

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**Emanuele Junges**

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEJJOEIRO POR  
*Trichoderma harzianum* E *Bacillus subtilis***

Santa Maria, RS  
2016

**Emanuele Junges**

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO POR *Trichoderma harzianum* E *Bacillus subtilis***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Agronomia**

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS  
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Junges, Emanuele  
Indução de resistência à antracnose em feijoeiro por  
Trichoderma harzianum e Bacillus subtilis / Emanuele  
Junges.-2016.  
63 f.; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, RS, 2016

1. Colletotrichum lindemuthianum 2. Phaseolus  
vulgaris 3. Resistência Sistêmica Induzida 4. Controle  
biológico I. Muniz, Marlove Fátima Brião II. Título.

---

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Emanuele Junges. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.


E-mail: emanuele.junges @iffarroupilha.edu.br

**Emanuele Junges**

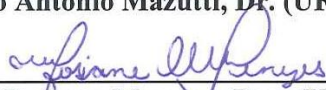
**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO POR *Trichoderma harzianum* E *Bacillus subtilis***

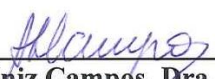
Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria/RS (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Agronomia**

**Aprovado em 22 de fevereiro de 2016:**

  
\_\_\_\_\_  
**Marlove Fátima Brião Muniz, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
**Marcio Antonio Mazutti, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Josiane Pacheco Menezes, Dra. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Ângela Diniz Campos, Dra. (Embrapa)**

  
\_\_\_\_\_  
**Marília Lazarotto, Dra. (UFRGS)**

Santa Maria, RS  
2016

## DEDICATÓRIA

À minha querida mãe, de quem sinto imensa saudade e quem me deu os melhores exemplos!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e fé para superar desafios.

À Universidade Federal de Santa Maria, onde cursei duas graduações, mestrado e o doutorado e que forneceu os meios para uma formação acadêmica plena.

À professora Dr<sup>a</sup> Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação e participação fundamental na construção deste trabalho.

À Dr<sup>a</sup> Ângela Diniz Campos e a sua equipe de trabalho, Renê e Fabiane, do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado, pela acolhida, pelos ensinamentos transmitidos e por tornar possível a realização deste trabalho

Ao Dr Marcio Mazutti e ao colega Thiarles Brum, pelo conhecimento e experiências compartilhadas e agradeço por não medirem esforços para a realização de um bom trabalho.

À equipe de trabalho do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria: Caciara, Clair, Ricardo M., Ricardo F., Leise, Geísa, Juceli, Jéssica Rabuske, Tales, Victoria, Jéssica Rolim, Rosa, Daniele e à queridíssima Maria. Aos recém chegados, Amanda, Camila, Felipe, Jaqueline e Renata desejo sucesso e sorte!

Meu obrigado especial à Pâmela Oruoski, por toda a ajuda, dedicação e responsabilidade em todas as etapas deste trabalho.

Às queridas Patrícia Migliorini e Jayana Nicareta que me acolheram na estadia em Pelotas e dividiram comigo muitas angustias mas também muitos momentos felizes.

Aos colegas de trabalho do Instituto Federal Farroupilha do câmpus Júlio de Castilhos, onde iniciei a jornada dupla de estudo e trabalho, e do câmpus São Vicente do Sul, onde maior parte dessa jornada foi traçada. Agradeço pela parceria, por ser possível conciliar algumas atividades e por compreenderem as dificuldade que tive nesse período. Aos colegas do IFPR, Câmpus Assis Chateaubriand, mesmo que a convivência tendo sido breve são hoje grandes amigos.

Aos meus queridos alunos, dos campus de JC, Assis e SVS, pois precisaram entender os momentos de ausência e excesso de atividades, quando eles também demandavam atenção.

A todos que de um modo ou outro fizeram parte desta caminhada, estando ao meu lado e oferecendo apoio.

Muito obrigada!

**“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”**

**Dalai Lama**

## RESUMO

# INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO POR *Trichoderma harzianum* E *Bacillus subtilis*

AUTORA: EMANUELE JUNGES  
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

O uso massivo de produtos químicos para controle de doenças em plantas causa inúmeros impactos negativos no sistema de produção agrícola, sobre organismos não alvo, consumidores, agricultores e o ambiente. Diante disso, a utilização de organismos de controle biológico, como *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, capazes de agir no controle de fitopatógenos e/ou induzir resistência em plantas, se caracteriza como uma ferramenta importante e com muito potencial ainda a ser explorado. O objetivo deste trabalho foi identificar metabólitos produzidos por estes organismos cultivados em meio líquido e testar a utilização destes filtrados de cultura, bem como dos organismos vivos, aplicados via semente ou foliar, no controle da antracnose em feijoeiro. Os organismos de controle biológico *T. harzianum* e *B. subtilis* foram cultivados em meio de cultura líquido por 96h e fotoperíodo de 12h. Após a incubação, os meios foram filtrados em membrana milipore para extração dos esporos e das células bacterianas. Os metabólitos foram extraídos com quatro solventes orgânicos, etanol, metanol, acetato de etila e hexano e submetidos à cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa e gerados cromatogramas para cada organismo e solvente utilizado. A avaliação da indução de respostas de defesa em plantas foi realizada na cultivar Minuano, com reação de suscetibilidade ao patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. As plantas de feijão foram avaliadas quanto ao índice de doença, área abaixo da curva de progresso da doença e às alterações nas atividades de peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e AIA – oxidase, assim como determinada a massa fresca e seca das plantas em dois momentos, antes e após a inoculação do patógeno desafiante. A identificação cromatográfica dos compostos presentes nos filtrados de cultura demonstrou que ambos os organismos testados produzem ácidos graxos e oxilipinas em meio líquido, com ação antifúngica e indutoras de respostas de defesa, respectivamente. Nas avaliações realizadas em plantas de feijão, tanto *T. harzianum* quanto *B. subtilis*, reduziram a severidade e o progresso da doença, assim como produziram acréscimos significativos nas atividades das isoenzimas peroxidase e  $\beta$ -1,3-glucanase após a inoculação do patógeno, indicando a ativação da resistência induzida. As respostas de indução não comprometeram o acúmulo de massa seca das plantas, o que demonstra não haver gasto energético capaz de comprometer o crescimento das plantas. As melhores respostas para *T. harzianum* são observadas nas aplicações foliares, seja de suspensão de esporos ou filtrado de cultura, já para *B. subtilis*, as melhores respostas são observadas na aplicação foliar do filtrado de cultura. Pela facilidade de produção, filtrados de cultura de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* podem originar bioprodutos para uso agrícola.

**Palavras chave:** *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phaseolus vulgaris*. Resistência Sistêmica Induzida. Controle biológico.



## ABSTRACT

### INDUCED RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN BEAN BY THE *Trichoderma harzianum* AND *Bacillus subtilis*

AUTHOR: EMANUELE JUNGES  
ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

The massive use of chemicals to control plant diseases cause numerous negative impacts on agricultural production system on non-target organisms, consumers and farmers. Therefore, the use of biological control organisms such as *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*, able to act on the control of plant pathogens and / or induce resistance in plants is characterized as an important and with great potential yet to be explored tool. The objective of this study was to identify metabolites produced by these organisms grown in liquid medium and test the use of filtered culture and of living organisms, applied via seed or leaf in the control of anthracnose in beans. Biological control organisms *T. harzianum* and *B. subtilis* were grown in liquid culture medium for 96 h and 12 h photoperiod. After incubation, the media were filtered through Millipore membrane extraction of the bacterial cells and spores. Metabolites were extracted with four organic solvents, ethanol, methanol, ethyl acetate and hexane and subjected to gas chromatography and mass spectrometry and the chromatograms generated for each organism and solvent used. The evaluation of the induction of defense responses in plants was held in cultivating Minuano with susceptibility reaction to the pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. The bean plants were evaluated for disease index, area under the disease progress curve and changes in peroxidase activity,  $\beta$ -1,3-glucanase and IAA - oxidase, as well as certain fresh and dry weight of plants in two stages, before and after inoculation of the challenging pathogen. The chromatographic identification of compounds from culture filtrates showed that both test organisms produce fatty acids and oxylipins in liquid medium with antifungal action and inducing defense responses, respectively. In the assessments performed in bean plants, both *T. harzianum* as *B. subtilis* reduced the severity and progress of the disease, and produced significant increases in the activities of peroxidase isozymes and  $\beta$ -1,3-glucanase after inoculation of the pathogen, indicating the activation of induced resistance. The induction of responses did not affect the dry mass of the plants, which shows no energy expenditure that could affect plant growth. The best answers to *T. harzianum* are observed in foliar applications, either spore suspension or culture filtrate, as for *B. subtilis*, the best answers are observed in the foliar application of culture filtrate. For ease of production, culture filtrates of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis* can give bioproducts for agricultural use.

**Keywords:** *Colletotrichum lindemuthianum*. *Phaseolus vulgaris*. Induced systemic resistance. Biological control.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1 – Variação na concentrações de sacarose, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura, em meio de cultivo para o crescimento de <i>Trichoderma harzianum</i> avaliado em plântulas de feijão ..	24
Tabela 2 – Identificação dos componentes presentes no filtrado de cultura de <i>Trichoderma harzianum</i> extraídos com quatro solventes, hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) e unidade área. (UA) ..	26
Tabela 3 – Avaliação da AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença) e do Índice de Doença de McKinney (%) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Trichoderma harzianum</i> via semente ou foliar, determinada antes e depois da inoculação do patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ..	27
Tabela 4 – Avaliação da atividade da peroxidase (UE mg <sup>-1</sup> tecido) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Trichoderma harzianum</i> via semente ou foliar, determinada antes e após a inoculação do patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . ..	28
Tabela 5 – Avaliação da atividade da β-1,3-glucanase (UE mg <sup>-1</sup> tecido) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Trichoderma harzianum</i> via semente ou foliar, determinada antes e após a inoculação do patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . ..	29
Tabela 6 – Teores de proteína (mg/g de tecido) e atividade da AIA oxidase (μmol min <sup>-1</sup> de AIA degradado/g tecido) em feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Trichoderma harzianum</i> via semente ou foliar e inoculadas com o patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . ..	30
Tabela 7 – Massa fresca e seca de plantas (mg planta <sup>-1</sup> ) de feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Trichoderma harzianum</i> via semente ou foliar e inoculadas com o patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . ..	30

### ARTIGO 2

Tabela 1 – Variação na concentrações de sacarose, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura, em meio de cultivo para o crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> avaliado em plântulas de feijão ..	46
Tabela 2 – Identificação dos componentes presentes no filtrado de cultura de <i>Bacillus subtilis</i> extraídos com quatro solventes, hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) e unidade área. (UA) ..	48
Tabela 3 – Avaliação da AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença) e do Índice de Doença de McKinney (%) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Bacillus subtilis</i> via semente ou foliar, determinada antes e depois da inoculação do patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> ..	49
Tabela 4 – Avaliação da atividade da peroxidase (UE mg <sup>-1</sup> tecido) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Bacillus subtilis</i> via semente ou foliar, determinada antes e após a inoculação do patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . ..	50
Tabela 5 – Avaliação da atividade da β-1,3-glucanase (UE mg <sup>-1</sup> tecido) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Bacillus subtilis</i> via semente ou foliar, determinada antes e após a inoculação do patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . ..	51

Tabela 6 – Teores de proteína (mg/g de tecido) e atividade da AIA oxidase ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ de AIA degradado/g tecido) em feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Bacillus subtilis</i> via semente ou foliar e inoculadas com o patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . ..	52
Tabela 7 – Massa fresca e seca de plantas ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) de feijão cultivar Minuano tratadas com <i>Bacillus subtilis</i> via semente ou foliar e inoculadas com o patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> . ..	53

## DISCUSSÃO

Tabela 1 – Contrastes ortogonais (Y1, Y2, Y3 e Y4): Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice de doença de McKinney (ID), atividade específica de peroxidase (AEPO), atividade específica de $\beta$ -1,3-glucanase (AEBE), teor de proteína (PROT), AIA oxidase (AIAOXI), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPS), massa fresca de raiz (MFRA), massa seca de raiz (MSRA) em plantas de feijão inoculadas com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , tratadas com <i>Trichoderma harzianum</i> ou <i>Bacillus subtilis</i> organismo vivo ou bioproduto produzido a partir de filtrado de cultura, aplicados via semente ou foliar.....	60
---	----

## SUMÁRIO

1	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	13
2	<b>ARTIGO 1 – INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEJJOEIRO POR BIOPRODUTOS DE <i>Trichoderma harzianum</i></b> .....	15
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
	<b>METODOLOGIA</b> .....	18
	Microrganismos .....	18
	Atividade biológica de filtrados de cultura sobre plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> ...	18
	Fermentação de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	19
	Procedimento de extração .....	19
	Procedimento e equipamentos para cromatografia .....	19
	Ensaio para determinação da indução de resistência em feijoeiro .....	20
	Aplicação dos tratamentos via semente: .....	20
	Aplicação dos tratamentos via foliar: .....	20
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	24
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	32
	<b>REFERENCIAS</b> .....	33
3	<b>ARTIGO 2 – INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEJJOEIRO POR BIOPRODUTOS DE <i>Bacillus subtilis</i> APLICADOS VIA SEMENTE OU FOLIAR</b> .....	36
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	38
	<b>METODOLOGIA</b> .....	39
	Microrganismos .....	39
	Atividade biológica de filtrados de cultura sobre plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> ...	39
	Fermentação de <i>Bacillus subtilis</i> .....	40
	Procedimento de extração .....	40
	Procedimento e equipamentos para cromatografia .....	40
	Determinação da indução de resistência em feijoeiro .....	41
	Aplicação dos tratamentos via semente .....	41
	Aplicação dos tratamentos via foliar .....	41
	Coleta do material vegetal para análise .....	41
	Inoculação do patógeno <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	42
	Avaliação da área abaixo da curva de progresso da doença e índice de doença .....	42
	Determinação da atividade da peroxidase .....	43
	Determinação da $\beta$ -1,3-glucanase .....	44
	Determinação do teor de proteína .....	44
	Determinação da atividade de AIA – oxidase .....	44
	Procedimento estatístico .....	45
	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
	Atividade biológica de filtrados de cultura sobre plântulas de <i>Phaseolus vulgaris</i> ...	45
	Identificação dos compostos presentes no filtrado de cultura .....	46
	Determinação da indução de resistência em feijoeiro .....	49
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	54
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	62

## 1 APRESENTAÇÃO

A cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) está entre as de maior importância econômica e social para a população brasileira. O feijão é considerado um alimento essencial da dieta pelo seu conteúdo em fibras e em ácido fólico (SICHIERI, et al. 2000). Aliado à isso, ressalta-se a importância econômica pelo emprego de mão de obra e aptidão para agricultura familiar.

O impacto de doenças na cultura do feijão pode ser determinante para o sucesso da cultura. Perdas de produção pela ocorrência de doenças são relatadas de 60 até 100%, principalmente pela ação dos fungos *Colletotrichum lindemuthianum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* e *Fusarium solani* (HAGEDORN; INGLIS, 1986).

O uso massivo de produtos químicos para controle de doenças causa, entre outros malefícios, intoxicações e contaminações. Além da seleção de linhagens resistentes, desequilíbrio na população microbiana do sistema, reduzindo a biodiversidade e eliminando organismos benéficos responsáveis pela ciclagem de nutrientes (BETTIOL; MORANDI, 2009). Alguns patógenos não são passíveis de controle químico, como aqueles que colonizam o solo e atacam a semente e plântulas jovens em pré e pós-emergência, reforçando a necessidade de formas alternativas de controle.

Entre os organismos de controle biológico de doenças de plantas se destacam *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*. *Trichoderma* spp. é um gênero fúngico que compreende diversas espécies com conhecido potencial de controle sobre patógenos. Tem ampla adaptação se inoculado no solo, colonizando principalmente a rizosfera das plantas e conferindo proteção desde a semente até a planta adulta. De mesmo modo, *Bacillus subtilis* se destaca por atuar em diversos patossistemas e, pela ação como promotor de crescimento e indutor de resistência em diversas plantas. Ambos os organismos adaptam-se à produção massal e se desenvolvem em meio de cultivo viabilizando e ampliando as possíveis formas de microbiolização.

*Trichoderma* spp. se destaca como biocontrolador em diversos patossistemas (CARVALHO et al., 2011; FIGUEIRÊDO et al., 2010; VINALE et al., 2008). Assim como aumenta o crescimento e desenvolvimento de plantas, aumenta a disponibilidade de nutrientes, melhora a produção agrícola e induz a resistência a doenças (JEGATHAMBIGAI et al., 2010).

Dentre os gêneros mais estudados de rizobactérias promotoras de crescimento, destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e rizóbios (ARAÚJO, 2008). A espécie

*Bacillus subtilis* atua no biocontrole de fitomoléstias de forma direta ou indireta (RYU et al., 2004; ONGENA et al., 2007; LEELASUPHAKUL et al., 2008). O antagonismo direto exercido contra fitopatógenos ocorre através de antibiose, síntese de substâncias antimicrobianas, parasitismo, competição por espaço e nutrientes e a síntese de compostos voláteis (LEELASUPHAKUL et al., 2008).

*Bacillus subtilis* pode atuar na indução de resistência sistêmica adquirida de maneira direta ou através de substâncias produzidas, proporcionando uma resposta sistêmica ao ataque de patógenos (LANNA FILHO et al., 2010).

Diante deste contexto, a utilização de fungos e bactérias capazes de atuar na indução de resistência e redução da severidade de doenças ganha destaque especial, pois permite a redução da utilização de agrotóxicos, proteção das plântulas em fase inicial, colonização do solo rizosférico, e proteção em várias fases do ciclo de cultivo.

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi identificar compostos bioativos presentes em filtrados de cultura de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, testar a aplicação via semente ou foliar de suspensão de células viáveis ou filtrado de culturas, no controle da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, em plantas de feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris* e avaliar o efeito da aplicação dos tratamentos no crescimento vegetal.

## 2 ARTIGO 1 – INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO POR BIOPRODUTOS DE *Trichoderma harzianum*

### RESUMO

*Trichoderma harzianum* é um organismo de controle biológico com ação comprovada em vários patossistemas, mas que ainda tem sua eficiência comprometida por problemas na formulação dos produtos, interação com a planta ou o patógeno. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar metabólitos secundários produzidos por *Trichoderma harzianum* em meio líquido e avaliar o potencial de bioprodutos a base de células vivas e caldo fermentado, aplicados via semente ou foliar, quanto à capacidade de induzir resistência em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). *Trichoderma harzianum* foi cultivado em meio de cultura líquido, do qual foram extraídos os metabólitos produzidos com quatro solventes orgânicos. A identificação dos componentes foi realizada por cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa. Na cultivar de feijão “Minuano” foram realizadas as aplicações dos tratamentos via semente ou foliar e avaliada quanto ao índice de doença, área abaixo da curva de progresso da doença e às alterações nas atividades de peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e AIA – oxidase, quanto à massa fresca e seca das plantas na presença ou ausência do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. A identificação cromatográfica dos metabólitos demonstrou que o organismo testado produz ácidos graxos em meio líquido com ação antifúngica e indutores de respostas de defesa em plantas, como o ácido linoleico e ácido oleico. Nas avaliações realizadas em planta observaram-se acréscimos significativos na atividade específica de peroxidase e  $\beta$ -1,3-glucanase após a inoculação do patógeno, indicando a ativação da resistência induzida. As respostas de indução não comprometeram o acúmulo de massa seca das plantas. A aplicação foliar, tanto do organismo vivo como do filtrado de cultura, demonstram ser mais eficientes para indução de resistência. O uso de *T. harzianum* diminuiu a severidade da doença e tem potencial para controlar a antracnose do feijoeiro e/ou fazer parte de programas de manejo integrado da doença.

**Palavras chave:** *Phaseolus vulgaris*.  $\beta$ -1,3-glucanase. Peroxidase. Controle biológico,

**INDUCED RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN BEAN BY THE *Trichoderma harzianum* APPLIED VIA SEED OR LEAF**

**ABSTRACT**

*Trichoderma harzianum* is a biological control organism with a proven action in several pathosystems but still has its efficiency compromised by problems in the formulation of products, interaction with the plant and the pathogen. Thus, the objective of this study was to identify secondary metabolites produced by *Trichoderma harzianum* in liquid medium and evaluate the potential of bioproducts the living cell-based and fermented broth, applied via seed or leaf, as the ability to induce resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Trichoderma harzianum* was grown in liquid culture, which produced four metabolites were extracted organic solvents. Identification of components was conducted by gas chromatography and mass spectrophotometry. In bean cultivar "Minuano" applications of treatments via seed or leaf were performed and evaluated for disease index, area under the disease progress curve and changes in peroxidase activity,  $\beta$ -1,3-glucanase and AIA - oxidase, as the fresh and dry weight of plants in the presence or absence of the pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. Chromatographic identification of metabolites showed that the tested body produces fatty acids in a liquid medium with antifungal action and inducing defense responses in plants, such as linoleic acid and oleic acid. In the assessments performed in the plant were observed significant increases in the specific activity of peroxidase and  $\beta$ -1,3-glucanase after inoculation of the pathogen, indicating the activation of induced resistance. The induction of responses did not affect the dry matter accumulation of plants. Foliar application of both the living organism as the culture filtrate, prove to be more efficient for induction of resistance. The use of *T. harzianum* decreased disease severity and has the potential to control bean anthracnose and/or be part of an integrated pest management programs of the disease.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. Beta-1, 3-glucanase. Peroxidase. Biological control.



## INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante cultura agrícola, se caracterizando como fonte de proteína e fibras para alimentação humana. Entre as doenças de maior ocorrência nesta cultura está a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Scrib. capaz de reduzir a produção e a qualidade dos grãos (CHIORATO et al., 2006).

Indução de resistência se refere à ativação dos mecanismos latentes de resistência de uma planta por meio de agentes externos bióticos ou abióticos. Essa ativação pode ocorrer de maneira localizada ou sistêmica e pode durar períodos de tempo variáveis (BEDENDO; MASSOLA; AMORIM, 2011).

A indução de respostas de defesa em plantas está associada, em grande parte, à produção de proteínas relacionadas a patogênese, enzimas líticas como  $\beta$ -1,3-glucanase e enzimas oxidativas como peroxidase, entre outros compostos (ALMAGRO et al., 2009). A eficácia destas respostas de defesa, muitas vezes, determina se as plantas são suscetíveis ou resistentes à infecção patogênica.

Fungos benéficos como *Trichoderma* spp. podem atuar no controle de doenças em plantas, seja pela habilidade de inibir diretamente os patógenos, mas também colonizar superfícies radiculares e o solo rizosférico, aumentar o crescimento e desenvolvimento da planta, aumentar a disponibilidade de nutrientes, melhorar a produção agrícola e induzir a resistência a doenças (JEGATHAMBIGAI et al., 2010; VINALE et al., 2008). A estimulação das defesas da planta por *Trichoderma* spp. foi associada a níveis elevados de produção de proteínas relacionadas com patogênese (PR), acumulação de fitoalexinas em plantas e sinalizações nas rotas de indução de resistência (DRUZHININA et al., 2011, HERMOSA et al., 2012; HARMAN et al., 2004).

A utilização de filtrado de cultura de *T. asperellum* SKT-1 foi capaz de induzir resistência em *Arabidopsis thaliana*, envolvendo as rotas de sinalização do ácido salicílico e, também, ácido jasmônico e etileno (YOSHIOKA et al., 2012). Assim como foram isolados de filtrados de cultura de *T. harzianum* metabólitos com aplicação na agricultura, indutores de respostas de resistência em plantas e promotores de crescimento (VINALE et al., 2008; VINALE et al., 2014).

Os benefícios obtidos com a utilização do controle biológico são reiterados consecutivamente, entretanto ainda se encontram respostas variáveis e dependentes da interação planta X patógeno X organismo. Aliado a isso existem inúmeros entraves

relacionados à utilização de bioprodutos (MACHADO, 2012), além de dificuldades de produção em massa, contaminações, formulações e estabilidade que poderiam ser contornadas com a utilização de bioprocessos mais eficientes. Assim como a utilização do organismo vivo pode induzir resistência sistêmica, os metabólitos secundários produzidos em meio de cultura podem ser utilizados para a mesma finalidade (VINALE 2008).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar compostos orgânicos a partir de culturas líquidas de *Trichoderma harzianum* e verificar o controle da antracnose, a indução de resistência e avaliar o efeito dos tratamentos no crescimento de plantas de feijoeiro, seja através do organismo vivo ou do bioproduto produzido a partir de filtrado de cultura, aplicados via semente ou foliar.

## METODOLOGIA

### **Microrganismos**

Foi utilizado como inóculo inicial do agente fúngico de biocontrole *Trichoderma harzianum*, um produto comercial, Trichodermil® SC 1306 – Produto registrado no MAPA sob o nº 002007, com  $2 \times 10^9$  conídios viáveis/mL. Como patógeno desafiante foi utilizado um isolado virulento de *Colletotrichum lindemuthianum*, pertencente à micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, codificado como UFSM36.

### **Atividade biológica de filtrados de cultura sobre plântulas de *Phaseolus vulgaris***

Para a avaliação da atividade biológica de filtrados de cultura de *Trichoderma harzianum* sobre plântulas de *Phaseolus vulgaris* foram testados meios com diferentes proporções de sacarose: 5, 10 ou 15 g/L; água de maceração de milho (AMM): 15, 20 ou 25 g/L; e extrato de levedura: 5, 7,5 ou 10 g/L. Os oito diferentes meios de cultura foram inoculados com *T. harzianum* e incubados sob agitação constante e fotoperíodo de 12 horas, por 96 horas. Após o período de incubação, os meios foram filtrados em membrana milipore de 12 micras e aplicados como tratamento de sementes de feijão.

O tratamento das sementes foi realizado aplicando 1mL do filtrado de cultura para cada 200 sementes, homogeneizadas em sacos plásticos. Foi realizado um tratamento testemunha, em que foi aplicado 1 mL de água em substituição ao filtrado de cultura. Foram

utilizadas 200 sementes em cada tratamento, divididas em oito repetições de 25 unidades, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos contendo as sementes foram mantidos em germinador, a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Foi contabilizado o percentual de germinação (BRASIL, 2009) e separadas, aleatoriamente, dez plântulas de cada repetição e medido o comprimento da parte aérea e da raiz e o comprimento total. Em seguida, as plântulas foram levadas a estufa a 60°C por 48 h para a determinação da massa seca (BRASIL, 2009)

### **Fermentação de *Trichoderma harzianum***

Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido, contendo 10 g/L sacarose, 20 g/L água de maceração de milho, 7,5 g/L de extrato de levedura, acrescido de 1 mL da suspensão de esporos de *T. harzianum* e completado volume de 50 mL com água destilada. A incubação foi realizada em shaker (Tecnal® shaker model TE-420) sob agitação constante a 120 rpm, 28°C, fotoperíodo de 12h, por 96 horas.

Os fermentados foram filtrados em membrana milipore® 12 micras com auxílio de bomba de vácuo, removendo as células do fungo ou da bactéria, e imediatamente congelados para posterior análise.

### **Procedimento de extração**

Uma alíquota de 10 mL dos filtrados de cultura de *T. harzianum*, já sem células do microrganismo, foi adicionada à 50 mL dos solventes orgânicos, etanol, metanol, acetato de etila e hexano. As soluções permaneceram em agitação constante em temperatura ambiente e acopladas a condensador por 24h. Decorrido este período foram colocadas para precipitar em funil por 24h (etanol e metanol) e 2 horas (acetato de etila) e 1h (hexano). O sobrenadante foi acondicionado em freezer para análises.

### **Procedimento e equipamentos para cromatografia**

As análises por cromatografia gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo gasoso da Agilent Technologies 6890 acoplado a um espectrômetro de Massas Agilent Technologies 5975 B inert XL EI/CI MSD, com injetor automático Agilent Technologies 7683 B. Coluna J&W Scientific DB5-MS -Temperatura máxima de 325°C - (30mx0.32mm, 0.25um). Fluxo

de gás Hélio 2mL/min, pressão de 5.05psi. Temperatura do injetor 250°C; Seringa de 10uL, com injeção de 1uL; Temperatura inicial do forno de 60°C por 1min e após aquecimento de 15°C por min até 280°C. Para a fragmentação dos compostos foi utilizado uma energia de 70 ev no espectrômetro de Massas.

### **Ensaio para determinação da indução de resistência em feijoeiro**

Foram utilizadas sementes de feijão, cultivar Minuano, com reação de suscetibilidade à *Colletotrichum lindemuthianum*, previamente desinfestadas em banho de álcool 70% por 30 segundos, banho em hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos seguido por três banhos de 30 segundos cada em água destilada e esterilizada. As sementes permaneceram em temperatura ambiente no laboratório por 2 horas para secagem sob papel filtro.

#### **Aplicação dos tratamentos via semente:**

*Organismo vivo:*

Foi utilizado o produto Trichodermil® SC aplicado na dose de 1mL de produto puro para cada 200 sementes. Após a aplicação, as sementes foram colocadas em um saco plástico e homogeneizadas por 2 min.

*Bioproduto:*

O filtrado do crescimento fúngico, foi aplicado na dose de 1 mL para cada 200 sementes. Após a aplicação, as sementes foram colocadas em um saco plástico e homogeneizadas por 2 min.

#### **Aplicação dos tratamentos via foliar:**

*Organismo vivo:*

As plantas foram aspergidas com Trichodermil® SC quando iniciaram o estágio reprodutivo. Foi utilizada a dose de 10 mL de produto por Litro de calda de aplicação. A aspensão sobre as folhas foi realizada com aspersor manual.

*Bioproduto:*

O filtrado de cultura foi aplicado sobre as folhas na dose de 400 mL por Litro de calda de aplicação. A aspersão sobre as folhas foi realizada com aspersor manual.

As plantas foram cultivadas em vasos de 3 L, com substrato comercial suplementado com solução nutritiva completa e mantidos em casa de vegetação climatizada durante toda a execução do experimento. Quando as plantas iniciaram a emissão dos botões florais, realizou-se aspersão dos tratamentos foliares com atomizador manual. Após dois dias, realizaram-se coletas para as análises bioquímicas e em seguida as plantas foram aspergidas com suspensão de esporos de *C. lindemuthianum*, na concentração de  $3,5 \times 10^5$  esporos por mL. Cinco dias após, quando iniciaram os primeiros sintomas, realizaram-se novas coletas para as análises bioquímicas. Em ambas as coletas foi realizada a retirada de plantas inteiras, das quais separou-se o terceiro par de folhas. Para as análises foram removidas as nervuras das folhas. Também foram coletadas raízes para a determinação de AIA oxidase, priorizando a raiz principal e raízes mais velhas, removendo pelos absorventes e raízes secundárias até obter 1 g de peso fresco. Todo tecido coletado foi pesado e imediatamente congelado. As amostras foram armazenadas nesta condição até a realização das análises.

A partir do quinto dia após a inoculação (d.a.i.), quando as plantas começaram a apresentar os sintomas foliares da doença, foram realizadas avaliações diárias com base em uma escala diagramática adaptada de Dalla Pria; Amorim e Bergamin Filho, (2003), atribuindo-se notas de 1 (sem sintomas de doença) a 9 (infecção muito severa). Com base nessas avaliações foi calculado a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN, 1990), conforme a seguinte fórmula:

$$AACPD = \sum \left[ \left( \frac{Y_1 + Y_2}{2} \right) * (t_2 - t_1) \right]$$

Onde:

$Y_1$ : nota da avaliação no tempo  $t_1$ ;

$Y_2$ : nota da avaliação consecutiva no tempo  $t_2$ ;

$t_2 - t_1$ : intervalo em dias entre duas avaliações consecutivas.

A severidade da doença foi avaliada no décimo dia após a inoculação (d.a.i.). Foi utilizada a mesma escala diagramática e as notas convertidas no índice de doença (ID) de McKinney (MCKINNEY, 1923):

$$ID (\%) = \frac{\sum(Y * X_y)}{(X_t * h)} * 100$$

Y: nota;

X<sub>y</sub>: número de plantas com esta nota;

X<sub>t</sub>: número total de plantas;

h: valor máximo da escala.

Para a determinação da atividade da peroxidase, 0,2 g de tecido congelado foi macerado com aproximadamente 1 mg de polivinilpirrolidona, acrescido de 20 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). O homogeneizado foi filtrado, centrifugado a 6.000 rpm por 30 minutos e o precipitado foi descartado, todo o procedimento foi realizado em temperatura máxima de 4°C.

A atividade da peroxidase foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Matsuno; Uritani (1972), apud CAMPOS et al (2004, p.639). Em tubos previamente imersos em banho de gelo foram misturados 2,5 mL de tampão fosfato-citrato pH 5,0 (fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M), 1,5 mL de extrato enzimático e 0,25 mL de guaiacol 0,5%, e 0,25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e em seguida misturados em vortex por 15 segundos. Esta mistura foi incubada em banho de água a 30°C, por 15 minutos. Após foi adicionado 0,25 mL de solução de metabissulfito de sódio a 2%. As amostras foram novamente misturadas em vortex e deixadas em repouso de 10 minutos.

Como controle para a reação enzimática, o extrato enzimático foi substituído por água. A absorvância foi lida a 450 nm, em espectrofotômetro UV PC Shimadzu. A atividade da enzima foi expressa em unidade enzimática (UE). Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de extrato enzimático que acusou um aumento na absorvância de 0,001 unidade por minuto (CAMPOS et al, 2004), expressa por grama de tecido fresco para atividade da enzima e mg de proteína para atividade específica.

A determinação da atividade de β-1,3-glucanase foi realizada pelo método de Abeles; Forrence (1970) modificado (CAMPOS et al., 2009). As folhas congeladas foram maceradas à temperatura de 2°C, em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 5,4), contendo 0,1% (v/v) de β-mercaptoetanol e 0,1% (p/v) de L-ácido ascórbico.

O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por 30 min na temperatura de 0 a 4°C. O precipitado foi descartado e, 0,5 mL do sobrenadante foi tratado com 1 mL acetona gelada a -20°C, por 90 minutos. A suspensão foi centrifugada a 15.000 g por 30 min entre -4 e 0°C. Os precipitados sedimentados foram secos a vácuo, por 48 horas, em temperatura ambiente, e

ressuspensos em 62,5  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,2). A essa suspensão, foi adicionado 0,1 mL de laminarina a 4%, e a mistura foi incubada a 40°C por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 375  $\mu$ L do reagente dinitrossalicilato à mistura, seguida de aquecimento em banho de água fervente por 5 min.

A solução colorida resultante foi diluída com 4,5 mL de água e agitada em vortex. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 500 nm, em espectrofotômetro UV PC Shimadzu. A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi expressa em nmol por mg de tecido fresco, para observação da velocidade de reação, e a atividade específica em nmol por mg de proteína.

A determinação de proteína foi realizada pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976), no extrato vegetal preparado para a leitura da atividade de peroxidase, utilizando albumina como padrão.

Na preparação do extrato enzimático para determinar a atividade de AIA oxidase foi utilizada a metodologia proposta por Saleh (1981) com modificações. Para a obtenção do extrato, 1 g de raiz congelada foi macerada com a utilização de nitrogênio líquido, acrescido de 2,5 mL de água destilada. O extrato obtido foi centrifugado a 30000 g por 30 min. Todo o processo realizado em temperatura máxima de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da enzima e o precipitado descartado. Para a determinação da atividade de AIA – oxidase 0,5 mL do extrato preparado foi acrescido de 0,5 mL de uma solução contendo 1 mM de AIA, 0,25 mL 2,4 dichlorophenol (1 mM), 0,25 mL MnCl<sub>2</sub> (1 Mm), e 1 mL de água destilada a 25°C. O substrato-enzima foi incubado por 60 minutos a temperatura de 25°C. A reação foi interrompida com a adição de 2 mL da mistura contendo 1mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5M em 50 mL de HClO<sub>4</sub> 35% e a leitura realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601 PC em 530 nm utilizando curva padrão (GORDON; WEBER 1950). A atividade da enzima foi expressa em  $\mu$ mol de AIA degradado por g de tecido fresco durante 60 min.

Para cada variável analisada foi calculada a média e verificada a normalidade dos dados, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, foi realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade, usando o aplicativo SISVAR (FERREIRA, 2011). As análises de correlação foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2006).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade biológica sobre plântulas de feijão, determinada pelo efeito sobre a germinação, comprimento de parte aérea, raiz e total e massa seca de plântulas (Tabela 1) demonstrou que a utilização dos filtrados de *T. harzianum* não alteraram a germinação das sementes mas promoveram o desempenho do crescimento e acúmulo de massa superiores ao tratamento controle, em que foi utilizada apenas água aplicada às sementes. *Trichoderma harzianum* já foi relatado como promotor do crescimento de plântulas de feijão, quando realizada aplicação do organismo vivo às sementes, beneficiando a plântula mesmo depois que esta torna-se independente das reservas de sementes (JUNGES et al., 2015).

Tabela 1 – Variação na concentrações de sacarose, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura, em meio de cultivo para o crescimento de *Trichoderma harzianum* avaliado em plântulas de feijão.

	Sacarose (g/L)	AMM (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Comp. PA (cm)	Comp. Raiz (cm)	Comp. Total (cm)	Massa seca (mg)	Germ. (%)
<i>Trichoderma harzianum</i>	5	15	10	6,70 a	9,18 a	15,87 a	38,00 a	73 a
	15	15	5	6,10 a	7,96 b	14,05 b	28,00 b	73 a
	15	25	5	5,58 b	8,15 b	13,73 b	34,75 a	78 a
	15	25	10	6,44 a	8,91 a	15,35 a	37,25 a	73 a
	5	25	10	5,90 a	9,04 a	14,94 a	30,00 b	70 a
	15	15	10	6,35 a	8,04 b	14,39 b	32,00 a	68 a
	5	25	5	5,80 a	8,45 a	14,25 b	39,25 a	72 a
	10	20	7,5	6,49 a	9,34 a	15,83 a	34,75 a	79 a
Água	-	-	-	4,61 b	7,44 b	12,05 b	24,50 b	64 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A análise cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma harzianum*, realizada a partir de quatro solventes demonstrou a presença majoritária de ácidos graxos (Tabela 2). A utilização do Hexano como extrator propiciou identificar outros compostos presentes na solução. A utilização do Metanol como solvente identificou dois analitos de interesse, ethyl (9E,12E) -octadeca-9,12-dienoate (ácido linoleico) e ethyl (Z)-octadec-9-enoate (ácido oleico).

A presença majoritária de ácidos graxos observada pode ter tido importância para a utilização de filtrados de cultura de *T. harzianum* como controlador de doenças de plantas,



conforme resultados de Avis; Bélanger (2001) verificaram que ácidos graxos de extratos celulares de *Pseudozyma flocculosa* promoveram uma desorganização na membrana de células de microrganismos, elevando a fluidez e alterando a conformação de proteínas podendo chegar a desintegrar a célula.

Os compostos observados com maior sinal foram o ácido linoleico e o ácido oleico, são ácidos graxos insaturados. Quando associados à membrana celular de fungos eles possuem elevada ação fungicida (THIBANE et al., 2010). A ação antifúngica destes ácidos graxos já foi comprovada em ensaios *in vitro* para fitopatógenos como *Alternaria solani* e *Fusarium oxysporum* (LIU et al., 2008) e *Crinipellis pernicioso*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avanae* e *Rhizoctonia solani* (WALTERS et al., 2004).

A oxidação de ácidos graxos, principalmente o linoleico e linolênico, origina fito-oxilipinas, uma família de metabólitos secundários com estrutura e atividade biológica diversa. Além de ação antifúngica, as oxilipinas são reguladoras de respostas de defesa da planta (PROST et al., 2005). Um exemplo de compostos da classe das fito-oxilipinas são os jasmonatos, hormônios vegetais que atuam no desenvolvimento da planta e na regulação da resposta a estresses bióticos e abióticos (KAZAN; MANNERS, 2008).

Além da produção de ácidos graxos que podem ser convertidos em oxilipinas pela planta, algumas oxilipinas foram detectadas no filtrado de cultura (Tabela 2). Entretanto muitas oxilipinas são quimicamente instáveis e podem sofrer degradação ou serem metabolizadas, perdendo eficiência (POHL; KOCK; THIBANE, 2011).

Observou-se a indução de respostas de defesa à antracnose em plantas de feijão, por *Trichoderma harzianum*, seja o organismo vivo ou o filtrado de cultura, aplicado via semente ou foliar, nos ensaios realizados em planta. Os tratamentos utilizados reduziram a severidade da doença quantificada pelo Índice de McKinney e o progresso da doença determinado pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (Tabela 3). Estes resultados reiteram os trabalhos de outros autores que demonstraram a ação de *T. harzianum* como biocontrolador de doenças de plantas, seja pela ação direta contra patógenos ou como indutor de resistência (PEDRO et al., 2012; VINALE et al., 2014).

Os efeitos dos tratamentos foram observados após a inoculação do patógeno desafiador, quando observou-se alterações na atividade da peroxidase, AIA oxidase e nos teores de proteína (Tabelas 4 e 6). A  $\beta$ -1,3-glucanase apresentou acréscimos na atividade dos tratamentos dois dias após a aplicação, este acréscimo foi intensificado após a inoculação (Tabela 5).

Tabela 2 – Identificação dos componentes presentes no filtrado de cultura de *Trichoderma harzianum* extraídos com quatro solventes, hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) e unidade área (UA).

NOMENCLATURA IUPAC	HEXANO		ACETATO ETILA		METANOL		ETANOL	
	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área
<b>ÁCIDOS GRAXOS</b>								
(E)-icos-5-ene	4,301	52253	x	x	x	x	x	x
3-cyclohexyl-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione	4,825	32806	x	x	x	x	x	x
1-O-pentadecyl 2-O-prop-2-enyl oxalate	7,540	116479	x	x	x	x	x	x
nonadecane	9,278	256802	x	x	x	x	x	x
[(E)-non-1-enyl]cyclohexane	9,764	78200	x	x	x	x	x	x
Hexadecane	10,074	182386	x	x	x	x	x	x
nonadecane	10,836	334576	x	x	x	x	x	x
Octadecane	11,556	193605	x	x	x	x	x	x
propan-2-yl tetradecanoate	x	x	11,751	127863	x	x	x	x
2-(Chloromethyl)-1,3-dimethylbenzene	x	x	15,396	305424	x	x	x	x
(Z)-octadec-9-enoic acid	x	x	x	x	15,379	227044	x	x
phenylmethyl (Z)-octadec-9-enoate	x	x	x	x	x	x	15,386	212592
ethyl (9E,12E)-octadeca-9,12-dienoate	13,915	932046	13,924	534093	13,905	850402	13,914	556707
ethyl (Z)-octadec-9-enoate	13,949	1334527	13,955	1074216	13,941	1175844	13,947	731048
<b>OXIDRILAS</b>								
1-octoxyoctane	4,648	19121	x	x	x	x	x	x
tributyl 2-acetyloxypropane-1,2,3-tricarboxylate	14,384	770298	x	x	x	x	x	x
N-(2-amino-2-oxoethyl)tetradecanamide	15,392	284098	x	x	x	x	x	x
Tributyl citrate	x	x	x	x	x	x	14,383	52726
<b>OUTROS COMPOSTOS</b>								
2-butyloctan-1-ol	4,434	177639	x	x	x	x	x	x
(1Z)-1,2-Dimethylcyclooctene	5,153	57677	x	x	x	x	x	x
2-methylpropyl nonyl carbonate	6,641	14193	x	x	x	x	x	x
hexyl undecyl sulfite	12,906	186111	x	x	x	x	x	x
(2E,15Z)-14-methyloctadeca-2,15-dien-1-ol	x	x	x	x	15,361	162315	x	x

A identificação cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura de *T. harzianum* demonstraram a presença de ácidos graxos, predominantemente o ácido linoleico, um ácido graxo poli-insaturado. Atribui-se ação antifúngica de ácidos graxos pela sua inserção na bicamada lipídica das membranas, causando uma perturbação física e aumento da fluidez da membrana. Estes aumentos na fluidez da membrana ocasionam uma desorganização generalizada, levando a alterações da conformidade das proteínas da membrana, ocorrendo a libertação de componentes intracelulares, desordem citoplasmática e, eventualmente, desintegração da célula (AVIS; BÉLANGER, 2001). Aliado a isso, a oxidação de ácidos graxos, principalmente o linoleico (18: 2) e linolênico (18: 3), origina oxilipinas, uma família de metabólitos secundários com estrutura e atividade biológica diversa. As oxilipinas tem ação antifúngica e também reguladora de respostas de defesa da planta (PROST et al., 2005). Entre os compostos da classe das oxilipinas estão os jasmonatos, hormônios vegetais que atuam no desenvolvimento da planta e na regulação da resposta à estresses bióticos e abióticos (KAZAN; MANNERS, 2008).

Tabela 3 – Avaliação da AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença) e do Índice de Doença de McKinney (%) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com *Trichoderma harzianum* via semente ou foliar, determinada antes e depois da inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*.

TRATAMENTOS	AACPD	Índice de Doença
Suspensão de esporos via semente	4,1 B	15,2 B
Filtrado de cultura via semente	4,5 B	16,7 B
Suspensão de esporos via foliar	4,0 B	14,0 B
Filtrado de cultura via foliar	3,5 B	11,0 B
Controle não inoculado	3,5 B	11,0 B
Controle não tratado	7,9 A	30,2 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A aplicação de *Trichoderma* spp. via foliar, tanto com o organismo vivo quanto com o filtrado de cultura, induz respostas de defesa em plantas de feijão pela elevação da atividade específica da peroxidase (Tabela 4). Dos tratamentos utilizados, apenas na aplicação do filtrado de cultura via semente não houve aumento na atividade específica da peroxidase após a presença do patógeno desafiador. A peroxidase é uma importante enzima das plantas e está envolvida em diversas reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de

ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da alongação de células e outras (ALMAGRO et al., 2009).

Tabela 4 – Avaliação da atividade da peroxidase (UE mg<sup>-1</sup> tecido) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com *Trichoderma harzianum* via semente ou foliar, determinada antes e após a inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*.

TRATAMENTOS	Atividade Específica	
	Antes da inoculação	Após a inoculação
Suspensão de esporos via semente	58,44 Ab	113,01 Ba
Filtrado de cultura via semente	59,54 Aa	94,07 Ba
Suspensão de esporos via foliar	81,35 Ab	153,3 Aa
Filtrado de cultura via foliar	80,95 Ab	130,79 Aa
Controle não inoculado	67,75 Aa	92,84 Ba
Controle não tratado	75,67 Aa	72,4 Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

A  $\beta$ -1,3-glucanase atua diretamente nas glucanas presentes na parede celular de fungos fitopatogênicos inibindo o seu desenvolvimento. Todos os tratamentos mantiveram as plantas com maior atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase nos níveis de planta sadia e superiores às plantas que não receberam tratamento (Tabela 5). As plantas que não receberam tratamento, os níveis da atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase decaíram significativamente após a inoculação. A aplicação foliar de *Trichoderma harzianum* elevou os níveis totais desta enzima no tecido vegetal, e isso se manteve após a inoculação do patógeno.

A análise da correlação entre a AACPD e a atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase antes da inoculação do patógeno foi negativa e estatisticamente significativa ( $R = 0,75$ ), assim como a correlação entre o índice de doença e atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase ( $R = 0,87$ ). Estes resultados podem ser atribuídos à redução do progresso e da severidade da doença pelo estímulo de indução da resistência pelo fungo indutor, elevando a atividade dessa isoenzima, com isto, dificultando a penetração e

estabelecimento do patógeno. Para as demais variáveis a correlação não foi significativa.

Tabela 5 – Avaliação da atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase (UE  $\text{mg}^{-1}$  tecido) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com *Trichoderma harzianum* via semente ou foliar, determinada antes e após a inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*.

TRATAMENTOS	Atividade Específica	
	Antes da inoculação	Após a inoculação
Suspensão de esporos via semente	6,21 Aa	8,83 Aa
Filtrado de cultura via semente	6,27 Ab	9,91 Aa
Suspensão de esporos via foliar	8,61 Aa	9,87 Aa
Filtrado de cultura via foliar	8,63 Aa	8,56 Aa
Controle não inoculado	7,03 Aa	7,48 Aa
Controle não tratado	7,99 Aa	4,39 Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Os teores de proteína aumentaram após a inoculação do patógeno na testemunha, e estes níveis foram superiores aos demais tratamentos também após a aplicação foliar, vivo ou filtrado, de *T. harzianum* (Tabela 6). Após o ataque de um patógeno, a planta produz inúmeras respostas de defesa que incluem a síntese e realocação de proteínas, muitas vezes ocasionando um gasto energético capaz de retardar o crescimento e desenvolvimento destas plantas (HEIL; BALDWIN, 2002). Nas condições de avaliação deste trabalho, foi possível observar que as repostas de indução de resistência produzidas, como elevação na atividade das enzimas não representaram prejuízos ao acúmulo de massa fresca e seca das plantas no início da infecção, conforme Tabela 7. Alguns autores atribuem à espécies de *Trichoderma* o potencial de agir como promotor de crescimento, elevando a massa fresca e seca de plantas (CHACÓN et al., 2007), e plântulas (JUNGES, et al., 2015), apesar de não ter sido observado neste trabalho.

Tabela 6 – Teores de proteína (mg/g de tecido) e atividade da AIA oxidase ( $\mu\text{mol min}^{-1}$  de AIA degradado/g tecido) em feijão cultivar Minuano tratadas com *Trichoderma harzianum* via semente ou foliar e inoculadas com o patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*.

TRATAMENTOS	PROTEÍNA		AIA OXIDASE	
	Antes da inoculação	Após a inoculação	Antes da inoculação	Após a inoculação
Suspensão de esporos via semente	14,24 Aa	11,99 Ba	0,46 Ab	1,05 Ba
Filtrado de cultura via semente	14,96 Aa	11,72 Ba	0,46 Ab	1,00 Ba
Suspensão de esporos via foliar	15,64 Aa	18,6 Aa	0,48 Aa	0,69 Ba
Filtrado de cultura via foliar	13,31 Aa	16,85 Aa	0,96 Ab	1,27 Ba
Controle não inoculado	14,22 Aa	14,15 Ba	0,4 Aa	1,00 Ba
Controle não tratado	13,23 Ab	19,13 Aa	0,78 Ab	1,83 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 7 – Massa fresca e seca de plantas ( $\text{mg planta}^{-1}$ ) de feijão cultivar Minuano tratadas com *Trichoderma harzianum* via semente ou foliar e inoculadas com o patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*.

TRATAMENTOS	Parte aérea		Raiz	
	Massa Fresca	Massa Seca	Massa Fresca	Massa seca
Suspensão de esporos via semente	41,99 A	4,69 A	12,69 A	1,23 A
Filtrado de cultura via semente	41,85 A	4,34 A	9,78 A	1,02 A
Suspensão de esporos via foliar	39,92 A	4,50 A	8,91 A	0,90 A
Filtrado de cultura via foliar	36,43 A	3,69 A	7,59 A	0,81 A
Controle não inoculado	40,91 A	4,87 A	13,49 A	1,29 A
Controle não tratado	38,99 A	4,18 A	7,76 A	0,79 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

De mesma maneira, se observa uma elevação na atividade da AIA – oxidase, responsável pela oxidação do hormônio AIA, após a inoculação do patógeno, para a maioria dos tratamentos (Tabela 6). Uma maior atividade desta enzima oxidativa

representa menores níveis do hormônio de crescimento nas raízes. Naquelas plantas que não foram contaminadas pelo patógeno, não se observa alteração nos níveis de AIA oxidase, assim como quando realizada a aplicação da suspensão de esporos de *T. harzianum* na parte aérea. Ainda assim, nas plantas que foram inoculadas e não receberam tratamento, a atividade desta enzima foi superior, demonstrando que com o avanço da doença haveria decréscimo no crescimento vegetal ocasionado por *C. lindemuthianum*, que foi retardado pela aplicação dos tratamentos. Em trabalho realizado com *T. virens*, Contreras-Cornejo et al (2009) demonstraram a capacidade de estimular a produção de compostos indólicos em plantas, entre eles o ácido indol 3 acético (AIA), que mediam a promoção de crescimento das plantas.

*Trichoderma* spp. atua na indução de resistência em diversos patossistemas, em estudos com a cultura do feijoeiro. Teixeira et al. (2012), obtiveram redução na severidade de podridão-radicular-seca do feijoeiro causada por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* com a aplicação de *Trichoderma* spp. via sementes ou no sulco de semeadura. Pedro et al. (2012) avaliando a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento de plantas de feijão e reduzir a severidade da antracnose do feijoeiro observaram que os isolados mais eficientes podem proporcionar aumentos superiores a 30% na produção de matéria seca da parte aérea das plantas e reduzir a severidade da doença entre 63 e 98%.

Essa ação pode estar relacionada com alterações na síntese de proteínas. Há um conjunto de proteínas relacionadas com a interação de *T. harzianum* e fungos patogênicos, Pereira et al. (2014) realizaram uma investigação da proteômica relacionada com a presença ou ausência de *Rhizoctonia solani* ou *Fusarium solani* em plantas de feijão tratadas com *T. harzianum*, catalogando proteínas envolvidas no patossistema. Estes autores demonstraram haver um padrão diferencial de expressão de genes relacionados ao sistema de defesa da planta: quitinase,  $\beta$ -1-3-glucanase, lipoxygenase e peroxidase, havendo maior expressão na presença de *T. harzianum*. Dados do presente trabalho mostram que a presença do organismo vivo colonizando o sistema radicular pode não ser a maneira mais eficiente de resposta, e sim a aplicação foliar, seja dos propágulos vivos ou de um bioproduto produzido a partir de filtrados do crescimento em meio líquido.

As melhores respostas de indução de resistência, observadas na aplicação do filtrado de cultura podem ser atribuídas a produção de ácidos graxos por *Trichoderma*

*harzianum* em meio de cultura, principalmente o ácido linoleico, precursor da oxilipina jasmonato.

A utilização de filtrados de culturas de *T. harzianum* se configura como ferramenta no manejo integrado de doenças. Este organismo produz uma grande quantidade e diversidade de ácidos graxos quando cultivados em meio líquido, isso permite a produção e extração a partir de bioprocessos eficientes. Ácidos graxos com ação antifúngica são vantajosos quando comparados a produtos químicos com a mesma finalidade, pois são específicos, não impactando sobre organismos não alvo e por agirem em diferentes sítios, seja desestruturando membranas ou convertidos à oxidrilas indutoras de respostas de defesa, reduzindo as chances de resistência por parte dos patógenos. Estes bioprodutos podem ainda ser utilizados associados à fungicidas químicos, também como ferramenta de manejo de resistência (GONZALEZ et al., 2002), ou substituí-los, dada as vantagens ambientais e econômicas que propiciam (LIU et al., 2008).

Nas condições deste trabalho não foi realizada uma investigação conjunta de aplicações sequenciais, via semente e foliares, mas com base na amplitude de resposta observada se espera que os efeitos possam ser cumulativos e sinérgicos, apontando para a composição de programas de manejo de antracnose em feijão baseadas em produtos biológicos produzidos a partir de isolados de *Trichoderma harzianum*.

## CONCLUSÕES

*Trichoderma harzianum* cultivado em meio líquido produz ácidos graxos e oxidrilas descritos na literatura com potencial fungicida e indutores de resposta de defesa em plantas;

*Trichoderma harzianum* induz resistência à antracnose em plantas de feijoeiro comum, reduzindo a severidade e o progresso da doença, e esta expressão se dá a partir da presença do patógeno desafiante;

A aplicação foliar de *T. harzianum*, vivo ou filtrado, eleva a atividade de peroxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e teores de proteínas em plantas de feijão;

O ácido linolênico, obtido de filtrado de culturas de *T. harzianum*, induz respostas de defesa em plantas de feijoeiro;

As respostas de indução de resistência estimuladas por *T. harzianum* não alteram o acúmulo de massa seca nas plantas.



## REFERENCIAS

- ALMAGRO L. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n.2, p. 377–390, 2009.
- AVIS, T.J.; BÉLANGER, R.R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 956-960. 2001.
- BEDENDO, I. P.; MASSOLA, N. S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; RESENDE, J. A. M; BERGAMIN FILHO, A (Ed.). **Manual de fitopatologia**, Piracicaba: Agronômica Ceres, v.1, 4.ed. p. 367-388, 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 398p.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley e Sons, 1990. 532p.
- CAMPOS, A.D. et al., Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.
- CAMPOS, A.D. et al., Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.15-21, 2009.
- CHACÓN, M.R. et al. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. **Internacional Microbiologi**. v.10, p.19-27. 2007.
- CHIORATO, A.F. et al. Co-evolução entre raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e feijoeiro. **Bragantia**, v.65, p.381-388, 2006.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A. et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin dependent mechanism in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.149, p.1579–1592. 2009.
- CRUZ, C.D. 2006. **Programa genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa: UFV. 285 p.
- DALLA PRIA, M; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.

DRUZHININA, I.S. et al. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**. V.16, p.749-59. 2011.

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

GORDON, S.A; WEBER, R.P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**. V.1, p. 192–195. 1951

GONZALEZ, C.F. et al. Independent and synergistic activity of synthetic peptides against thiabendazole resistant *Fusarium sambucinum*. **Phytopathology**. v. 92, p. 917-924. 2002.

HARMAM, G.E. et al. Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.

HERMOSA, R. et al. Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. **Microbiology**. V. 158, p.17-25. 2012.

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

JEGATHAMBIGAI, V. et al. Effect of *Trichoderma* sp. On *Sclerotium rolfsii*, the Causative Agent of Collar Rot on *Zamioculcas zamiifolia* and an on Farm Method to Mass Produce *Trichoderma* species. **Plant Pathology Journal**, v.9, p. 47-55. 2010.

JUNGES, E. et al. Biopriming in bean seeds, **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B —Soil & Plant Science**, 2015. DOI: 10.1080/09064710.2015.1087585

KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Jasmonate Signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1459-1468, 2008.

LIU, S. et al. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. **Mycopathologia**. v. 166, p. 93-102. 2008.

MACHADO, D.F.M. et al. Trichoderma No Brasil: O Fungo e o Bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v.35, n.1, 2012.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, v.26, p. 195-218, 1923.

PEDRO, E.A.S. et al. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.47, n.11, p.1589-1595, 2012.

PEREIRA, J.L, et al. Analysis of *Phaseolus vulgaris* Response to Its Association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the Presence or Absence of the Phytopathogenic Fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **PloS ONE**. V. 9, n.5, 2014.

POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: A review. in: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. 1 ed. Formatex: 2011. p. 61-71.

PROST, I. et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defence against pathogens. **Plant Physiology**. V.139, p.1902-1913. 2005.

SALEH, A.N. The effect of kinetin on the indolacetic acid level and indolacetic acid oxidase activity in roots of young plants. **Physiologia Plantarum**. V.51, p.399-401. 1981

TEIXEIRA, H. et al. *Trichoderma* spp. Decrease *Fusarium* root rot in common bean. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 4, 2012.

THIBANE, V.S. et al. Effect of marine polyunsaturated fatty acids on biofilm formation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Marine Drugs**. v. 8, p. 2597-2604. 2010.

VINALE F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n.6, p. 80–86, 2008.

VINALE, F. A Novel Fungal Metabolite with Beneficial Properties for Agricultural Applications. **Molecules**. v.19, p.9760-9772, 2014.

WALTERS, D. et al. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. **Mycopathologia**. v.157, p.87-90, 2004.

YOSHIOKA, Y. et al. Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. **Pest Management Science**. v.68, p.60–66. 2012.

### 3 ARTIGO 2 – INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO POR BIOPRODUTOS DE *Bacillus subtilis* APLICADOS VIA SEMENTE OU FOLIAR

#### RESUMO

O uso massivo de produtos químicos para controle de doenças em plantas causa inúmeros impactos negativos no sistema de produção agrícola, sobre organismos não alvo, consumidores, agricultores e o ambiente. Diante disso, a utilização de organismos de controle biológico, como *Bacillus subtilis*, se caracteriza como uma ferramenta importante e com muito potencial ainda a ser explorado. O presente trabalho objetivou identificar metabólitos secundários produzidos por *Bacillus subtilis* em meio de cultivo líquido e avaliar a indução de resistência mediada por bioprodutos em *Phaseolus vulgaris* contra *Colletotrichum lindemuthianum*, causador da antracnose. *Bacillus subtilis* foi cultivado em meio de cultura líquido, do qual foram extraídos os metabólitos produzidos. A identificação dos componentes foi realizada por cromatografia gasosa e espectrofotometria de massa. Foram realizadas aplicações de *B. subtilis* na forma de suspensão de células vivas ou filtrado de cultura, aplicados via semente ou foliar. Decorridos dois dias das aplicações foliares foi realizada a inoculação com *C. lindemuthianum*. A severidade da antracnose foi estimada diariamente, a partir do quinto dia após a inoculação (d.a.i.) e determinada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD). A partir dos dados de severidade no 10 d.a.i. foi calculado o índice de doença de McKinney. Foram realizadas coletas de material vegetal para análise enzimática antes da inoculação do patógeno e no início do aparecimento dos sintomas. No filtrado de cultura de *B. subtilis* foram identificados ácidos graxos com ação antifúngica e indutores de respostas de defesa em plantas, como o ácido tetradecanoico (ácido mirístico). A utilização de *Bacillus subtilis*, independente de forma de aplicação, seja suspensão de células vivas ou filtrado de cultura, aplicado via semente ou foliar, reduz a progressão e a severidade da doença. A atividade específica de peroxidase foi estimulada, principalmente, pela aplicação do organismo vivo via semente e filtrado de cultura via foliar. O filtrado de cultura aplicado via semente ou foliar eleva significativamente a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase. *Bacillus subtilis* é, portanto, uma ferramenta importante para o manejo da antracnose em feijoeiro, principalmente o filtrado de cultura, que pode ser utilizado via semente ou foliar.

**Palavras chave:** *Phaseolus vulgaris*.  $\beta$ -1,3-glucanase. Peroxidase. Controle biológico.

## INDUCED RESISTANCE TO ANTHRACNOSE IN BEAN BY THE *Bacillus subtilis* APPLIED VIA SEED OR LEAF

### ABSTRACT

The massive use of chemicals to control plant diseases cause numerous negative impacts on agricultural production system on non-target organisms, consumers, farmers and the environment. Therefore, the use of biological control organisms such as *Bacillus subtilis*, is characterized as an important and much potential yet to be explored tool. This study aimed to identify secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* in liquid culture and evaluate the resistance mediated induction bioproducts in *Phaseolus vulgaris* against *Colletotrichum lindemuthianum*, which causes anthracnose. *Bacillus subtilis* was grown in liquid culture from which the produced metabolites were extracted. Identification of components was conducted by gas chromatography and mass spectrophotometry. *B. subtilis* applications were made as a suspension of living cells or culture filtrate, or applied as seed leaf. After two days of foliar application was carried out inoculation with *C. lindemuthianum*. The severity of anthracnose was estimated daily from the fifth day after inoculation (d.a.i.) and determined the Area Under Disease Progress Curve (AUDPC). From the severity of data in 10 d.a.i. It was calculated McKinney disease index. Plant material samples were collected for enzymatic analysis before the pathogen inoculation and early onset of symptoms. In *B. subtilis* culture filtrate fatty acids were identified with antifungal action and inducing defense responses in plants, such as myristic acid (myristic acid). The use of *Bacillus subtilis*, application-independent form, either living cells or suspension culture filtrate, seed or foliar applied, reducing the progression and severity of the disease. The specific activity of peroxidase was stimulated mainly by the application of the living organism via seed and filtered foliar culture. The culture filtrate applied seed or foliar application significantly increases the activity of  $\beta$ -1,3-glucanase. *Bacillus subtilis* is therefore an important tool for the management of bean anthracnose, especially the culture filtrate, which can be used seeds or leaves.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. Beta-1, 3-glucanase. Peroxidase. Biological control.

## INTRODUÇÃO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Scrib. é uma das doenças mais importantes da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) no mundo. Se forem utilizadas sementes infectadas e as condições de temperatura e umidade relativa do ar forem favoráveis, as perdas causadas pela doença podem chegar a 100% (VECHIATO et al., 2001).

Algumas bactérias agem como promotoras do crescimento de plantas (PGPB) por facilitar ou modular os níveis hormonais das plantas ou diminuir os efeitos inibidores do crescimento e desenvolvimento causados por diversos agentes patogênicos, atuando também como bactérias biocontroladoras (GLICK, 1995).

A ação biocontroladora de patógenos, por sua vez, pode ser devido à indução de resistência sistêmica (ISR) em plantas, que é uma resposta comum a microrganismos não patogênicos, como bactérias, fungos e vírus (ROMEIRO, 1999). Esta resposta pode ser observada na presença destes microrganismos ou apenas após a inoculação de um patógeno desafiante. As plantas expressam as respostas de defesa de diferentes maneiras: produção de enzimas líticas da parede celular de fungos, tais como  $\beta$  - 1,3 - glucanases (SEO et al., 2012), aumentos na atividade de peroxidases, responsáveis pelo reforço da parede celular e formação de barreiras físicas (DIHAZI, et al., 2012), entre outras.

Vários trabalhos relatam a ação de *Bacillus subtilis* no estímulo de síntese de isoenzimas relacionadas à patogênese para controle de doenças em feijoeiro, como as do grupo peroxidase no controle de cretamento bacteriano comum (SBALCHEIRO; DENARDIN; BRAMMER, 2009) e peroxidase e fenilalanina amônio liase no controle de murcha bacteriana (MARTINS et al., 2013).

Os compostos bioativos de *Bacillus subtilis* são efetivos tanto na presença de células vivas junto à planta, colonizando o solo rizosférico, como em bioprodutos, extraídos a partir de seu crescimento em diferentes meios. Estes compostos podem apresentar natureza química variada, demonstrando a não existência de característica estrutural única na determinação da atividade elicitora (STANGARLIN et al., 1999). Pouco é conhecido sobre substâncias secretadas que sejam capazes de atuar como indutoras de resistência (ONGENA et al., 2007). Os mesmos autores demonstram que lipopeptídeos como surfactinas e fengicinas secretados por *B. subtilis* estão envolvidos

em processos de indução de resistência em feijoeiro com efeito semelhante às células vivas, atuando como sinalizadoras nos mecanismos de defesa.

Glick (2012) destaca vários pontos que precisam ser abordados para uma utilização mais eficiente e uma comercialização mais extensiva de produtos à base de PGPB, entre eles características da estirpe utilizada, sua interação com o ambiente e desenvolvimento de meios mais eficientes de aplicação, respeitando a condição ambiental a que se destina exigindo uma nova abordagem de formulação e aplicação destas bactérias.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou identificar compostos orgânicos a partir de culturas líquidas de *Bacillus subtilis* e avaliar o controle da antracnose, a indução de resistência e o efeito dos tratamentos no crescimento de plantas de feijoeiro, mediada pelo organismo vivo ou filtrado de cultura, aplicados via semente ou foliar.

## METODOLOGIA

### **Microorganismos**

Foi utilizado como inóculo inicial do agente bacteriano de biocontrole *Bacillus subtilis*, um produto comercial, Rhizolyptus<sup>®</sup> ( $1 \times 10^9$  UFC/mL). Como patógeno desafiante foi utilizado um isolado virulento de *Colletotrichum lindemuthianum* (access code Genbank), da micoteca do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria, isolado de plantas de feijão sintomáticas, codificado como UFSM36.

### **Atividade biológica de filtrados de cultura sobre plântulas de *Phaseolus vulgaris***

Para a avaliação da atividade biológica de filtrados de cultura de *Bacillus subtilis* sobre plântulas de *Phaseolus vulgaris* foram testados meios com diferentes proporções de sacarose: 5, 10 ou 15 g/L; água de maceração de milho (AMM): 15, 20 ou 25 g/L; e extrato de levedura: 5, 7,5 ou 10 g/L. Os oito diferentes meios de cultura foram inoculados com *B. subtilis* e incubados sob agitação constante e fotoperíodo de 12 horas, por 96 horas. Após o período de incubação, os meios foram filtrados em membrana milipore de 12 micras e aplicados como tratamento de sementes de feijão.

O tratamento das sementes foi realizado aplicando 1mL do filtrado de cultura para cada 200 sementes, homogeneizadas em sacos plásticos. Foi realizado um tratamento testemunha, em que foi aplicado 1 mL de água em substituição ao filtrado de cultura. Foram utilizadas 200 sementes em cada tratamento, divididas em oito

repetições de 25 unidades, semeadas em rolo de papel filtro umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a massa seca do papel. Os rolos contendo as sementes foram mantidos em germinador, a 25°C e fotoperíodo de 12 h. Foi contabilizado o percentual de germinação (BRASIL, 2009) e separadas, aleatoriamente, dez plântulas de cada repetição e medido o comprimento da parte aérea e da raiz e o comprimento total. Em seguida, as plântulas foram levadas a estufa a 60°C por 48 h para a determinação da massa seca (BRASIL, 2009).

### **Fermentação de *Bacillus subtilis***

Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido, contendo 10 g/L sacarose, 20 g/L água de maceração de milho, 7,5 g/L de extrato de levedura, acrescido de 10 mL da suspensão de células bacterianas de *B.subtilis* e completado volume de 50 mL com água destilada. A incubação foi realizada em shaker (Tecnal® shaker model TE-420) sob agitação constante a 120 rpm, 28°C, fotoperíodo de 12h, por 96 horas.

Os fermentados foram filtrados em membrana milipore® 12 micras com auxílio de bomba de vácuo, removendo as células da bactéria, e imediatamente congelados para posterior análise.

### **Procedimento de extração**

Uma alíquota de 10 mL dos filtrados de cultura de *B. subtilis*, já sem células do microrganismo, foi adicionada à 50 mL dos solventes orgânicos, etanol, metanol, acetato de etila e hexano. As soluções permaneceram em agitação constante em temperatura ambiente e acopladas a condensador por 24h. Decorrido este período foram colocadas para precipitar em funil por 24h (etanol e metanol) e 2 horas (acetato de etila) e 1h (hexano). O sobrenadante foi acondicionado em freezer para análises.

### **Procedimento e equipamentos para cromatografia**

As análises por cromatografia gasosa foram efetuadas em um cromatógrafo gasoso da Agilent Technologies 6890 acoplado a um espectrômetro de Massas Agilent Technologies 5975 B inert XL EI/CI MSD, com injetor automático Agilent Technologies 7683 B. Coluna J&W Scientific DB5-MS -Temperatura máxima de 325°C - (30mx0.32mm, 0.25um). Fluxo de gás Hélio 2mL/min, pressão de 5.05psi. Temperatura do injetor 250°C; Seringa de 10uL, com injeção de 1uL; Temperatura



inicial do forno de 60°C por 1min e após aquecimento de 15°C por min até 280°C. Para a fragmentação dos compostos foi utilizado uma energia de 70 ev no espectrômetro de Massas.

### **Determinação da indução de resistência em feijoeiro**

Foram utilizadas sementes de feijão cultivar Minuano, com resposta de suscetibilidade à antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*, previamente desinfestadas em banho de álcool 70% por 30 segundos, banho em hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos seguido por três banhos de 30 segundos cada, em água destilada e esterilizada. As sementes permaneceram em temperatura ambiente no laboratório por 2 horas para secagem. O experimento foi conduzido em casa de vegetação climatizada, utilizando vasos com capacidade de 3L preenchidos com substrato comercial. Foi realizada suplementação nutricional com solução nutritiva completa. O delineamento utilizado foi blocos ao acaso, com quatro repetições.

### **Aplicação dos tratamentos via semente**

No momento da semeadura foi aplicado 1 mL de cada tratamento para cada 100 sementes previamente desinfestadas. Os tratamentos utilizados foram: suspensão de estruturas biológicas de *Bacillus subtilis*, realizada com o produto comercial Rhizolyptus<sup>®</sup> (1 x 10<sup>9</sup>UFC/mL); ou filtrado de cultura.

### **Aplicação dos tratamentos via foliar**

Quando as plantas iniciaram a emissão dos botões florais, indicando o início do período reprodutivo, realizou-se aspersão dos tratamentos foliares com atomizador manual. Foram utilizados os mesmos tratamentos aplicados via semente, com as caldas de aplicação produzidas da seguinte maneira: A cada 40 mL do produto comercial Rhizolyptus<sup>®</sup> ou do filtrado de cultura foram acrescidos 60 mL de água destilada e esterilizada. As caldas foram aspergidas uniformemente sobre as plantas e cessado imediatamente antes de ocorrer o escorrimento. No tratamento testemunha foi aspergido apenas água.

### **Coleta do material vegetal para análise**

Após dois dias das aplicações foliares, realizaram-se coletas de material vegetal para as análises bioquímicas. Foram coletadas a segunda e terceira folha de cada planta,

acondicionadas em sacos plásticos fechados, identificados e imediatamente colocadas sob refrigeração. Em ambiente de laboratório, e sob refrigeração, foram retiradas as nervuras das folhas e foram pesadas e separadas amostras para cada análise a ser realizada e colocadas em freezer -20°C. Para análise de AIA oxidase foram coletadas raízes, priorizando a raiz principal e raízes mais velhas e desprezando pêlos absorventes e raízes secundárias até obter 1 g de peso fresco, o material foi separado, identificado e congelado a -20°C até a análise.

### **Inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum***

Após a primeira coleta de material vegetal, as plantas foram aspergidas com uma suspensão de esporos de *C. lindemuthianum*, na concentração de  $3,5 \times 10^5$  esporos por mL. As plantas permaneceram em câmara úmida em temperatura entre 18 e 20°C. Cinco dias após, quando iniciaram os primeiros sintomas, realizaram-se novas coletas para as análises bioquímicas, da mesma maneira como descrito para a primeira coleta. Foi mantido um tratamento controle, em que as plantas não foram inoculadas.

### **Avaliação da área abaixo da curva de progresso da doença e índice de doença**

A partir do quinto dia após a inoculação, quando as plantas começaram a apresentar os sintomas foliares da doença, foram realizadas avaliações diárias com base em uma escala diagramática atribuindo-se notas de 1 (sem sintomas de doença) à 9 (infecção muito severa) (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003). Com base nessas avaliações foi calculado a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN, 1990), conforme a seguinte fórmula:

$$AACPD = \sum \left[ \left( \frac{Y_1 + Y_2}{2} \right) * (t_2 - t_1) \right] \quad (1)$$

Onde:

$Y_1$ : nota da avaliação no tempo  $t_1$ ;

$Y_2$ : nota da avaliação consecutiva no tempo  $t_2$ ;

$t_2 - t_1$ : intervalo em dias entre duas avaliações consecutivas.

A severidade da doença foi avaliada no décimo dia após a inoculação (d.a.i.). Foi utilizada a mesma escala diagramática e as notas convertidas no índice de doença (ID) de McKinney (MCKINNEY, 1923):

$$ID (\%) = \frac{\sum(Y * X_y)}{(X_t * h)} * 100 \quad (2)$$

Y: nota;

X<sub>y</sub>: número de plantas com esta nota;

X<sub>t</sub>: número total de plantas;

h: valor máximo da escala.

### **Determinação da atividade da peroxidase**

Para a determinação da atividade da peroxidase, 0,2 g de tecido congelado foi macerado com aproximadamente 1 mg de polivinilpirrolidona, acrescido de 20 mL de tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). O homogeneizado foi filtrado, centrifugado a 6.000 rpm por 30 minutos e o precipitado foi descartado, todo o procedimento foi realizado em temperatura máxima de 4°C.

A atividade da peroxidase foi determinada utilizando-se a metodologia descrita por Matsuno; Uritani (1972), apud CAMPOS et al., (2004, p. 639). Em tubos previamente imersos em banho de gelo foram misturados 2,5 mL de tampão fosfato-citrato pH 5,0 (fosfato de sódio dibásico 0,2 M e ácido cítrico 0,1 M), 1,5 mL de extrato enzimático e 0,25 mL de guaiacol 0,5%, e 0,25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e em seguida misturados em vortex por 15 segundos. Esta mistura foi incubada em banho de água a 30°C, por 15 minutos. Após foi adicionado 0,25 mL de solução de metabissulfito de sódio a 2%. As amostras foram novamente misturadas em vortex e deixadas em repouso de 10 minutos.

Como controle para a reação enzimática, o extrato enzimático foi substituído por água. A absorvância foi lida a 450 nm, em espectrofotômetro UV PC Shimadzu. A atividade da enzima foi expressa em unidade enzimática (UE). Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de extrato enzimático que acusou um aumento na

absorvância de 0,001 unidade por minuto (CAMPOS et al, 2004), expressa por grama de tecido fresco para atividade da enzima e mg de proteína para atividade específica.

### **Determinação da $\beta$ -1,3-glucanase**

A determinação da atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase foi realizada pelo método de Abeles e Forrence (1970) modificado (CAMPOS et al., 2009). As folhas congeladas foram maceradas à temperatura de 2°C, em tampão citrato de sódio 0,1 M (pH 5,4), contendo 0,1% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoetanol e 0,1% (p/v) de L-ácido ascórbico.

O homogeneizado foi centrifugado a 15.000 g por 30 min na temperatura de 0 a 4°C. O precipitado foi descartado e, 0,5 mL do sobrenadante foi tratado com 1 mL acetona gelada a -20°C, por 90 minutos. A suspensão foi centrifugada a 15.000 g por 30 min entre -4 e 0°C. Os precipitados sedimentados foram secos a vácuo, por 48 horas, em temperatura ambiente, e ressuspensos em 62,5  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,2). A essa suspensão, foi adicionado 0,1 mL de laminarina a 4%, e a mistura foi incubada a 40°C por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 375  $\mu$ L do reagente dinitrossalicilato à mistura, seguida de aquecimento em banho de água fervente por 5 min.

A solução colorida resultante foi diluída com 4,5 mL de água e agitada em vortex. As leituras das absorvâncias foram realizadas a 500 nm, em espectrofotômetro UV PC Shimadzu. A atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase foi expressa em nmol por mg de tecido fresco, para observação da velocidade de reação, e a atividade específica em nmol por mg de proteína.

### **Determinação do teor de proteína**

A concentração total de proteínas solúveis foi medida utilizando uma curva padrão de albumina de soro de bovino de acordo com o método de Bradford, (BRADFORD, 1976), no extrato vegetal preparado para a leitura da atividade de peroxidase.

### **Determinação da atividade de AIA – oxidase**

Na preparação do extrato enzimático para determinar a atividade de AIA oxidase foi utilizada a metodologia proposta por Saleh (1981) com modificações. Para a obtenção do extrato, 1 g de raiz congelada foi macerada com a utilização de nitrogênio

líquido, acrescido de 2,5 mL de água destilada. O extrato obtido foi centrifugado a 30000 g por 30 min. Todo o processo realizado em temperatura máxima de 4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinação da enzima e o precipitado descartado. Para a determinação da atividade de AIA – oxidase 0,5 mL do extrato preparado foi acrescido de 0,5 mL de uma solução contendo 1 mM de AIA, 0,25 mL 2,4 dichlorophenol (1 mM), 0,25 mL MnCl<sub>2</sub> (1 Mm), e 1 mL de água destilada a 25°C. O substrato-enzima foi incubado por 60 minutos a temperatura de 25°C. A reação foi interrompida com a adição de 2 mL da mistura contendo 1mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5M em 50 mL de HClO<sub>4</sub> 35% e a leitura realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV 1601 PC em 530 nm utilizando curva padrão (GORDON; WEBER 1950). A atividade da enzima foi expressa em µmol de AIA degradado por g de tecido fresco durante 60 min.

### **Procedimento estatístico**

Para cada variável analisada foi calculada a média e verificada a normalidade dos dados, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, foi realizada a análise de variância por meio do teste F a 5 % de probabilidade e as diferenças entre as médias foram comparadas por meio do teste de Scott-Knott, em nível de 5% de probabilidade, usando o aplicativo SISVAR (FERREIRA, 2011). As análises de correlação foram realizadas com o auxílio do programa GENES (CRUZ, 2006).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Atividade biológica de filtrados de cultura sobre plântulas de *Phaseolus vulgaris***

A avaliação da atividade biológica sobre plântulas de feijão, determinada pelo efeito sobre a germinação, comprimento de parte aérea, raiz e total e massa seca de plântulas (Tabela 1) demonstrou que a utilização dos filtrados de *B. subtilis* não alteram a germinação das sementes mas promovem desempenho de crescimento e acúmulo de massa superiores ao tratamento controle, em que foi utilizada apenas água aplicada às sementes. Ambos os microrganismos já foram relatados como promotores do crescimento de plântulas de feijão, quando aplicados os organismos vivos às sementes, beneficiando a plântula mesmo depois que esta torna-se independente das reservas de sementes (JUNGES et al., 2015).

### Identificação dos compostos presentes no filtrado de cultura

A extração realizada no filtrado de cultura de *Bacillus subtilis* seguida pela identificação dos compostos em cromatografia gasosa demonstrou a presença de vários compostos, principalmente ácidos graxos e oxilipinas (Tabela 2). A utilização do solvente Hexano permitiu a identificação de mais compostos, cujos picos se destacaram do efeito da matriz.

Tabela 1 – Variação na concentrações de sacarose, água de maceração de milho (AMM) e extrato de levedura, em meio de cultivo para o crescimento de *Bacillus subtilis* avaliado em plântulas de feijão.

	Sacarose (g/L)	AMM (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Comp. PA (cm)	Comp. Raiz (cm)	Comp. Total (cm)	Massa seca (mg)	Germ. (%)
<i>Bacillus subtilis</i>	5	15	10	4,50 b	7,00 b	11,49 b	23,00 b	73 a
	15	15	5	5,42 b	8,77 a	14,19 b	25,50 b	72 a
	15	25	5	5,28 b	7,81 b	13,09 b	26,00 b	65 a
	15	25	10	4,88 b	7,27 b	12,15 b	24,00 b	67 a
	5	25	10	5,18 b	7,40 b	12,58 b	29,00 b	79 a
	15	15	10	5,25 b	7,66 b	12,90 b	27,00 b	47 a
	5	25	5	5,44 b	8,40 a	13,84 b	30,25 b	62 a
	10	20	7,5	6,78 a	10,59 a	17,37 a	39,50 a	82 a
Água	-	-	-	4,61 b	7,44 b	12,05 b	24,50 b	64 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

No filtrado de cultura de *B. subtilis* foi identificada a presença do ácido linoleico ((9Z,12E) -octadeca-9,12-dienoic acid), assim como vários ácidos graxos com cadeia longa, acima de 10 carbonos. Em geral, a eficiência fungicida de ácidos graxos aumenta com um aumento no comprimento da cadeia (SYLVAIN; LUCIA; ELISABETTA, 2009). A oxidação de ácidos graxos, principalmente o linoleico e linolênico, origina oxilipinas, uma família de metabólitos secundários com estrutura e atividade biológica diversa. Além de ação antifúngica as oxilipinas são reguladoras de respostas de defesa da planta (PROST et al., 2005). Um exemplo de compostos da classe das oxilipinas são os jasmonatos, hormônios vegetais que atuam no desenvolvimento da planta e na regulação da resposta a estresses bióticos e abióticos (KAZAN; MANNERS, 2008).

Outro composto identificado no filtrado de cultura de *B. subtilis*, foi o ácido tetradecanoico (ácido mirístico). Este ácido graxo inibe a enzima N –

myristoyltransferase causando uma modificação irreversível, esta enzima utilizada como catalizadora para síntese de várias proteínas pelos fungos e leveduras (LANGNER et al., 1992; CARBALLEIRA, 2002; BHATNAGAR et al., 1998). Desta maneira o filtrado de cultura de *B. subtilis* exibe mais uma forma de inibição de fungos, seja pela ação de ácidos graxos diretamente na parede celular, causando desorganizações irreversíveis, inibidor de enzimas essenciais para a formação de proteínas ou como indutor de resposta de defesa em plantas.

Tabela 2 – Identificação dos componentes presentes no filtrado de cultura de *Bacillus subtilis* extraídos com quatro solventes, hexano, acetato de etila, metanol e etanol, o tempo de retenção (TR) e unidade área (UA).

NOMENCLATURA IUPAC	HEXANO		ACETATO ETILA		METANOL		ETANOL	
	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área	TR (min)	Área
<b>ÁCIDOS GRAXOS</b>								
(E)-icos-5-ene	4,303	116791	x	x	x	x	x	x
3-cyclohexyl-1,3-diazaspiro[4.5]decane-2,4-dione	4,826	86978	x	x	x	x	x	x
1-O-pentadecyl 2-O-prop-2-enyl oxalate	7,545	178821	x	x	x	x	x	x
1-O-pentadecyl 2-O-prop-2-enyl oxalate	8,175	43003	x	x	x	x	x	x
1-(Decyloxy)decane	8,424	236235	x	x	x	x	x	x
Nonadecane	9,271	182188	x	x	x	x	x	x
Nonadecane	10,075	218271	x	x	x	x	x	x
Nonadecane	10,838	267862	x	x	x	x	x	x
1-Chlorododecane	11,567	137502	x	x	x	x	x	x
(E)-icos-5-ene	12,253	66309	x	x	x	x	x	x
1-O-pentadecyl 2-O-prop-2-enyl oxalate	12,909	78959	x	x	x	x	x	x
Tetradecanoic acid	x	x	11,755	74442	x	x	x	x
(9Z,12E)-octadeca-9,12-dienoic acid	x	x	x	x	20,022	292990	x	x
(3R)-3-hydroxydodecanoic acid	x	x	x	x	x	x	11,797	99442
<b>OXIDRILAS</b>								
O-decylhydroxylamine	4,440	622703	x	x	x	x	x	x
1-octoxyoctane	4,648	79929	x	x	x	x	x	x
O-decylhydroxylamine	8,903	103746	x	x	x	x	x	x
Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	x	x	x	x	12,566	143510	12,566	130133
<b>OUTROS COMPOSTOS</b>								
Cyclodecanol	5,152	57721	x	x	x	x	x	x
(2R,3R,4S,5S,6R)-2-[(2S,3S,4S,5R)-3,4-dihydroxy-2,5-bis(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxy-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol	x	x	x	x	8,818	2112281	8,878	1926432



### Determinação da indução de resistência em feijoeiro

A utilização de *Bacillus subtilis* independente da forma de aplicação, seja suspensão de células ou filtrado de cultura, aplicados via semente ou foliar reduzem significativamente o progresso da antracnose do feijoeiro, medida pela AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença) e a severidade dos sintomas, determinada pelo Índice de Doença de McKinney (Tabela 3). Estes resultados demonstram a capacidade deste microrganismo em atuar como indutor de resistência à antracnose em feijoeiro e estão de acordo com outros autores, que também relatam a ação de *B. subtilis* como indutor de respostas de resistência em plantas à doenças (LAHLALI et al., 2013; COMPANT et al., 2005; ONGENA et al., 2007).

A identificação cromatográfica dos compostos presentes no filtrado de cultura de *B. subtilis*, demonstrou a produção de diversos ácidos graxos em meio líquido. Os ácidos graxos tem ação antimicrobiana sobre fungos e bactéria por causar perturbação na camada fosfolipídica da membrana ou inibir vias biossintéticas de ácido graxos (POHL; KOCK; THIBANE, 2011). Aliado a isso, a oxidação dos ácidos graxos origina oxilipinas, compostos comumente encontrados como metabólitos secundários de plantas com ação antifúngica e indutora de resposta de defesa em plantas (PROST et al., 2005). A ação antifúngica dos ácidos graxos é destacada como substituta aos produtos químicos para controle de doenças de plantas, reduzindo os impactos negativos causados ao meio ambiente (LIU et al., 2008).

Tabela 3 – Avaliação da AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença) e do Índice de Doença de McKinney (%) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com *Bacillus subtilis* via semente ou foliar, determinada antes e depois da inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

Tratamentos	AACPD	Índice de doença
Suspensão de células via semente	4,25 B	13,7 B
Filtrado de cultura via semente	5,47 B	18,0 B
Suspensão de células via foliar	3,56 B	13,7 B
Filtrado de cultura via foliar	4,75 B	18,0 B
Controle não inoculado	3,50 B	11,0 B
Controle não tratado	7,87 A	30,2 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

As peroxidases participam de vários processos fisiológicos relacionadas à resposta de defesa de plantas, geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), produção ou catálise de lignina, aumentando resistência do tecido vegetal à penetração ou crescimento de

fitopatógenos, suberização, catabolismo de auxinas e cicatrização de ferimentos, síntese de fitoalexinas (ALMAGRO et al., 2009). Campos et al. (2004) demonstraram a influência das enzimas peroxidase e polifenoloxidase na resistência de feijoeiro à antracnose. A síntese destas enzimas pode ser induzida por organismos não virulentos, como demonstrado por Campos et al. (2009) em que um isolado de *C. lindemuthianum* da raça delta, avirulento, diminuiu a severidade da doença com potencial para controlar a antracnose do feijoeiro.

Antes da presença do patógeno não houve diferença entre os tratamentos nos níveis da atividade de peroxidase (Tabela 4). O filtrado de cultura aplicado via foliar e a aplicação do microrganismo vivo via semente, apresentaram atividade específica de peroxidase significativamente superior após a infecção, assim como superiores aos demais tratamentos quanto à atividade específica no início do aparecimento dos sintomas (Tabela 4). A aplicação via semente com ação em parte aérea demonstra a ação sistêmica do efeito de indução.

Tabela 4 – Avaliação da atividade específica da peroxidase (UE mg<sup>-1</sup> tecido) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com *Bacillus subtilis* via semente ou foliar, determinada antes e após da inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

TRATAMENTOS	Atividade Específica	
	Antes da inoculação	Após a inoculação
Suspensão de células via semente	69,60 Ab	116,15 Aa
Filtrado de cultura via semente	54,38 Aa	87,71 Ba
Suspensão de células via foliar	61,84 Aa	85,49 Ba
Filtrado de cultura via foliar	57,86 Ab	125,96 Aa
Controle não inoculado	67,75 Aa	92,84 Ba
Controle não tratado	75,67 Aa	72,40 Ba

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

De acordo com Sbalcheiro, Denardin e Brammer (2009), *Bacillus* sp. foi capaz de induzir a presença de isoperoxidasas em plântulas de feijoeiro, atuando no biocontrole do cretamento bacteriano comum do feijoeiro, mostrando ser efetivo na indução de enzimas relacionadas às defesas das plantas tanto em aplicações via semente como em aplicações por aspersão em plantas.

A atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase foi influenciada pelos tratamentos, mantendo-se nos níveis de uma planta saudável (Tabela 5). A atividade da enzima demonstra que após a infecção, as plantas que não receberam tratamento apresentavam menor atividade. A aplicação do organismo vivo fez com que as plantas mantivessem os mesmos valores de plantas não inoculadas e que a aplicação do filtrado de cultura seja via semente ou foliar produzisse uma velocidade de resposta ainda maior.

A análise da correlação entre a AACPD e a atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase após a inoculação do patógeno foi negativa e estatisticamente significativa ( $R = 0,79$ ), assim como a correlação entre o índice de doença e atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase ( $R = 0,81$ ). Estes resultados podem ser atribuídos à redução do progresso e severidade da doença pelo estímulo de indução da resistência pela bactéria indutora, elevando a atividade dessa enzima, com isto, dificultando a penetração e estabelecimento do patógeno. Para as demais variáveis a correlação não foi significativa.

Tabela 5 – Avaliação da atividade da  $\beta$ -1,3-glucanase ( $\text{nM.mg}^{-1}$  de proteína) em plantas de feijão cultivar Minuano tratadas com *Bacillus subtilis* via semente ou foliar, determinada antes e após a inoculação do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

TRATAMENTOS	Atividade Específica	
	Antes	Após
Suspensão de células via semente	7,5 Aa	7,6 Aa
Filtrado de cultura via semente	6,8 Aa	8,9 Aa
Suspensão de células via foliar	6,2 Aa	6,5 Aa
Filtrado de cultura via foliar	5,2 Aa	6,7 Aa
Controle não inoculado	7,0 Aa	7,5 Aa
Controle não tratado	7,9 Aa	4,4 Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

O estímulo de indução de resistência apresentado pela aplicação do filtrado de cultura pode ser atribuído à ação antifúngica dos ácidos graxos produzidos por *B. subtilis* na condição de cultivo em meio líquido, assim como a oxidação destes compostos e produção de oxidrilas,

precursoras de jasmonatos, sinalizadores de respostas de defesa em plantas, responsáveis pelo desencadeamento de resposta de defesa como produção de peroxidase e  $\beta$ -1,3 glucanase.

Os teores de proteína também foram influenciados pela aplicação dos tratamentos (Tabela 6). Nas plantas em que não foi realizado nenhum tratamento, os teores de proteína foram significativamente superiores após a infecção. A aplicação do organismo via semente, independente da formulação, foi capaz de manter os teores de proteína similares aos da planta que permaneceu sadia.

Tabela 6 – Teores de proteína (mg/g de tecido) e atividade da enzima AIA oxidase ( $\mu$ mol de AIA degradado/g tecido) em feijão cultivar Minuano tratadas com *Bacillus subtilis* via semente ou foliar e inoculadas com o patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

TRATAMENTOS	PROTEÍNA		AIA OXIDASE	
	Antes	Após	Antes	Após
Suspensão de células via semente	13,6 Aa	13,5 Ba	0,46 Ab	1,39 Ba
Filtrado de cultura via semente	13,6 Aa	14,7 Ba	0,22 Ab	1,07 Ba
Suspensão de esporos via foliar	15,7 Aa	16,2 Aa	0,36 Aa	0,95 Ba
Filtrado de cultura via foliar	17,5 Aa	17,5 Aa	0,81 Ab	1,78 Aa
Controle não inoculado	14,2 Aa	14,1 Ba	0,40 Aa	1,00 Ba
Controle não tratado	13,2 Ab	19,1 Aa	0,78 Ab	1,83 Aa

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

O Ácido Indolacético (AIA) afeta a divisão, extensão e diferenciação celular das plantas, estimula a germinação de sementes e tubérculos; aumenta o desenvolvimento das raízes; induz a formação de raízes adventícias, controla processos de crescimento vegetativo, biossíntese de vários metabólitos e a resistência a condições de stress (SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011; TSAVKELOVA et al., 2006).

A atividade da AIA – oxidase, responsável pela degradação do ácido indolacético nas plantas, aumentou após a infecção pelo patógeno, em uma provável reação de redução do crescimento causada pela infecção do patógeno (Tabela 6). Na planta não inoculada e no tratamento em que foi aplicado, o organismo vivo via foliar não houve alteração na síntese de AIA oxidase. A aplicação do filtrado de cultura via foliar, assim como na planta sem

tratamento, os níveis da AIA oxidase foram superiores, indicando menores níveis do hormônio AIA no tecido radicular. Níveis altos deste hormônio estimulado por microrganismos podem ou não significar aporte no crescimento vegetal, sendo influenciado pelos teores já presentes nas plantas. Assim, quanto mais deficitária for a planta na produção natural deste hormônio, maior será o benefício da utilização de RPGP.

A utilização de uma estirpe mutante de *Pseudomonas fluorescens* BSP53a com superprodução de AIA estimulou o desenvolvimento radicular em estacas de groselha, entretanto inibiu o desenvolvimento de raízes em estacas de cereja (DUBEIKOVSKY et al., 1993) pois as estacas de groselha continham um nível abaixo do ideal de AIA que foi incrementado pela presença da bactéria, já para as estacas de cereja, cujos níveis eram normais, a elevação de AIA causou inibição do desenvolvimento.

O incremento de AIA promovido por PGPB somado aos níveis endógenos da planta pode estimular o crescimento vegetal ou induzir a síntese da enzima ACC sintase que converte o composto S-adenosyl metionina para 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), o precursor imediato de etileno em plantas superiores (GLICK, 2012). As rizobactérias promotoras de crescimento têm habilidade de reabsorver uma fração do ACC reduzindo a quantidade de etileno produzida (GLICK; PENROSE; LI, 1998). Dessa maneira, a planta se torna mais tolerante a níveis mais elevados de AIA no tecido.

Nas condições deste trabalho foi possível observar que o rearranjo proteico decorrente da inoculação do patógeno ou da aplicação dos tratamentos não afetou o acúmulo de massa em parte aérea ou raiz de plantas de feijoeiro (Tabela 7). Entretanto, com o avanço da doença e conseqüente morte do tecido, aquelas plantas mais afetadas pela antracnose demonstram redução no crescimento e desenvolvimento, evoluindo para morte do tecido vegetal.

Tabela 7 – Massa fresca e seca de plantas (mg planta<sup>-1</sup>) de feijão cultivar Minuano tratadas com *Bacillus subtilis* via semente ou foliar e inoculadas com o patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*

Tratamentos	Parte aérea		Raiz	
	Massa fresca	Massa seca	Massa fresca	Massa seca
Suspensão de células	44,94 A	4,72 A	11,70 A	1,13 A
Filtrado de cultura	38,61 A	3,94 A	8,78 A	0,86 A
Suspensão de células	45,27 A	4,64 A	11,08 A	1,13 A
Filtrado de cultura	36,42 A	3,98 A	10,89 A	1,11 A
Controle não inoculado	40,91 A	4,87 A	13,49 A	1,29 A
Controle não tratado	38,99 A	4,18 A	7,76 A	0,79 A

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

*Bacillus subtilis* induz resistência à antracnose em plantas de feijoeiro comum, reduzindo a severidade e o progresso da doença e a expressão das respostas de indução se dão na presença do patógeno desafiador;

A aplicação foliar do filtrado de cultura eleva a atividade específica de peroxidase e a velocidade de síntese de peroxidase e B-1,3-glucanase;

As respostas de indução de resistência estimuladas por *Bacillus subtilis* não comprometeram o acúmulo de massa seca nas plantas de feijoeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALMAGRO L. et al. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 2, p. 377–390, 2009.
- BHATNAGAR, et al. Structure of N-myristoyltransferase with bound myristoylCoA and peptide substrate analogs. **Nature Structural Biology**, v. 5, p. 1091-1097, 1998.
- 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.
- CARBALLEIRA, N. M. New advances in the chemistry of methoxylated lipids – a review. **Progress in Lipid Research**. v. 41, p. 437- 456, 2002.
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley e Sons, 1990. 532p.
- CAMPOS, A.D. et al., Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.7, p.637-643, 2004.
- CAMPOS, A.D. et al., Indução de resistência sistêmica à antracnose em feijoeiro comum pela raça delta avirulenta de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.15-21, 2009.
- COMPANT, S. et al. 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. 4951-4954, 2005.
- CRUZ, C.D. **Programa genes: estatística experimental e matrizes**. Viçosa: UFV, 2006. 285 p.
- DALLA PRIA, M; AMORIM, L; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.

- DIHAZI, A. et al. Use of two bacteria for biological control of bayoud disease caused by *Fusarium oxysporum* in date palm (*Phoenix dactylifera* L) seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 55, p. 7-15, 2012.
- DUBEIKOVSKY, A. N. et al., Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas Fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole- 3-acetic acid. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 9, p. 1277–1281, 1993.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109–117, 1995.
- GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63–68, 1998.
- GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 1, p.1-15, 2012.
- GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p.192–195, 1951.
- JUNGES, E. et al. Biopriming in bean seeds, **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, 2015. DOI: 10.1080/09064710.2015.1087585
- KAZAN, K.; MANNERS, J.M. Jasmonate Signaling: Toward an Integrated View. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1459–1468, 2008.
- LAHLALI, R., et al. Evidence that the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. **Phytopathology**, v.103, n.3, p. 245-254, 2013.
- LANGNER, C.A. et al. 4- Oxatetradecanoic acid is fungicidal for *Cryptococcus neoformans* and inhibits replication of human immunodeficiency virus I. **Journal of Biological Chemistry**. v. 267, p. 17159-17169. 1992.
- LIU S, et al. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. **Mycopathologia**, v. 166, n. 2, p. 93-102, 2008.
- MARTINS, S. J. et al. Biological control of bacterial wilt of common bean by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 66, n. 1, p. 65–71, 2013.
- MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, v.31, n. 9, p. 195-218, 1923.

- ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, n.4, p. 1084-1090, 2007.
- POHL, C. H.; KOCK, J. L. F.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: A review. in: MENDEZ-VILAS, A. (Ed.) **Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances**. 1 ed. Formatex: 2011. p. 61-71.
- PROST I, et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defence against pathogens. **Plant physiology**, v.139, n. 4, p. 1902-1913, 2005.
- ROMEIRO, R. S. **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, 1999. 45 p.
- SALEH, A. N. The effect of kinetin on the indolacetic acid level and indolacetic acid oxidase activity in roots of young plants. **Physiologia Plantaru**, v.51, n. 4, p. 399-401, 1981.
- SBALCHEIRO, C. C.; DENARDIN, N. D.; BRAMMER, S. P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do cretamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.1, p.29-37, 2009.
- SEO, D. J. et al., Induction of Defense Response *Against Rhizoctonia solani* in Cucumber Plants by Endophytic Bacterium *Bacillus thuringiensis* GS1. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 22, n.3, p. 407–415, 2012.
- STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biociência**, n. 11, p. 16-21, 1999.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 4, p. 1-13, 2011
- SYLVAIN, L.S; LUCIA, V.M; ELISABETTA, G. Effect of  $\alpha$ -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 129, p. 288-294. 2009.
- VECHIATO, M. H. et al. Antracnose do feijoeiro: tratamento de sementes e correlação entre a incidência em plantas e infecção de sementes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n. 1. p.83-87, 2001.
- TSAVKELOVA, E. A. et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, pp. 117–126, 2006.



## 4 DISCUSSÃO

A utilização de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* induziu respostas de defesa à antracnose, causada pelo patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, em plantas de feijão, seja pela aplicação dos organismos vivos ou dos filtrados de cultura, via semente ou foliar. Os tratamentos utilizados reduziram a severidade da doença quantificada pelo Índice de McKinney e o progresso da doença determinado pela Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) (Tabela 3 artigo 1 e Tabela 3 artigo 2). Na comparação realizada por contrastes ortogonais entre os dois organismos nas mesmas formas de aplicação (Tabela 1), é possível observar que eles não diferem entre si quanto à redução da severidade e do progresso da doença.

Para realizar as comparações, nas demais variáveis analisadas, foram consideradas apenas as determinações feitas após a inoculação do patógeno desafiante, uma vez que as respostas de defesa foram significativas a partir desse momento em ambos os estudos. Na determinação da atividade específica da peroxidase é possível observar que para *T. harzianum* a aplicação foliar, seja organismo vivo ou filtrado de cultura, produzem uma resposta mais rápida na elevação desta enzima no tecido vegetal (Tabela 4 artigo 1), já para *B. subtilis*, apenas o filtrado de cultura, também aplicado às folhas, elevam significativamente a velocidade de resposta (Tabela 4 artigo 2). Na comparação entre os organismos (Tabela 1), eles diferiram entre si apenas quando realizada a aplicação foliar de células bacterianas ou esporos fúngicos, quando *T. harzianum* é superior à aplicação de *B. subtilis*.

Na avaliação da atividade específica de peroxidase, quando se considera a enzima em função do teor de proteína do tecido vegetal, a aplicação foliar de *T. harzianum*, é a que produz a melhor resposta (Tabela 4 artigo 1), porém para *B. subtilis* o filtrado de cultura via foliar e a suspensão de células via sementes são as de melhor resposta (Tabela 4 artigo 2). Quando comparados entre si, os dois organismos diferem apenas na resposta da aplicação de células vivas via foliar, quando se observa que *T. harzianum* é capaz de induzir maiores teores desta enzima responsável por respostas a diferentes estresses, inclusive os causados pela infecção de patógenos (Tabela 1).

A  $\beta$ -1,3-glucanase atua sobre a parede celular dos fungos, sendo uma das formas de defesa contra patógenos que pode ser estimulada por organismos de biocontrole. Para esta variável também é possível observar que a aplicação foliar de *T. harzianum*, independente se suspensão de células ou filtrado de cultura, produz as respostas de indução mais rápidas (Tabela 5 artigo 1), e estas respostas são significativamente superiores às produzidas por *B.*

*subtilis* (Tabela 1). Na avaliação da atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase se observa que todos os tratamentos são superiores ao controle não tratado, e que novamente a aplicação foliar de esporos de *T. harzianum* supera o desempenho da aplicação foliar de células de *B. subtilis* (Tabela 1).

Nas demais variáveis analisadas não se observa diferença significativa na comparação realizada por contrastes ortogonais entre *T. harzianum* e *B. subtilis* (Tabela 1). Os efeitos dos tratamentos são observados nas comparações dos diferentes métodos de aplicação para cada organismo testado (artigo 1 e artigo 2).

A análise cromatográfica dos compostos presentes nos filtrados de cultivo de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* demonstrou a presença de ácidos graxos com ação antifúngica e indutores de respostas de defesa de plantas. Cada microrganismo demonstrou um padrão diferente de compostos secretados em meio de cultivo, havendo predominância de ácido linolênico e ácido oleico no filtrado de *T. harzianum* e ácidos graxos de cadeia longa no filtrado de cultura de *B. subtilis* (artigo 1 e artigo 2). Os ácidos graxos se ligam às membranas celulares de fungos, causando uma desorganização estrutural, alterações da permeabilidade que podem chegar a causar a morte da célula, agindo como compostos fungicidas (AVIS; BÉLANGER 2001).

A oxidação de ácidos graxos, principalmente o linoleico (18: 2) e linolênico (18: 3), origina oxilipinas, metabólitos secundários com estrutura e atividade biológica diversa. Entre as atividades biológicas das oxilipinas, Prost et al. (2005) relatam ação antifúngica e também reguladora de respostas de defesa da planta. Os jasmonatos, exemplos de oxilipinas, atuam como hormônios vegetais interferindo no desenvolvimento da planta e na regulação da resposta a estresses bióticos e abióticos (KAZAN; MANNERS, 2008).

No filtrado de *B. subtilis* foram observados vários ácidos graxos com cadeia longa, acima de 10 carbonos, cuja eficiência fungicida aumenta quanto maior o comprimento da cadeia (SYLVAIN; LUCIA; ELISABETTA, 2009). Aliado a isso se determinou a presença do ácido tetradecanoico (ácido mirístico) inibidor da enzima N –myristoyltransferase causando uma modificação irreversível, esta enzima utilizada como catalizadora para síntese de várias proteínas pelos fungos e leveduras (LANGNER et al., 1992; CARBALLEIRA, 2002; BHATNAGAR et al., 1998). Dessa maneira se observa uma presença acentuada no filtrado de cultura de *B. subtilis* de compostos com ação antifúngica aliado à ação das oxilipinas como indutoras de resposta de defesa vegetal.

A presença abundante de ácido linoleico no filtrado de cultura de *Trichoderma harzianum* pode ser o responsável pelas respostas de defesa observada na aplicação foliar deste organismo, sendo este o principal ácido graxo que dá origem à oxilipina jasmonato.

Ambos organismos produzem compostos diferentes e respostas de indução de defesa positivas, reduzindo a severidade e o progresso da antracnose em feijoeiro, essa gama de benefícios se configura como uma ferramenta com potencial para utilização em programas de manejo da doença à campo, cuja ação associada ainda deve ser investigada.

Tabela 1 – Contrastes ortogonais (Y1, Y2, Y3 e Y4): Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), índice de doença de McKinney (ID), atividade específica de peroxidase (AEPO), atividade específica de  $\beta$ -1,3-glucanase (AEBE), teor de proteína (PROT), AIA oxidase (AIAOXI), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa seca de parte aérea (MSPA), massa fresca de raiz (MFRA), massa seca de raiz (MSRA) em plantas de feijão inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*, tratadas com *Trichoderma harzianum* ou *Bacillus subtilis* organismo vivo ou bioproduto produzido a partir de filtrado de cultura, aplicados via semente ou foliar.

Contrastes	AACPD		ID		AEPO		AEBE		PROT	
	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05
Y1: T1 vs T2	4,10 a	0,8525 <sup>ns</sup>	15,2 a	0,6374 <sup>ns</sup>	113,01 a	0,8710 <sup>ns</sup>	8,83 a	0,3539 <sup>ns</sup>	11,99 a	0,3599 <sup>ns</sup>
	4,25 a		13,7 a		116,15 a		7,60 a		13,50 a	
Y2: T3 vs T4	4,50 a	0,1706 <sup>ns</sup>	16,7 a	0,6943 <sup>ns</sup>	94,07 a	0,7422 <sup>ns</sup>	9,91 a	0,4122 <sup>ns</sup>	11,72 a	0,0759 <sup>ns</sup>
	5,47 a		18,0 a		87,71 a		8,90 a		14,70 a	
Y3: T5 vs T6	4,00 a	0,5167 <sup>ns</sup>	14,0 a	0,9372 <sup>ns</sup>	153,30 a	0,0015*	9,87 a	0,0117*	18,60 a	0,1427 <sup>ns</sup>
	3,56 a		13,7 a		85,49 b		6,50 b		16,20 a	
Y4: T7 vs T8	3,50 a	0,0713 <sup>ns</sup>	11,0 a	0,0346 <sup>ns</sup>	130,79 a	0,8025 <sup>ns</sup>	8,56 a	0,1533 <sup>ns</sup>	16,85 a	0,6858 <sup>ns</sup>
	4,75 a		18,0 a		125,96 a		6,70 a		17,50 a	
Contrastes	AIAOXI		MFPA		MSPA		MFRA		MSRA	
	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05
Y1: T1 vs T2	1,05 a	0,4516 <sup>ns</sup>	41,99 a	0,5278 <sup>ns</sup>	4,69 a	0,9550 <sup>ns</sup>	12,69 a	0,7342 <sup>ns</sup>	1,23 a	0,7084 <sup>ns</sup>
	1,39 a		44,94 a		4,72 a		11,70 a		1,13 a	
Y2: T3 vs T4	1,00 a	0,08886 <sup>ns</sup>	41,85 a	0,4891 <sup>ns</sup>	4,34 a	0,4918 <sup>ns</sup>	9,78 a	0,7297 <sup>ns</sup>	1,02 a	0,5600 <sup>ns</sup>
	1,07 a		38,61 a		3,94 a		8,78 a		0,86 a	
Y3: T5 vs T6	0,69 a	0,5574 <sup>ns</sup>	39,92 a	0,2568 <sup>ns</sup>	4,50 a	0,8113 <sup>ns</sup>	8,91 a	0,4579 <sup>ns</sup>	0,90 a	0,4088 <sup>ns</sup>
	0,95 a		45,27 a		4,64 a		11,08 a		1,13 a	
Y4: T7 vs T8	1,27 a	0,2562 <sup>ns</sup>	36,43 a	0,9987 <sup>ns</sup>	3,69 a	0,6122 <sup>ns</sup>	7,59 a	0,2613 <sup>ns</sup>	0,81 a	0,2822 <sup>ns</sup>
	1,78 a		36,42 a		3,98 a		10,89 a		1,11 a	

\*Contraste significativo pelo teste de Scheffé, em 5% de probabilidade de erro (p<0,05); <sup>ns</sup> contraste não significativo pelo teste de Scheffé, em 5% de probabilidade de erro (p<0,05); T1: *T. harzianum* aplicado via semente; T2: *B. subtilis* aplicado via semente; T3: Filtrado de cultura de *T. harzianum* aplicado via semente; T4: Filtrado de cultura de *B. subtilis* aplicado via semente; T5: *T. harzianum* aplicado via foliar; T6: *B. subtilis* aplicado via foliar; T7: Filtrado de cultura de *T. harzianum* aplicado via foliar; T8: Filtrado de cultura de *B. subtilis* aplicado via foliar.

## CONCLUSÕES

*Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* produzem ácidos graxos e oxilipinas com ação antifúngica em meio líquido;

*Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis* agem no controle da antracnose em feijoeiro e na indução de resposta de defesa das plantas;

As melhores respostas para *T. harzianum* são observadas nas aplicações foliares, seja de suspensão de esporos ou filtrado de cultura, já para *B. subtilis*, as melhores respostas são observadas na aplicação foliar do filtrado de cultura.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, p.456-462, 2008.
- AVIS, T.J.; BÉLANGER, R.R. Specificity and mode of action of the antifungal fatty acid cis-9-heptadecenoic acid produced by *Pseudozyma flocculosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 956-960. 2001.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.7-14.
- BHATNAGAR, R.S. et al. Structure of N-myristoyltransferase with bound myristoylCoA and peptide substrate analogs. **Nature Structural Biology**. v.5, p.1091-1097. 1998.
- CARBALLEIRA, N. M. New advances in the chemistry of methoxylated lipids – a review. **Progress in Lipid Research**. v. 41, p. 437- 456, 2002.
- CARVALHO, D.C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.28-34, 2011.
- FIGUEIRÊDO, G.S. et al. Biological and Chemical Control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma* spp. and *Ulocladium atrum* and Pathogenicity to Bean Plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.53, n.1, p.1-9, 2010.
- HAGEDORN, D.J; INGLIS, D.A. **Handbook of bean diseases**. 1986. Disponível em <<http://learningstore.uwex.edu/assets/pdfs/A3374.PDF>>.
- KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Jasmonate Signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1459-1468, 2008.
- JEGATHAMBIGAI, V. et al. Effect of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii*, the Causative Agent of Collar Rot on *Zamioculcas zamiifolia* and an on Farm Method to Mass Produce *Trichoderma* species. **Plant Pathology Journal**, v.9, n.2, p.47-55. 2010.
- LANGNER, C.A. et al. 4- Oxatetradecanoic acid is fungicidal for *Cryptococcus neoformans* and inhibits replication of human immunodeficiency virus I. **Journal of Biological Chemistry**. v. 267, p. 17159-17169. 1992.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
- LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest. Biology and Technology**, v.48, p.113-121, 2008.

ONGENA, M. et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1084-1090, 2007.

PROST, I. et al. Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defence against pathogens. **Plant Physiology**. v.139, p.1902-1913. 2005.

RYU, C.M. et al. Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, p.1017–1026, 2004.

SICHERI, R. et al. Recomendações de alimentação e nutrição saudável para a população brasileira. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 44, n. 3, 2000.

SYLVAIN, L.S; LUCIA, V.M; ELISABETTA, G. Effect of  $\alpha$ -linolenic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 129, p. 288-294. 2009.

VINALE F.F. et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, n.6, p. 80–86, 2008.