization of novel cDNA clones of acidic chitinases and β -1,3-glucanases from wheat spikes infected by *Fusarium graminearum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v.102, p.353–362, 2001.

LIAN, B.; ZHOU, X.; MIRANSARI, M.; SMITH, D.L. Effects of salicylic acid on the development and root nodulation of soybean seedlings. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.185, n.3, p.187–192, 2000.

LIANG, X.W.; DRON, M.; SCHMID, J.; DIXON, R.A.; LAMB, C.J. Developmental and environmental regulation of a phenylalanine ammonia-lyase-beta-glucuronidase gene fusion in transgenic tobacco plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, n.23, p.9284–9288, 1989.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S.P.; KAPLAN, N.O. (Eds.), **Methods in Enzymology**. San Diego: Academic Press, 1987. v.48, p.350–382.

LIMA, O.D.R. **Efeito de isolados de *Bacillus* spp. e *Trichoderma* spp. No crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* agente causal da fusariose do tomateiro**. 2012. 63p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Maranhão, São Luis, 2012.

LYON, G.D.; NEWTON, A.C. Do resistance elicitors offer new opportunities in integrated disease control strategies? **Plant Pathology**, v.46, p.636-641, 1997.

MADHUSUDHAN, K.N.; DEEPAK, S.A.; PRAKASH, H.S.; AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S.; RAKWAL, R. Acibenzolar-S-Methyl (ASM)-induced resistance against tobamoviruses involves induction of RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and alternative oxidase (AOX) genes. **Journal Crop Science Biotechnology**, v.11, n.2, p.127-134, 2008.

MAPA, 2015. Brasília, 12 abr 2015. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>. Acesso em 12/04/2015

MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S. & BALDANI, J.I. Fixação biológica de Nitrogênio: **Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 34p. Série Documentos. Embrapa Agrobiologia.

MARQUES, N.; LENZ, G.; COSTA, I.F.D.; GUEDES, J.V.C.; BIGOLIM, M.; OLIVEIRA, A.C.B. Reação de germoplasma de girassol à mancha de septoria causada por

Septoria helianthi L. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.2, p.311-315, 2011.

MARTINS, E.M.F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.387-410.

MEHTA, Y.R. **Doenças do trigo e seu controle**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres Ltda., 1978. 190 p.

MEHTA, Y.R. CAMPOS, L.A.C.; GUZMAN, E. Resistência genética de cultivares de trigo a *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.455-459, 1996.

MELO, I.S. Rizobactérias Promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. p.87-110.

MÉTRAUX, J-P. Induced defenses in plants. In: RODRIGUES, F.A.; ROMEIRO, R.S. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Viçosa: Suprema, 2007. cap.1, p.7-24.

MONOT, C.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; SILUÉ, D. Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var *botrytis*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by avirulent isolates. **Biological Control**, v.24, p.75-81, 2002.

MONTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, v.35, n.5, p.285-294, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª Ed. Lavras, UFLA, 2006. 729p.

MYRESIOTIS, C.K.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOUA, E. Enhanced root uptake of acibenzolar-S-methyl (ASM) by tomato plants inoculated with selected *Bacillus* plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Applied Soil Ecology**, v.77, p.26–33, 2014.

MYRESIOTIS, C.K.; KARAOGLANIDIS, G.S.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOUA, E. Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. **Pest Management Science**, v.68, p.404-411, 2012.

NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, v.107, p.19-28. 1992.

NIU, D-D., LIU, H-X., JIANG, C-H., WANG, Y-P., WANG, Q-Y., JIN, H-L., GUO, J-H. The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and

jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.24, n.5, p.533-542, 2011.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

ONGENA, M.; DAAYF, F.; JACQUES, P.; THONART, P.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C.; CORNÉLIS, P.; KOEDAM, N.; BÉLANGER, R.R. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induce resistance over siderophores and antibiosis. **Plant Pathology**, v.48, p.66-76, 1999.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n.1, p.19-28, 2001.

PANG, Z.; KANG, Y.-N.; BAN, M.; ODA, M.; KOBAYASHI, R.; OHNISHI, M.; MIKAMI, B. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of endo-1,3- β -glucanase from *Arthrobacter* sp. **Acta Crystallographica**, v.61, p.68-70, 2004.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.1, p.417-453.

PASCHOLATI, S.F. & LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência à doenças. In: LUZ, W.C. (Ed.). **Revisão Anual de Patologia de Plantas. Vol. II**. Passo Fundo, RAPP, p.1-52. 1994.

PEREIRA, L.M.; RESENDE, M.L.V.; MATHIONI, S.M.; CAMPOS, M.A.; JUNIOR, P.M.R. Protective effect and expression of defense-related ESTs induced by acibenzolar-S-methyl and a phosphorylated mannan oligosaccharide-based product against *Moniliophthora perniciosa* in *Theobroma cacao*. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.12, p.1311-1317, 2013.

RAJARAM, S.; BORLAUG, N.E.; VAN GINKRL, M. CIMMYT international wheat breeding. In: B.C. Curtis, S. Rajaram and H. Gómez Macpherson (eds.). **Bread improvement and production**. FAO Plant Production and Protection Series. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2002.

REGENTE, M.C.; OLIVA, C.R.; FELDMAN, M.L.; CASTAGNARO, A.P.; CANAL, L. A sunflower leaf antifungal peptide active against *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.178-182, 1997.

REIS, E.M. Integrated disease management: The changing concept of controlling head blight and spot blotch. In: SAUNDERS, D.A.; HETTEL, G.P. (Eds) **Wheat in Heat-Stressed Environments: Irrigated, Dry Areas and Rice-Wheat Systems**. Mexico: CIMMYT. p.165-177, 1991.

REIS, E.M.; CASA, R.T.; FORCELINI, C.A. Doenças do trigo (*Triticum aestivum* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO,

L.E.A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das Plantas Cultivadas**. 4ª. Ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, p.675 – 685.

RIBEIRO JUNIOR, P.M.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; CAVALCANTI, N.F.R.; AMARAL, D.R.; PÁDUA, M.A. Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb. em mudas de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.4, p.629-636, 2006.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.62, p.167–173, 2003.

RIOS, J.A. **Resistência induzida na interação trigo - *Pyricularia oryzae* e elaboração de uma escala diagramática para estimar a severidade da brusone**. 2012. 47p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

RITTER, H.; SCHULZ, G.E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **The Plant Cell**, v.16, p.3426–3436, 2004.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, v.33, n.2, 2007.

ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência de plantas a patógenos**. Viçosa: UFV. Cadernos Didáticos, n.56, 1999.

RÖSLER, J.; KREKEL, F.; AMRHEIN, N.; SCHMIDT, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, v.113, p.175-179, 1997.

RYALS, J.A.; NEUENSCHWANDER, U.H.; WILLITS, M.G.; MOLINA, A.; STEINER, H.Y.; HUNT, M.D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v.8, p.1809-1819, 1996.

SAHA, A.; MAHISH, C.; POIRAH, I.; GHOSH, A.; MUKHERJEE, A.; MITRA, A.K. Antagonistic relationship between *Bacillus cereus* and *Bipolaris* sp. in the leaf spot disease of *Basella alba*: a novel finding. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v.3, n.4, p.30-41, 2013.

SANTOS, H.A.A.; PRIA, M.D.; SILVA, O.C.; MIO, L.L.M. Controle de doenças do trigo com fosfitos e acibenzolar-s-metil isoladamente ou associados a piraclostrobina + epoxiconazole. **Semina: Ciências Agrárias**, v.32, n.2, p.433-442, 2011.

SANTOS, D.; GUIMARÃES, V.F.; KLEIN, J.; FIOREZE S.L.; MACEDO JUNIOR, E.K. Cultivares de trigo submetidas a déficit hídrico no início do florescimento, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.8, p.836–842, 2012.

SANTOS, H.G.; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C.; OLIVEIRA, V.A.; LUMBRERAS, J.F.; COELHO, M.R.; ALMEIDA, J.A.; CUNHA, T.J.F.; OLIVEIRA, J.B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353 p.

SANTOS, F.; PEÑAFLORES, M.F.G.V.; PARÉ, P.W.; SANCHES, P.A.; KAMIYA, A.C.; TONELLI, M.; NARDI, C.; BENTO, J.M.S. A novel interaction between plant-beneficial rhizobacteria and roots: colonization induces corn resistance against the root herbivore *Diabrotica speciosa*. **PLoS ONE**, v.9, n.11, 2014.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; DUTRA, M.R.; CAMPOS, V.P. Aumento da resistência de cultivares de tomate a *Meloidogyne incognita* com aplicações do acibenzolar-S-metil. **Nematologia Brasileira**, v.28, n.2, p.199-206, 2004.

SILVA, E.G.; MOURA, A.B.; DEUNER, C.C.; FARIAS, D.R. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Ceres**, v.55, n.5, p.377-383, 2008.

SIMS, D.A.; GAMON, J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v.81, p.337–354, 2002.

SONNEMANN, I.; STRICHER, N.M.; WOLTERS, V. Root associated organisms modify the effectiveness of chemically induced resistance in barley. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, n.10, p.1837–1842, 2005.

SOUZA, V.Q.; NARDINO, M.; BONATO, G.O.; BAHRY, C.A.; CARON, B.O.; ZIMMER, P.D.; SCHMIDT, D. Desfolha em diferentes estádios fenológicos sobre características agrônômicas em trigo. **Bioscience Journal**, v.29, n.6, p.1905-1911, 2013.

SOUZA, S.R.; DAROS, E.; FRAGOSO, R.B.; RUARO, L. Efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção de cana-de-açúcar infectadas pelo raquitismo das soqueiras. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.2, n.4, p.21-27, 2011.

SOYLU, S.; BAYSALL, Ö.; 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**, v.165, n.5, p.1069–1075, 2003.

STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.11, p.16-21, 1999.

STANGARLIN, J.R.; SCHULZ, D.G.; FRANZENER, G.; ASSI, L. SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; KUHN, O.J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.91-98, 2010.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.487-506, 2004.

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. **Soil and Tillage Research**, v.72, n.2, p.107-123, 2003.

SYSTAT SOFTWARE, 2013. **SigmaPlot 12.5 User's Guide**, Systat Software Inc., 443 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal. Metabólitos secundários e defesa vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 3ª ed., 2004. cap.13, p.309-334.

TEDESCO, M.J.; GIANELO, C.; BISSANI, C.A. **Análises de solo, planta e outros materiais**. Boletim Técnico, Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, n.5, 1995.

THAKUR, M.; SOHAL, B.S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: A Review. **Biochemistry**, v.2013, p.1-10. 2013.

TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

TOILLIER, S.L.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; BALDO, M.; VIECELLI, C.A.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.1, p.99-110, 2010.

TOLEDO, M.V. Uso dos medicamentos homeopáticos sulphur e ferrum sulphuricum no controle da doença pinta preta em tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, 2009.

TORTORA, M.L.; DÍAZ-RICCI, J.C.; PEDRAZA, R.O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v.356, n.1-2, p.279-290, 2011.

TRILLER, C.; MEHTA, Y.R. Efeito da idade da folha bandeira de trigo na expressão de resistência a *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, v.23, p.167-169, 1997.

UKNES, S.; MAUCH-MANI, B.; MOYER, M.; POTTER, S.; WILLIAMS, S.; DINCHER, S.; CHANDLER, D.; SLUSARENKO, A.; WARD, E.; RYALS, J. Acquired resistance in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.4, p.645-656, 1992.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

USDA. **World Agricultural Supply and Demand Estimates (WASDE-540)**. Table: World Wheat Supply and Use. USDA: Washington, DC; 2015. 38p.

VALLAD, G.E.; GOODMAN, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, v.44, p.1920-1934, 2004.

VAN LOON, L.C.; VAN STRIEN, E.A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p.85-97, 1999.

VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETRESE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.

VAN PEER, R.; NIEMANN, G.J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. **Phytopathology**, v.81, p.728-734, 1991.

VERHAGEN, B.W.M.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. Induced disease resistance signaling in plants. **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**, v.3, p. 334–343, 2006.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; MOHR, U.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and b-1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. **Journal Plant Physiology**, v.143, p.337–43, 1994.

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a b-1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, v.189, p.60–69, 1993.

WALTERS, D.; HEIL, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.71, p.3-17, 2007.

WALTERS, D.R.; PATERSON, L.; WALSH, D.J.; HAVIS, N.D. Priming for plant defense in barley provides benefits only under high disease pressure. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.73, n.4–5, p.95–100, 2008.

WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX J-P.; RYALS, J.A. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v.3, p.1085-1094, 1991.

WAUGH, D.L.; FITTS, J.W. **Estudos para interpretação de análises de solo: de laboratório e em vasos**. Washington: AID, 1966. 33 p. (Boletim Técnico, 3).

WHETTEN, R.; SEDEROFF, R. Lignin biosynthesis. **Plant Cell**, v.7, p.1001–1013, 1995.

WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**, v.12, p.197-205, 1990.

WIT, P.J.G.M. . How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.64, n.21, p.2726-2732, 2007.

XIANG, L.; MOORE, B.S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.4286-4289, 2005.

YASUDA, M.; ISAWA, T.; SHINOZAKI, S; MINAMISAWA, K.; NAKASHITA, H. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.73, n.12, p.2595-2599, 2009.

ZANARDO, N.M.T. **Purificação parcial de frações de *Saccharomyces cerevisiae* indutoras de resistência contra antracnose e avaliação de agentes bióticos (*S. cerevisiae* e Agro-Mos®) e abiótico (Bion®) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematóide (*Meloidogyne incognita* x pepineiro e organismo não alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja)**. 2009. 98p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

ZHANG, S.; KINGKANG, L.I.; KEPING, M.A.; CHEN, L. Temperature-dependent gas exchange and stomatal/non-stomatal limitation to CO₂ assimilation of *Quercus liaotungensis* under midday higher irradiance. **Photosynthetica**, v.39, p.383-388, 2001.

ZIMMERLI, L.; JAKAB, G.; MÉTRAUX, J.P.; MAUCH-MANI, B. Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by β -aminobutyric acid. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v.97, p.12912-12925, 2000.