

CONTROLE DE *Bipolaris sorokiniana* EM TRIGO E INTERFERÊNCIA SOBRE DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS

Luciana Iurkiv^{1*}; Omari Dangelo Forlin Dildey¹; Sidiane Coltro-Roncato²; Edilaine Della Valentina Gonçalves-Trevisoli²; Bruna Broti Rissato³; Vandeir Francisco Guimarães⁴; José Renato Stangarlin⁴

SAP 14817 Data envio: 30/07/2016 Data do aceite: 20/12/2016
Sci. Agrar. Parana., Marechal Cândido Rondon, v. 16, n. 3, jul./set., p. 321-327, 2017

RESUMO - É reconhecida a eficiência da indução de resistência no controle de fitopatógenos, no entanto, pouco se sabe a respeito da interferência desta sobre microrganismos não alvos. No presente trabalho objetivou-se verificar a interferência dos indutores acibenzolar-S-metil (ASM), mananoligossacarídeo fosforilado (MOS) e *Bacillus cereus* na atividade de peroxidases e no controle de mancha marrom, causada por *Bipolaris sorokiniana*, em trigo e a interferência destes sobre o microrganismo não alvo *Azospirillum brasilense*. O experimento foi conduzido sob cultivo protegido, em blocos ao acaso e esquema fatorial 4 x 2 x 2, com quatro repetições. O primeiro fator “Indutores de Resistência” foi constituído pelos indutores ASM, MOS, *B. cereus* e a testemunha Água. O segundo fator “Patógeno” foi constituído pela presença ou ausência do patógeno *B. sorokiniana*. O terceiro fator “BPCV – Bactéria Promotora de Crescimento Vegetal” constituiu-se pela presença ou ausência da bactéria promotora de crescimento vegetal, *A. brasilense*. Foi avaliada a severidade da doença, a atividade de peroxidases e a quantificação de microrganismos diazotróficos endofíticos. Houve redução na severidade da doença pela aplicação dos indutores de resistência, sendo que a atividade de peroxidases foi estimulada pelo indutor MOS. Não se observou interferência direta dos indutores sobre os microrganismos diazotróficos endofíticos.

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

CONTROL OF *Bipolaris sorokiniana* IN WHEAT AND INTERFERENCE ON DIAZOTROPHIC ENDOPHYTES

ABSTRACT - The induced resistance efficiency in the control of phytopathogens is recognized, however little is known about its interference on non-target microorganisms. The present study aimed to verify the induction of peroxidase activity by the use of acibenzolar-S-methyl (ASM), mannanoligosaccharide (MOS) and *Bacillus cereus* inductor in the control of spot blotch wheat disease and its interference on the non-target microorganism *Azospirillum brasilense*. The experiment was conducted under greenhouse condition. The experimental design was a randomized block in a factorial schema 4 x 2 x 2, with four replications. The first factor “Resistance Inductors” was constituted by ASM, MOS and *B. cereus* inductors and water (control). The second factor “Pathogen” was constituted by the presence or absence of *B. sorokiniana* pathogen. The third factor “PPGR” was made up by the presence or absence of the PPGR *A. brasilense*. Disease severity, peroxidase activity and quantification of endofitic diazotrophic microorganisms were assessed. There was a reduction in the disease severity by the use of resistance inductors. The activity of peroxidase was stimulated by MOS. Direct interference of the inductors on endophytic diazotrophic microorganisms was not observed.

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

INTRODUÇÃO

Inúmeras alternativas ao controle químico convencional de fitopatógenos, como forma de reduzir os danos associados ao seu emprego, tem-se mostrado eficientes. Dentre elas a utilização de agentes capazes de induzir resistência nas plantas tratadas, ativando, assim, seus próprios mecanismos naturais de defesa (WALTERS et al., 2013). A ativação deste sistema de defesa é

desencadeada por agentes de caráter biótico ou abiótico que resultam na expressão de mecanismos de defesa relacionados à produção de substâncias tóxicas ao patógeno e/ou formação de barreiras estruturais que restringem a colonização dos tecidos (KUC, 2001).

As peroxidases são responsáveis por participar de vários processos fisiológicos de grande importância (CAVALCANTI et al., 2005). Entre eles destaca-se a

¹Doutorando(a) do Programa de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Centro de Ciências Agrárias, Rua Pernambuco 1777, Caixa Postal 91, CEP 85960-000, Marechal Cândido Rondon, Paraná, Brasil. E-mail: lucianaiurkiv@gmail.com; omaridildey@hotmail.com. *Autor para correspondência

²Doutora do programa de Pós Graduação em Agronomia, UNIOESTE. E-mail: scoltr@hotmail.com; edilainevalentina@gmail.com

³Mestranda do Programa de Pós Graduação em Agronomia, UNIOESTE. E-mail: brunarissato@hotmail.com

⁴Dr., Professor da UNIOESTE. E-mail: vandeirfg@yahoo.com.br; jose.stangarlin@unioeste.br

síntese de lignina, no qual os alcoóis de fenilpropano são unidos em um polímero pela ação dessa enzima, que cataliza a oxidação desses alcoóis, gerando radicais livres intermediários que se associam de forma não enzimática em uma disposição ao acaso para formar lignina (TAIZ; ZEIGER, 2004). A lignina ou processo de lignificação pode interferir com o crescimento de patógenos através de modificações químicas nas paredes celulares (STANGARLIN et al., 2011).

São diversos os benefícios relacionados à indução de resistência, destacando-se a maior segurança para o ambiente em relação ao uso de agrotóxicos, além de evitar a seleção de cepas resistentes de patógenos em virtude do complexo multigenes, que regula esse processo (IRITI; FAORO, 2006).

Entretanto, algo que deve ser considerado, é a existência de custos relacionados ao fenômeno da indução de resistência. Heil e Baldwin (2002) definiram que o custo da resistência induzida é todo efeito negativo sobre a adaptabilidade da planta que resulta da expressão de características de defesa. O custo ecológico ocorre quando a expressão da defesa afeta negativamente as interações ecológicas da planta com organismos não alvos. A expressão de resistência a microrganismos patogênicos pode, por exemplo, prejudicar as interações da planta com fungos micorrízicos ou rizóbios (WALTERS; HEIL, 2007). Neste contexto, objetivou-se com o presente trabalho verificar a interferência dos indutores ASM, MOS e *B. cereus* na atividade de peroxidases e no controle de mancha marrom, causada por *B. sorokiniana*, em trigo e a interferência destes sobre microrganismos diazotróficos endofíticos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em cultivo protegido, no período de 20 de março a 20 de julho de 2014. A estação está localizada nas coordenadas 54 ° 22' W longitude, latitude 24° 46' S e altitude de 420 m.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso em esquema fatorial 4 x 2 x 2, com quatro repetições. O primeiro fator "Indutores de Resistência" foi constituído pelos indutores acibenzolar-S-metil (ASM) (200 mg L⁻¹ do produto comercial Bion[®]), mananoligossacarídeo fosforilado (MOS) (5 ml L⁻¹ do produto comercial Agro-Mos[®]), *B. cereus* (10⁸ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) mL⁻¹) e a testemunha Água. O segundo fator "Patógeno" foi constituído pela presença ou ausência do patógeno *B. sorokiniana* (10⁴ conídios mL⁻¹) (TRILLER; MEHTA, 1997). O terceiro fator "BPCV" constituiu-se pela presença ou ausência da bactéria promotora de crescimento vegetal *A. brasilense*, estirpes AbV5+AbV6 (4 mL por 1.000 sementes do produto comercial Nitro1000 Gramíneas). A parcela experimental foi constituída por um vaso contendo cinco plantas, totalizando 64 vasos.

Foram utilizados vasos de polietileno, cilíndricos, com capacidade para 8 dm³ de substrato. O substrato utilizado foi composto de uma mistura de solo e areia na proporção de 2:1. O solo utilizado nos ensaios foi coletado no horizonte A de um LATOSSOLO VERMELHO

Eutroférico (SANTOS et al., 2013) com textura argilosa (578,0 g kg⁻¹ de argila). A adubação foi realizada conforme recomendação de Waugh e Fitts (1966), sendo adicionados 687 mg dm⁻³ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples, 180 mg dm⁻³ de K₂O na forma de cloreto de potássio e 97 mg dm⁻³ de N na forma de ureia.

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

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

Aos 25 DAE as plantas receberam os tratamentos indutores, sendo acibenzolar-S-metil (ASM) (200 mg L⁻¹ do produto comercial Bion[®]), mananoligossacarídeo fosforilado (MOS) (5 mL L⁻¹ do produto comercial Agro-Mos[®]), *B. cereus* (10⁸ UFC mL⁻¹) e a testemunha Água. 24 h após o tratamento, as plantas foram inoculadas com o patógeno *B. sorokiniana* (FRANZENER et al., 2003), o isolado utilizado foi fornecido pela Embrapa Trigo. A inoculação foi realizada utilizando-se um atomizador contendo uma suspensão de esporos de *B. sorokiniana*, obtidos de colônias com idade de 10 dias, na concentração de 10⁴ conídios mL⁻¹ (TRILLER; MEHTA, 1997). À suspensão de esporos foi adicionado espalhante Tween-20 na proporção de 1 gota para 200 mL de suspensão (METHA et al., 1996). Após a inoculação, as plantas de trigo foram mantidas em câmara úmida por 15 h (FRANZENER et al., 2003) e após esse período permaneceram em casa de vegetação até o final das avaliações, sendo a temperatura variando entre 15 e 24 °C. As irrigações foram manuais, mantendo o substrato próximo à capacidade de campo.

Para as análises de peroxidases foram coletadas amostras de aproximadamente 0,5 g de tecido foliar, cada uma proveniente de uma planta, para cada tempo de coleta (0, 1, 2, 3, 4 e 5 dias após o tratamento (DAT)). As amostras foram homogeneizadas em 4 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) em almofariz de porcelana previamente resfriado e acrescentado 0,04 g de polivinil pirrolidona durante a maceração. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000 g, a 4 °C, durante 20 min. O sobrenadante obtido, considerado como a fração contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a -18 °C para posteriores análises bioquímicas.

A atividade de peroxidases foi determinada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A reação de conversão do guaiacol em tetraguaiacol foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm, pelo período de 2 min. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em Δ de abs. min⁻¹ mg proteína⁻¹.

O teor de proteínas totais solúveis foi determinado pelo método de Bradford (1976). Após adicionar o reagente de Bradford sob agitação e incubar as amostras por 5 min, foi efetuada leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteína foi determinada pelo emprego de curva padrão ($y = 0,0483x + 0,0275$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína (μg)). As atividades enzimáticas foram relacionadas aos teores de proteínas totais.

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

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

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

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

Foram realizados isolamento e quantificação de microrganismos diazotróficos a partir do produto comercial Nitro1000 Gramíneas utilizado na inoculação

das sementes de trigo previamente a montagem do experimento, e nas raízes no momento da inoculação dos indutores de resistência e no florescimento da cultura.

Para tanto, uma amostra de 1 g de solo ou raízes, ou 1 mL de inoculante foi homogeneizada em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,85 NaCl), obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . A partir desta efetuou-se diluições sucessivas, tomando-se 100 μL da diluição anterior e adicionando-se 900 μL de solução salina. As diluições obtidas contemplaram 10^{-1} até 10^{-8} . Através da técnica de micro gota (10 μL por gota), distribuiu-se as diluições sobre meio de cultura NFB (DOBEREINER et al., 1976), com três repetições por diluição. As placas foram incubadas a 30 °C (KUSS et al., 2007) durante 120 h, quando se realizou a contagem de colônias desenvolvidas, expresso em UFC g^{-1} solo ou raízes, UFC mL^{-1} de inoculante.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SISVAR Versão 5.3 (FERREIRA, 2014). Foi empregado teste de Tukey, para comparação entre os tratamentos, quando o valor de F foi significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Houve interação significativa tanto para o fator “Indutores de Resistência” como para o fator “BPCV” (Tabela 1).

TABELA 1. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em função do tratamento com indutores de resistência, na presença ou ausência da BPCV *Azospirillum brasilense*.

Tratamentos	AACPD		
	(+)A.b. ¹	(-)A.b.	Média
ASM	61,78 bB	133,78 abA	97,78
AgroMos	64,88 bA	32,10 cA	48,49
<i>Bacillus cereus</i>	201,10 aA	76,62 bcB	138,86
Água	178,10 aA	151,78 aA	164,94
Média	126,46	98,57	

Em que: ¹(+)A.b.: plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; (-)A.b.: plantas não inoculadas com *Azospirillum brasilense*.

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. C.V. (%) = 32,07.

Quando da presença de *A. brasilense*, os tratamentos que se apresentaram efetivos no controle da mancha marrom foram ASM e MOS. E quando da ausência de inoculação com a BPCV, os tratamentos MOS e *B. cereus* se mostraram superiores no controle da doença em relação à testemunha Água. A capacidade de reduzir a doença através da ativação de mecanismos de resistência pela aplicação dos indutores ASM, MOS e *B. cereus* é amplamente conhecida (GORLACH et al., 1996; SOYLU et al., 2003; HALFELD-VIEIRA et al., 2006; KUHN; PASCHOLATI, 2010; COSTA et al., 2010; MONTEIRO;

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

se eficiente na proteção de milho contra *Bipolaris maydis* (HUANG et al., 2010).

Observa-se (Tabela 1) que para o tratamento com ASM há uma menor severidade da doença na presença de *A. brasilense*, ao contrário do que ocorre com o tratamento *B. cereus*, o qual apresenta maior severidade da doença quando da inoculação com *A. brasilense*. Observa-se que houve uma alteração de padrão no controle da doença pelos indutores quando da presença ou ausência da BPCV. A inoculação de BPCV pode apresentar influência positiva ou negativa na indução de resistência, dependendo do patossistema e indutor envolvidos.

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

Assim como no presente trabalho, onde a combinação ASM - BPCV *A. brasilense* reduziu a severidade da doença, Myresiotis et al. (2012), investigando a eficiência do controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* em tomate pela aplicação de BPCV do gênero *Bacillus*, isoladamente ou em combinação com ASM, verificaram que para todos os isolados testados (*B. amyloliquefaciens* IN937a, *B. pumilus* SE34, *B. subtilis* FZB24 e *B. subtilis* GB03), houve maior redução na severidade da doença quando os mesmos foram combinados com ASM. Da mesma forma, ASM apresentou maior eficiência no controle da doença

quando combinado aos isolados de BPCV em relação à sua aplicação isolada.

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

No entanto, respostas negativas também foram relatadas quanto ao efeito de microrganismos simbiotes sobre a efetividade do tratamento indutor. Sonnemann et al. (2005) visando o controle de míldio em cevada, observaram efeito negativo da inoculação do fungo micorrízico *Glomus etunicatum* na efetividade de ASM. Da mesma forma, no presente trabalho, a inoculação da BPCV *A. brasilense* apresentou efeito negativo sobre a efetividade de controle de mancha marrom por *B. cereus*. Tal efeito pode estar associado a uma possível competição entre ambos por substrato e/ou energia, causando prejuízo a efetividade de *B. cereus* como indutor de resistência.

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

Aos 25 dias após a emergência (DAE), no momento do tratamento indutor, foi realizada a primeira quantificação de microrganismos diazotróficos nas raízes (Tabela 2). Houve interação tripla entre os fatores "Indutores de Resistência", "Patógeno" e "BPCV". Observa-se maior quantidade de bactérias para a testemunha Água em relação ao tratamento com *B. cereus* quando as plantas não foram inoculadas com *A. brasilense* e na ausência do patógeno *B. sorokiniana*. Assim como, superioridade da testemunha Água quando não inoculada com *A. brasilense* e na ausência do patógeno em relação ao tratamento com a presença do patógeno.

TABELA 2. Quantificação de microrganismos diazotróficos (UFC g^{-1} raízes) no momento do tratamento das plantas com os indutores de resistência (primeira avaliação nas raízes) e no momento do florescimento (segunda avaliação nas raízes).

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

Em que: ¹(+)*A.b.*: plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense*; (-)*A.b.*: plantas não inoculadas com *Azospirillum brasilense*; (+)*B.s.*: plantas inoculadas com *Bipolaris sorokiniana*; (-)*B.s.*: plantas não inoculadas com *Bipolaris sorokiniana*. ²Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ³Dados transformados para $(x + 0,5)^{1/2}$, onde x é a quantidade (UFC) de diazotróficos ($\times 10^7$).

Os resultados obtidos podem estar relacionados a uma possível relação antagonica entre *B. cereus*, assim como o patógeno *B. sorokiniana*, e os microrganismos diazotróficos. Porém, não se observou interferência entre os tratamentos indutores e *A. brasilense* especificamente,

considerando-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos inoculados com a BPCV.

B. cereus é uma bactéria habitante do solo (HELGASON et al., 2000), sendo também considerada uma bactéria promotora de crescimento vegetal (NIU et al., 2011). Dentre os mecanismos de ação que podem estar

envolvidos na redução de diazotróficos observada, estão a competição por nutrientes, antibiose, produção de enzimas extracelulares e indução de resistência (ENEBAK; CAREY, 2000; BENEDUZI et al., 2012). Porém, são poucos os trabalhos que investigam a ação de fitopatógenos sobre o desempenho de BPCV.

Souza et al. (2011), estudando o efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção de cana-de-açúcar infectadas pelo raquitismo das soqueiras, observaram que, ao contrário do esperado, a inoculação com *A. brasilense* estirpe AbV5 + *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* apresentou resultado negativo. Esperava-se que *A. brasilense* colonizasse os vasos do xilema durante o ciclo da cultura e tivesse um efeito na redução da colonização de *L. xyli* subsp. *xyli*, porém, seus níveis populacionais foram muito baixos e não detectados para a maioria dos tratamentos.

Observa-se que a testemunha absoluta apresentou a maior média na primeira avaliação nas raízes ($48,8 \times 10^7$ UFC g^{-1} raízes), e juntamente com ASM ($16,6 \times 10^7$ UFC g^{-1} raízes) e MOS ($29,1 \times 10^7$ UFC g^{-1} raízes), ambos não inoculados com *A. brasilense* e *B. sorokiniana*, Corsini et al. (2013), obtiveram resultado semelhante na cultura do arroz quando da inoculação de *A. brasilense*. Os autores observaram incremento na quantidade de diazotróficos para os tratamentos onde não houve inoculação de *A. brasilense*. Tal fato pode estar relacionado à presença de

plantas de trigo (hospedeiro) que favoreceram o aumento na concentração de bactérias nativas.

Na fase de florescimento foi realizada a segunda e última quantificação de diazotróficos nas raízes (Tabela 2). Houve interação dupla entre “Indutores de Resistência” e “Patógeno”, de forma que o tratamento com o indutor ASM na ausência do patógeno apresentou maior média em relação ao mesmo tratamento na presença do patógeno. Isso remete novamente a uma possível interação negativa entre o patógeno e a BPCV, indicando também que o indutor ASM não afetou negativamente a colonização por diazotróficos. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa.

A atividade de peroxidase (Figura 1) apresentou interação tripla e MOS teve incremento significativo no primeiro dia após o tratamento (DAT) com os indutores de resistência, exceto quando da ausência de inoculação com *A. brasilense* e *B. sorokiniana*. Essa tendência se manteve no segundo DAT, porém quando da ausência de inoculação com *A. brasilense* e *B. sorokiniana*, o tratamento *B. cereus* mostrou-se superior à Água e ASM. No terceiro e quarto DAT, MOS mostrou-se superior, exceto quando da ausência de inoculação com *A. brasilense* e *B. sorokiniana*. No quinto DAT houve superioridade de MOS em relação aos demais tratamentos quando da ausência do patógeno e presença da BPCV, e superioridade de MOS em relação à Água quando da ausência do patógeno e da BPCV.

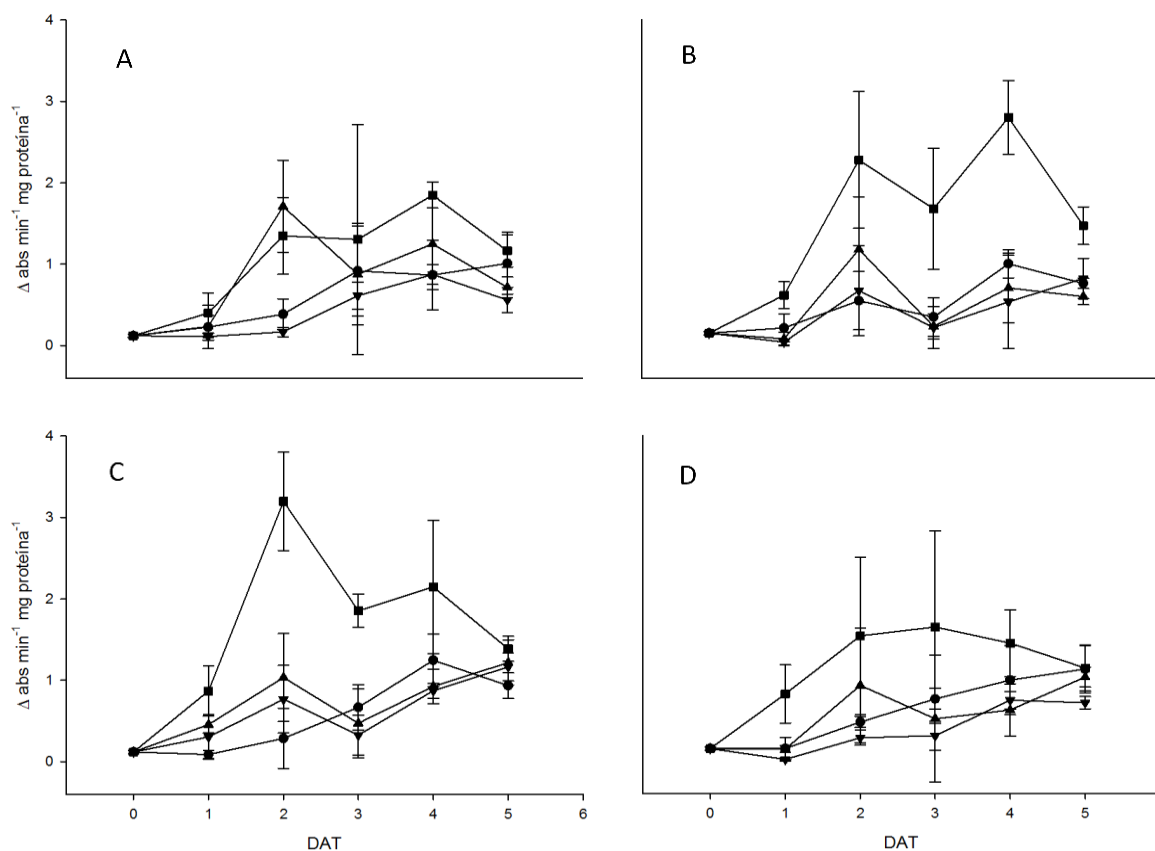


FIGURA 1 - Atividade de peroxidase em trigo tratado com indutores de resistência. Plantas não inoculadas (A e B) e inoculadas (C e D) com *Bipolaris sorokiniana*. Plantas não inoculadas (A e C) e inoculadas (B e D) com *Azospirillum brasilense*. Os tratamentos foram realizados 24 h (0 DAT) antes da inoculação do patógeno (1 DAT). (●-): ASM; (■-): AgroMos; (▲-): *Bacillus cereus*; (▼-): Água.

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

As peroxidases estão envolvidas nos processos de lignificação, suberificação, catabolismo da auxina (HIRAGA et al., 2001), respostas de hipersensibilidade, produção de fitoalexinas, grande parte destes envolvidos na defesa contra a infecção por patógenos (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). A atividade desta enzima é frequentemente aumentada em resposta aos estresses, ao ataque de patógenos e aos tratamentos com indutores, motivos pelos quais são frequentemente utilizadas como marcadores enzimáticos para estudos de resistência induzida (COSTA et al., 2010).

CONCLUSÕES

ASM, MOS e *B. cereus* mostraram-se eficientes no controle de mancha marrom em trigo, sendo que a aplicação de MOS induziu aumento na atividade de peroxidases em folhas de trigo.

A aplicação dos indutores de resistência não apresentou efeito na população de diazotróficos endofíticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEN'KINA, S.A.; TRUTNEVA, K.A.; NIKITINA, V.E. Change in the content of salicylic acid and in the activities of phenylalanine ammonia-lyase and catalase in wheat seedling roots under the effect of *Azospirillum lectins*. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Irkutsk, v.8, n.2, p.110-117, 2012.
- ALBUQUERQUE, F.A.; LIMA, J.M.; CAVALCANTI, R.W.G.; BORIN, A.L.D.C.; SARAIVA, J.P. *Azospirillum* spp. como potencial indutor de resistência a *Alabama argillacea* (Hub) em plantas de algodoeiro. In: X CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2015, Foz do Iguaçu, PR. **Resumos...** Brasília: ABRAPA, 2015.
- 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**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
- CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: Wiley, 1990. 532p.
- CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. cap.4, p.81-124.
- CORSINI, D.C.D.C.; ARF, O.; CASSIOLATO, A.M.R.; RODRIGUES, R.A.F.; SOUZA, E. Inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada na cultura do arroz de terras altas irrigado por aspersão. In: VIII Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, 2013, Santa Maria, RS. **Resumos...** Santa Maria, RS, 2013.
- COSTA, J.C.B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JR., P.M.; CAMILO, F.R.; MONTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacau contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, n.5, p.285-294, 2010.
- DOBEREINER, J.; MARRIEL, I.E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.22, n.10, p.1464-73, 1976.
- ENEBAK, S.A.; CAREY, W.A. Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Disease**, Auburn, v.84, p.306-308, 2000.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.38, n.2, p.109-112, 2014.
- FRANZENER, G.; STANGARLIN, J.R.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.25, n.2, p.503-507, 2003.
- GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUFBEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K.H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMANN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **The Plant Cell**, Rockville, v.8, p.629-643, 1996.
- HAMMERSCHMIDT, T.R.; NUCLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, Faisalabad, v.20, p.73-82, 1982.
- HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA JUNIOR, J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACAT-PEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.8, 2006.
- HEIL, M.; BALDWIN, I.T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.2, p.61-67, 2002.
- HELGASON, E.; OKSTAD, O.A.; CAUGANT, D.A.; JOHANSEN, H.A.; FOUET, A.; MOCK M.; HEGNA, I.; KOLSO A.B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*-one species on the basis of genetic evidence. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.6, p.2627-2630, 2000.
- HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A Large family of class III plant peroxidases. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v.42, n.5, p.462-468, 2001.
- HUANG, C.-J.; YANG, K.-H.; LIU, Y.-H.; LIN, Y.-J.; CHEN, C.-Y. Suppression of southern corn leaf blight by a plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* C1L. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.157, n.1, p.45-53, 2010.
- IRITI, M.; FAORO, F. Fitness costs of chemically-induced resistance: double edged sword or (un)stable equilibrium? **Journal of Plant Pathology**, v.88, n.1, p.5-6, 2006.
- KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acbenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, n.2, 2010.
- KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, p.7-1, 2001.
- KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLORES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.10, p.1459-1465, 2007.
- LEMOS, J.M. **Resposta de cultivares de trigo à inoculação em sementes com *Azospirillum brasilense*, e à adubação nitrogenada em cobertura**. 2011. 62p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2011.
- LENZ, G.; BALARDIN, R.S.; DALLA CORTE, G.; MARQUES, L.N.; DEBONA, D. Escala diagramática para avaliação de severidade de mancha-parda em arroz. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.4, p.752-758, 2010.
- MARQUES, N.; LENZ, G.; COSTA, I.F.D.; GUEDES, J.V.C.; BIGOLIM, M.; OLIVEIRA, A.C.B. Reação de germoplasma de girassol à mancha de septoria causada por *Septoria helianthi* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.2, p.311-315, 2011.
- METHA, Y.R.; CAMPOS, L.A.C.; GUZMAN, E. Resistência genética de cultivares de trigo a *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.21, p.455-459, 1996.

- MONTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacauzeiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, n.5, p.285-294, 2010.
- MYRESIOTIS, C.K.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOUA, E. Enhanced root uptake of acibenzolar-S-methyl (ASM) by tomato plants inoculated with selected *Bacillus* plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.77, p.26-33, 2014.
- MYRESIOTIS, C.K.; KARAOGLANIDIS, G.S.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOUA, E. Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of *Fusarium* crown and root rot on tomato. **Pest Management Science**, London, v.68, p.404-411, 2012.
- NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**, Palo Alto, v.1, n.7, p.19-28, 1992.
- NIU, D.-D., LIU, H.-X., JIANG, C.-H., WANG, Y.-P., WANG, Q.-Y., JIN, H.-L., GUO, J.-H. The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate- and jasmonate/ethylene-dependent signaling pathways. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.24, n.5, p.533-542, 2011.
- PEREIRA, L.M.; RESENDE, M.L.V.; MATHIONI, S.M.; CAMPOS, M.A.; JUNIOR, P.M.R. Protective effect and expression of defense-related ESTs induced by acibenzolar-S-methyl and a phosphorylated mannan oligosaccharide-based product against *Moniliophthora perniciosa* in *Theobroma cacao*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.12, n.12, p.1311-1317, 2013.
- SANTOS, H.G.; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C.; OLIVEIRA, V.A.; LUMBRERAS, J.F.; COELHO, M.R.; ALMEIDA, J.A.; CUNHA, T.J.F.; OLIVEIRA, J.B. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013. 353p.
- SANTOS, H.A.A.; PRIA, M.D.; SILVA, O.C.; MIO, L.L.M. Controle de doenças do trigo com fosfitos e acibenzolar-S-metil isoladamente ou associados a piraclostrobina + epoxiconazole. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.32, n.2, p.433-442, 2011.
- SONNEMANN, I.; STRICHER, N.M.; WOLTERS, V. Root associated organisms modify the effectiveness of chemically induced resistance in barley. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, n.10, p.1837-1842, 2005.
- SOUZA, S.R.; DAROS, E.; FRAGOSO, R.B.; RUARO, L. Efeito de bactérias diazotróficas nos componentes de produção de cana-de-açúcar infectadas pelo raquitismo das soqueiras. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v.2, n.4, p.21-27, 2011.
- SOYLU, S.; BAYSALL, Ö.; SOYLU, E.M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, Amsterdam, v.165, n.5, p.1069-1075, 2003.
- STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agrária Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia vegetal**. Metabólitos secundários e defesa vegetal. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap.13. p.309-334.
- TORTORA, M.L.; DÍAZ-RICCI, J.C.; PEDRAZA, R.O. Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch.) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, Netherlands, v.356, n.1-2, p.279-290, 2011.
- TRILLER, C.; MEHTA, Y.R. Efeito da idade da folha bandeira de trigo na expressão de resistência a *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.23, p.167-169, 1997.
- WALTERS, D.; HEIL, M. Costs and trade-offs associated with induced resistance. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Oxford, v.71, p.3-17, 2007.
- WALTERS, D.R.; RATSEP, J.; HAVIS, N.D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.64, p.1263-1280, 2013.
- WAUGH, D.L.; FITTS, J.W. **Estudos para interpretação de análises de solo**: de laboratório e em vasos. Washington: AID, 1966. 33p. (Boletim Técnico, 3).
- YASUDA, M.; ISAWA, T.; SHINOZAKI, S.; MINAMISAWA, K.; NAKASHITA, H. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Japan, v.73, n.12, p.2595-2599, 2009.