

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Purificação parcial de frações de *Saccharomyces cerevisiae* indutoras de resistência contra antracnose e avaliação de agentes bióticos (*S. cerevisiae* e Agro-Mos[®]) e abiótico (Bion[®]) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematóide (*Meloidogyne incognita* x pepineiro) e organismo não-alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja)

Nivea Maria Tonucci Zanardo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2009**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Nivea Maria Tonucci Zanardo
Licenciatura em Ciências Biológicas

Purificação parcial de frações de *Saccharomyces cerevisiae* indutoras de resistência contra antracnose e avaliação de agentes bióticos (*S. cerevisiae* e Agro-Mos[®]) e abiótico (Bion[®]) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematóide (*Meloidogyne incognita* x pepineiro) e organismo não-alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja)

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Agronomia.
Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2009

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Zanardo, Nivea Maria Tonucci

Purificação parcial de frações de *Saccharomyces cerevisiae* indutoras de resistência contra antracnose e avaliação de agentes bióticos (*S. cerevisiae* e Agro-Mos®) e abiótico (Bion®) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematóide (*Meloidogyne incognita* x pepineiro) e organismo não-alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja) / Nivea Maria Tonucci Zanardo. - - Piracicaba, 2009.

98 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2009.
Bibliografia.

1. Antracnose 2. Fungos fitopatogênicos 3. Leveduras - Isolamento e purificação
4. Nematóides parasitos de plantas 5. Pepino - Resistência 6. Rhizobium 7. Soja - Resistência
8. Tomate - Resistência 9. Traças I. Título

CDD 632
Z27p

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Dedico

*Aos meus pais Cecília e Alcides e
irmã Giane pelo amor, carinho e
apoio em todos os momentos.*

*Ao Marcio pelo companheirismo,
incentivo e dedicação.*

*Ao meu pequeno Matheus, presente
de Deus para nós.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por manter minha força e saúde para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati pela orientação, ensinamentos, amizade e paciência em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos Maurício e Marizete pela colaboração, amizade e apoio, sendo que jamais mediram tempo ou esforço para me auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Fitopatológica André, Ariana, Cíntia, Dalila, Ely, Fernando, Fúvia, Josué, Leonardo, Luciana, Maria Cristina, Marisa, Nikolas, Odair, Rodrigo, Silvia e Ueliton pela amizade, auxílio e ensinamentos durante estes anos.

Ao Juliano Bragatto e as amigas Fátima T. Rampelotti Ferreira e Rosana Bessi pela colaboração especial no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Ladaslav Sodek do Instituto de Biologia, UNICAMP pelos ensinamentos, sugestões e fornecimento das sementes de soja e do isolado de rizóbio.

Aos professores Dr. José Djair Vendramim, Dr. Mário Massayuki Inomoto e Dr. Antônio Carlos Labate pelo fornecimento de material e por disponibilizarem seus laboratórios para a realização desse trabalho.

A todos os professores e funcionários do antigo Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola e Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

À CAPES pela concessão da bolsa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências.....	17
2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLÂNTULAS DE PEPINEIRO CONTRA <i>Colletotrichum lagenarium</i> por frações do extrato bruto autoclavado <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
Resumo.....	19
Abstract.....	20
2.1 Introdução.....	21
2.2.Desenvolvimento.....	23
2.2.1 Revisão bibliográfica.....	23
2.2.1.1 Aspectos gerais da indução de resistência.....	23
2.2.1.2 Elicidores bióticos.....	25
2.2.1.3 Elicidores fúngicos e respostas de defesa em plantas.....	26
2.2.1.4 A levedura <i>S. cerevisiae</i> como agente de controle de doenças em plantas.....	27
2.2.1.5 <i>Colletotrichum lagenarium</i> agente causal da antracnose.....	30
2.2.2 Material e métodos.....	31
2.2.2.1 Planta e patógeno.....	31
2.2.2.2 Obtenção do extrato bruto aquosos de <i>S. cerevisiae</i>	31
2.2.2.3 Precipitação etanólica do extrato bruto aquoso autoclavado de <i>S. cerevisiae</i>	32
2.2.2.4 Cromatografia de troca aniônica-CTA.....	33
2.2.2.5 Bioensaio <i>in vivo</i>	34
2.2.2.5.1 Efeito do intervalo de tempo entre o tratamento e inoculação com <i>C. lagenarium</i> na proteção local de cotilédones de pepineiro.....	35
2.2.2.6 Bioensaio <i>in vitro</i>	35
2.2.2.7 Dosagem da concentração de proteínas e carboidratos totais.....	36
2.2.2.8 Análise de monossacarídeos do extrato bruto autoclavado de <i>S. cerevisiae</i>	36
2.2.3 Resultados e discussão.....	37
2.2.3.1 Bioensaio <i>in vivo</i>	37

2.2.3.1.1 Efeito dos extratos brutos aquosos de <i>S. cerevisiae</i> em cotilédones de pepineiro	37
2.2.3.1.2 Efeito do intervalo de tempo entre o tratamento e inoculação sobre a proteção de cotilédones de pepineiro contra <i>C. lagenarium</i>	40
2.2.3.1.3 Proteção local de cotilédones de pepineiro utilizando frações parcialmente purificadas do extrato bruto de <i>S. cerevisiae</i>	40
2.2.3.2 Bioensaio <i>in vitro</i>	49
2.2.3.2.1 Efeito das preparações de <i>S. cerevisiae</i> sobre o crescimento micelial, germinação de conídios e formação de apressórios por <i>C. lagenarium</i>	49
2.2.3.3 Análise de monossacarídeos de preparações de <i>S. cerevisiae</i>	53
2.3 Considerações finais.....	53
Referências	54
3 AVALIAÇÃO DE INDUTORES BIÓTICOS E ABIÓTICO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA TRAÇA DO TOMATEIRO (<i>Tuta absoluta</i>) E NA MULTIPLICAÇÃO DE <i>Meloidogyne incognita</i> em pepineiro.....	61
Resumo.....	61
Abstract.....	62
3.1 Introdução.....	63
3.2 Desenvolvimento.....	65
3.2.1 Revisão Bibliográfica.....	65
3.2.1.1 Indutores de resistência.....	65
3.2.1.2 Mecanismos envolvidos na resistência de plantas à nematóides e insetos.....	66
3.2.1.3 Indução de resistência em plantas e efeitos sobre interações simbióticas com microrganismos.....	67
3.2.1.4 A traça-do-tomateiro.....	68
3.2.1.5 <i>Meloidogyne incognita</i>	70
3.2.1.6 Rizóbios e interações simbióticas com legumônias.....	71
3.2.2 Material e métodos.....	73
3.2.2.1 Preparação dos agentes bióticos e abiótico.....	73
3.2.2.2 Experimento com inseto.....	73
3.2.2.2.1 Efeito do extrato bruto autoclavado de <i>S. cerevisiae</i> , Agro-Mos [®] e Bion [®] sobre <i>T. absoluta</i> (traça-do-tomateiro).....	73
3.2.2.3 Experimento com nematóide.....	74
3.2.2.3.1 Obtenção e inoculação de ovos e juvenis de <i>M. incognita</i> em plântulas de pepineiro.....	74
3.2.2.3.2 Efeito do extrato bruto autoclavado de <i>S. cerevisiae</i> e Bion [®] na multiplicação de <i>M. incognita</i> em plântulas de pepineiro.....	74
3.2.2.4 Experimento com rizóbio.....	75

3.2.2.4.1 Origem, manutenção e multiplicação do inoculo.....	75
3.2.2.4.2 Material vegetal e condições de cultivo.....	75
3.2.2.4.3 Soluções nutritivas.....	75
3.2.2.4.4 Preparação dos agentes bióticos e abiótico.....	76
3.2.2.4.5 Efeito do extrato bruto autoclavado de <i>S. cerevisiae</i> , Agro-mos [®] e Bion [®] sobre a nodulação de plantas de soja por <i>B. elkanii</i>	76
3.2.2.4.6 Coleta do material vegetal e parâmetros avaliados.....	76
3.2.2.4.7 Dosagem do teor de nitrogênio da parte aérea, raiz e nódulos das plantas de soja	77
3.2.2.4.8 Delineamento experimental e análise estatística.....	77
3.2.3. Resultados e discussão.....	77
3.2.3.1 Efeito do extrato bruto autoclavado de <i>S. cerevisiae</i> , Agro-Mos [®] e Bion [®] na traçado-tomateiro (<i>T. absoluta</i>).....	77
3.2.3.2 Efeito do extrato bruto autoclavado de <i>S. cerevisiae</i> e do Bion [®] na multiplicação de <i>M. incognita</i> em raízes de pepineiro.....	80
3.2.3.3 Efeito do Bion [®] , Agro-Mos [®] e do extrato bruto autoclavado de <i>S. cerevisiae</i> na interação simbiótica de soja com <i>B. elkanii</i>	82
4 Considerações finais.....	93
Referências.....	93

RESUMO

Purificação parcial de frações de *Saccharomyces cerevisiae* indutoras de resistência em pepineiro contra antracnose e avaliação de agentes bióticos (*S. cerevisiae* e Agro-Mos[®]) e abiótico (Bion[®]) na indução de resistência contra inseto (*Tuta absoluta* x tomateiro), nematóide (*Meloidogyne incognita* x pepineiro) e organismo não-alvo (*Bradyrhizobium elkanii* x soja)

Na indução de resistência a planta possui mecanismos de defesa físicos e químicos para impedir a entrada e o desenvolvimento de patógenos e parasitas, incluindo fungos, bactérias, vírus, nematóides e até insetos. Estes mecanismos são ativados por infecções prévias ou pelo tratamento com agentes indutores (eliciadores) bióticos ou abióticos. Entre os agentes indutores bióticos, destaca-se a *S. cerevisiae*, que além da importância biotecnológica, tem demonstrado em estudos prévios potencial para o controle de doenças em várias plantas de importância econômica. Produtos à base de *S. cerevisiae*, como por exemplo o Agro-Mos[®] (carboidratos da parede celular da levedura) estão disponíveis no mercado, mas não como indutores de resistência. Já o indutor químico registrado como Bion[®] vem sendo comercializado e utilizado na indução de resistência em diversas espécies de plantas contra vários patógenos. Os objetivos deste trabalho foram purificar parcialmente frações de *S. cerevisiae* indutoras de resistência em pepineiro contra antracnose, causada por *Colletotrichum lagenarium*, e avaliar o efeito do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] e Bion[®] na indução de resistência contra o inseto *T. absoluta* em tomateiro, o nematóide *M. incognita* em pepineiro, como também, verificar o efeito destes agentes na interação simbiótica entre soja e *B. elkanii*. Os resultados mostraram que o extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae* autoclavado por 4 h foi o mais efetivo na redução da antracnose. Dessa maneira, o mesmo foi submetido à precipitação etanólica e o sobrenadante da precipitação foi fracionado utilizando-se Cromatografia de Troca Aniônica - CTA. Obtiveram-se quatro picos, sendo que os picos I (frações não ligada à resina DEAE-celulose) e II (frações ligadas à resina DEAE-celulose) foram os mais efetivos na proteção de plântulas de pepineiro reduzindo a severidade de antracnose em 80% e 72%, respectivamente. A aplicação foliar do extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] e Bion[®] não afetou o desenvolvimento do inseto em tomateiro, como também, não interferiu significativamente na multiplicação do nematóide em raízes de pepineiro. Na interação simbiótica da soja com *B. elkanii*, os agentes testados não afetaram a nodulação por *B. elkanii* em raízes e o desenvolvimento vegetativo das plantas. Porém, a aplicação foliar do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* aumentou a quantidade de nitrogênio total da parte aérea das plantas. Finalmente, conclui-se que frações de *S. cerevisiae* induziram resistência em pepineiro contra *C. lagenarium*. Por sua vez, os agentes testados não foram eficientes no controle do inseto herbívoro e do nematóide e não demonstraram efeito negativo na interação soja - rizóbio.

Palavras-chave: Indução de resistência; Extrato de levedura; *Colletotrichum lagenarium*; *Tuta absoluta*; *Meloidogyne incognita*; *Bradyrhizobium elkanii*

ABSTRACT

Partial purification of fractions of *Saccharomyces cerevisiae* inducing resistance in cucumber plants against anthracnose and evaluation of biotic (*S. cerevisiae* and Agro-Mos[®]) and biotic (Bion[®]) agents in the resistance induction against insect (*Tuta absoluta* x tomato plants), nematode (*Meloidogyne incognita* x cucumber plants) and non-target organism (*Bradyrhizobium elkanii* x soybean plants)

In the resistance induction, the plant has physical and chemical defense mechanisms to avoid the entrance and the development of pathogens and parasites, including fungi, bacteria, virus, nematodes and even insects. These mechanisms are activated by previous infections or by the treatment with biotic and abiotic inducer agents. Among the biotic agents there is *S. cerevisiae*, that besides the biotechnological importance, was shown in previous studies to control diseases in several plants of economical importance. Products made of *S. cerevisiae*, as for example, the Agro-Mos[®] (formulated with carbohydrates from the cellular wall of the yeast) are available in the market, but not resistance inducers. The chemical inducer known as Bion[®] is already marketed and used to induced resistance in several plant species against several pathogens. The objectives of this work were to partially purify fractions of *S. cerevisiae* able to induce resistance in cucumber against anthracnose, caused by *Colletotrichum lagenarium*, and also evaluate the effect of the autoclaved crude aqueous extract from *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] and Bion[®] in the resistance induction against the insect *T. absoluta* in tomato plants, the nematode *M. incognita* in cucumber plants, as well as to verify the effect of the agents in the symbiotic interaction involving soybean and *B. elkanii*. The results showed that the crude aqueous extract of *S. cerevisiae* autoclaved for 4 h was the most effective out in the reduction of cucumber anthracnose. Thus, the same extract was submitted to ethanolic precipitation and the obtained supernatant was fractioned by using Anion Exchange Chromatography - AEC. For peaks were obtained and peak I (non-adsorbed fraction to DEAE-Cellulose) and II (fraction adsorbed to DEAE-Cellulose) were the most effective out in the protection of the cucumber seedling by reducing anthracnose severity in 81% and 72% ,respectively. The application of the autoclaved extract of *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] and Bion[®] did not affect the development of the insect in tomato plants as well as did not interfere significantly in the multiplication of the nematode in cucumber roots. In the symbiotic interaction of soybean and *B. elkanii*, the tested agents did not affect the formation of nodules in soybean roots and the vegetative development of the plants. However, the foliar application of the autoclaved crude extract of *S. cerevisiae* significantly increased the amount of total nitrogen in the aerial part of the plants. Finally, it is concluded that the fractions (peaks I and II) of *S. cerevisiae* induced resistance of the cucumber plants. However the tested agents were not efficient in the control of the herbivore insect and the nematode and did not exhibit negative effects in the symbiotic interaction soybean and rhizobium.

Keywords: Resistance induction; Yeast extract; *Colletotrichum lagenarium*; *Tuta absoluta*; *Meloidogyne incognita*; *Bradyrhizobium elkanii*

1 INTRODUÇÃO

Desde o início das civilizações, doenças de plantas têm provocado efeitos catastróficos em campos cultivados, os quais se tornaram excelentes fontes de alimento não apenas para o homem como também para os mais variados patógenos, os quais se tornaram um grande problema para a raça humana, passando a ocupar boa parte da atenção da sociedade (BARBOZA, 2004). As plantas são continuamente expostas a uma diversa gama de patógenos microbianos, nematóides e insetos. Porém, uma proporção relativamente pequena destes patógenos invade a planta hospedeira com sucesso e causa doença (GOMÉZ-GOMÉZ, 2004).

O uso de defensivos químicos tem efetivamente controlado doenças em plantas, entretanto, o crescente e contínuo uso destes produtos tem causado riscos a saúde humana. É prática comum no Brasil e em outros países em desenvolvimento, a falta do uso de equipamentos de segurança durante a aplicação de pesticidas, resultando na contaminação do aplicador, como também a ingestão de alimentos contaminados com resíduos que pode causar efeitos crônicos sobre o sistema nervoso central ou mesmo câncer, dependendo do tipo de composto e da quantidade ingerida (BARBOZA, 2004).

Outro problema do uso de pesticidas é a contaminação do meio ambiente e o efeito negativo sobre os ecossistemas. Fungicidas afetam microrganismos benéficos que habitam a rizosfera e a filosfera de plantas, as quais formam um complexo nicho ecológico, afetando a competição dos microrganismos com patógenos. Além disso, a aplicação de pesticidas pode causar mutações genéticas e favorecer o desenvolvimento de populações de patógenos mais resistentes (BAKER, 1997).

Neste contexto, o desenvolvimento de métodos alternativos ao uso de defensivos químicos é fundamental não apenas para beneficiar a produção agrícola, como também para evitar ou reduzir os efeitos nocivos causados ao ser humano e meio ambiente.

A indução de resistência vem sendo estudada atualmente em condições controladas e também no campo. O mecanismo de indução consiste na ativação de defesas vegetais impedindo a entrada e/ou a colonização da mesma por patógenos ou parasitas. A exposição prévia a patógenos ou o pré - tratamento com agentes bióticos ou abióticos pode induzir resistência local ou sistêmica nas plantas (MÉTRAUX, 2001). O mecanismo de resistência exhibe vantagens como: efetividade contra vírus, bactérias, fungos e nematóides; estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência; caráter sistêmico, persistente e natural da proteção; transmissão por

enxertia; economia de energia metabólica e utilização do potencial genético para resistência em todas as plantas suscetíveis. Por sua vez, a indução de resistência pode apresentar desvantagens como: resistência parcial, incompleta e que pode requerer reativações temporárias. Por outro lado, por ser parcial e inespecífica, a resistência induzida não impõe pressão de seleção sobre o patógeno, dificultando assim, a quebra de resistência (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

A resistência final das plantas resulta da combinação de barreiras físicas e químicas que são pré-formadas ou induzidas na planta após a infecção. Alguns mecanismos como a cutícula, componentes da parede celular vegetal e metabolitos secundários são exemplos de defesas pré-formadas. Após a detecção do patógeno, a planta ativa defesas, como por exemplo, a reação de hipersensibilidade, o aumento da expressão de genes relacionados à defesa, a produção de compostos antimicrobianos, a formação de lignina e a explosão oxidativa. Em contraste, a doença resulta no fracasso do reconhecimento do patógeno pela planta ou na habilidade deste em evitar ou superar as respostas de resistência (GOMÉZ-GOMÉZ, 2004).

A resistência induzida em plantas pode ser ativada por agentes bióticos e abióticos. Entre os agentes bióticos, destaca-se a levedura comercial *S. cerevisiae*, a qual possui eliciadores (moléculas) capazes de induzir respostas relacionadas à defesa em plantas de importância econômica e o Agro-Mos[®], cujo princípio ativo é constituído por eliciadores da parede celular de *S. cerevisiae*. o qual tem mostrado efeito positivo no controle de doenças em videira, batata, tomate quando utilizado em conjunto com fungicidas tradicionais, possibilitando reduzir o número de aplicações destes (DI PIERO; GARCIA E TONUCCI, 2005) e em abióticos, inclui o Bion[®] ou acibenzolar-S-metil, indutor químico comercializado em vários países, o qual induz resistência sistêmica contra patógenos em diversas espécies de plantas (REIGNAULT; WALTERS, 2007).

As plantas são membros de uma comunidade complexa interagindo continuamente com organismos antagonistas e benéficos. A expressão de genes de defesa na planta pode afetar as interações ecológicas com outras espécies. Dentre estas interações, destacam-se algumas que envolvem bactérias nodulantes (rizóbios), fungos micorrízicos, fungos endofíticos, polinizadores, dispersores de sementes, predadores e parasitóides de insetos herbívoros entre outros (KUHN et al., 2006).

Assim, os objetivos do presente trabalho foram purificar parcialmente frações de *S. cerevisiae* indutoras de resistência em pepineiro contra antracnose e avaliar o efeito do extrato bruto de *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] (produto comercial constituído de mananoligossacarídeo fosforilados derivados da parede celular de *S. cerevisiae*) e Bion[®] na indução de resistência em tomateiro contra o inseto *Tuta absoluta* em pepineiro contra o nematóide *Meloidogyne incognita* e na interação simbiótica de soja-*B. elkanii*.

Referências

- BAKER, B.; ZAMBRYSKI, P.; STASKAWICZ, B.; DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-microbe interactions. **Science**, Washington, v. 276, p. 726-733, 1997.
- BARBOZA, L.C.A. Introdução histórica. In: _____. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Viçosa: UFV, 2004. cap. 1, p. 15-34.
- BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F. ROMEIRO, R. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. 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. 1, p. 11-28.
- GÓMEZ-GÓMEZ, L. Plant perception systems for pathogen recognition and defence. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 41, p. 1055-1062, 2004.
- KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.P.; CARDOSO FILHO, J.A.; PORTZ, R.L. OSSWALD, W. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, p. 251-302, 2006.
- MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 13-18, 2001.
- REIGNAULT, P.; WALTERS, D. Topical application of inducers for disease. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defense: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007. chap. 10, p. 179-200.

2 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLÂNTULAS DE PEPINEIRO CONTRA *Colletotrichum lagenarium* por frações do extrato bruto autoclavado *Saccharomyces cerevisiae*

RESUMO

A levedura de panificação (*S. cerevisiae*) contém eliciadores capazes de ativar mecanismos de defesa e induzir resistência contra doenças em várias plantas. Plântulas de pepineiro tratadas com o extrato bruto aquoso da levedura autoclavado por 4 h reduziram significativamente a severidade da antracnose causada por *C. lagenarium*. A análise da composição de açúcares do extrato bruto realizada através de *High Performance Anion Exchange Chromatography* - HPAEC revelou a presença de glicose e manose em maiores proporções, seguidos de arabinose e fucose. Com o objetivo de obter frações com potencial eliciador na proteção de plântulas de pepineiro contra antracnose, o extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae* autoclavado por 4 h foi fracionado com álcool etílico. Duas frações (sobrenadante e o precipitado) resultantes da precipitação etanólica foram aplicadas em cotilédones de plântulas de pepino e reduziram em 98% a severidade da antracnose. Para o isolamento dos compostos eliciadores da levedura, o sobrenadante foi submetido à Cromatografia de Troca Aniônica - CTA, sendo que quatro picos foram obtidos, o pico I (frações não ligadas à resina DEAE-celulose) e o pico II (frações ligada à resina), contendo principalmente carboidratos, foram os mais efetivos na proteção das plântulas reduzindo a severidade da antracnose em 81% e 72%, respectivamente. Provavelmente, os picos I e II são constituídos por compostos eliciadores principalmente de natureza polissacarídica. As preparações obtidas da levedura não exibiram influência sobre o crescimento micelial *in vitro* mas estimularam a germinação de conídios e a formação de apressórios por *C. lagenarium*.

**INDUCTION OF RESISTANCE IN CUCUMBER PLANTS AGAINST
Colletotrichum lagenarium by fractions from *Saccharomyces cerevisiae***

ABSTRACT

The bread-making yeast (*S. cerevisiae*) contains elicitors able to activate defense mechanisms and to induce resistance against diseases in several plants. Cotyledons of cucumber plants were treated with crude aqueous extracts from yeast autoclaved for 4 h. The results showed that the yeast extract significantly reduced the anthracnose, caused by *C. lagenarium*. The analyses of sugar composition of the crude extract, accomplished by High Performance Anion Exchange Chromatography - HPAEC, revealed the presence of glucose and mannose in higher proportions, followed by arabinose and fucose. To obtain fractions with potential elicitor in the protection of cucumber plants against anthracnose, the autoclaved crude aqueous extract of *S. cerevisiae* was fractionated with ethyl alcohol. Two fractions resulting from the ethanolic precipitation (supernatant and pellet) were sprayed onto cotyledons of cucumber plants and reduced in 98% anthracnose severity. For the isolation of the elicitors compounds from yeast, the supernatant was submitted to Anion Exchange Chromatography - AEC, and four peaks were obtained. Peaks I (non-adsorbed fraction to DEAE-Cellulose) and II (fraction adsorbed to DEAE-Cellulose) containing mainly carbohydrates were the most effective in the protection of the cucumber cotyledons reducing the anthracnose severity in 81% and 72%, respectively. Probably, peaks I and II are constituted mainly of polysaccharides. The yeast preparations from did not show influence on the *in vitro* mycelial growth, but stimulated conidium germination and appressorium formation by *C. lagenarium*.

2.1 Introdução

O conceito de controle de pragas com o uso exclusivo de agrotóxicos está mudando, visto que métodos de controle menos agressivos ao ambiente e à saúde humana são exigidos, principalmente, em função da opinião pública e das agências ambientalistas. O uso abusivo e indiscriminado de agrotóxicos vem acarretando danos ao meio ambiente, aos seres vivos e pode favorecer a seleção de raças resistentes de patógenos (DEISING; REIMANN; PASCHOLATI, 2008).

Novas alternativas de controle de pragas e doenças tornam-se necessárias e, atualmente, a indução de resistência tem recebido destaque no âmbito global. O fenômeno de indução consiste no aumento da capacidade da planta em expressar respostas de defesa contra a infecção por patógenos invasores pelo tratamento por agentes indutores (eliciadores), sem qualquer alteração no genoma da planta (STADNIK, 2000). A ativação dos mecanismos de defesa da planta mostra-se dependente do intervalo de tempo entre o tratamento com o indutor e a subsequente inoculação do patógeno (tratamento provocador ou desafiador) (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

O uso de indutores bióticos tem sido relatado em diversas culturas como pepino, fumo, tomate, batata, melão, melancia, trigo e cevada. Os indutores bióticos podem ser organismos vivos como bactérias, fungos, vírus, nematóides e insetos, parte desses, ou seus metabólitos, que atuam como eliciadores capazes de ativar respostas de defesa localizada ou sistêmica em plantas (DI PIERO et al., 2005).

Eliciadores derivadas de parede celular de fungos ou metabólitos por estes secretados têm sido isolados, identificados e caracterizados. Esses eliciadores pertencem a diferentes classes químicas incluindo carboidratos, peptídeos, proteínas, lipídeos, glicoproteínas, glicopeptídeos, ácidos graxos entre outros (WALTERS et al., 2005).

Dentre os eliciadores derivados de fungos que são amplamente utilizados para induzir respostas relacionadas à resistência em plantas, vários estão presentes na levedura *S. cerevisiae*. O extrato da levedura contém vários componentes que podem eliciar respostas de defesa, incluindo quitina, oligômeros de N-acetilglucosamina, β -glucanas, glicopeptídeos e ergosterol (BOLLER, 1995).

Diversos trabalhos mostraram o potencial de compostos eliciadores de células da levedura *S. cerevisiae* utilizada na indústria de panificação, na ativação de repostas de defesa, como a síntese de fitoalexinas em plantas de sorgo (BONALDO, 2005; LABANCA, 2002; WULFF;

PASCHOLATI, 1999), peroxidases em pepineiro (LABANCA, 2002), produção de Espécies Ativas de Oxigênio – EAOs em suspensões de células de *Catharanthus roseus* (PAUW et al., 2004), bem como no controle de doenças em plantas de milho, sorgo, eucalipto e maracujazeiro contra fitopatógenos (PASCHOLATI, 1998; SILVA; PASCHOLATI, 1992; STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994).

Em função das informações que tem sido geradas nos últimos anos sobre o uso potencial de *S. cerevisiae* no controle de fitopatógenos, as pesquisas deverão se concentrar no isolamento, purificação e caracterização de eliciadores produzidos por essa levedura. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi purificar parcialmente frações de *S.cerevisiae* induzem resistência em pepineiro contra *C. lagenarium*.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão bibliográfica

2.2.1.1 Aspectos gerais da indução de resistência

A resistência induzida é um fenômeno em que a planta expressa um aumento da sua capacidade de resistência eliciada por estímulos ambientais específicos. Tal resistência é efetiva contra um amplo espectro de patógenos e parasitas, incluindo fungos, bactérias, vírus, nematóides, plantas parasíticas e até insetos herbívoros (VAN LOON et al., 1998; WALLING, 2000). Essa capacidade da planta possui em expressar rapidamente suas defesas não ocorre somente contra patógenos virulentos ou pragas, em muitos casos, o aumento das defesas é expresso após o tratamento com um agente indutor (HAMMERSCHMIDT, 2007).

As plantas possuem um sistema de defesa multicomponente que engloba mecanismos estruturais e bioquímicos, os quais podem ser sintetizados e acumulados pela mesma previamente ou após o contato com o patógeno. Assim, defesas estruturais são constituídas por barreiras físicas contra a penetração e a colonização dos tecidos pelo patógeno, enquanto que, defesas bioquímicas que ocorrem na célula vegetal produzem compostos tóxicos ao patógeno ou impedem seu desenvolvimento no interior da planta (PASCHOLATI, 1998).

Nas interações entre plantas e patógenos pode ocorrer suceder o sucesso da infecção (resposta compatível) ou resistência (resposta incompatível). Em interações incompatíveis, células hospedeiras infectadas por vírus, bactérias ou fungos podem eliciar um conjunto de mecanismos de defesa local, como a explosão oxidativa, impedindo o patógeno de iniciar o processo de infecção, alterações na parede celular da planta que inibem a penetração do patógeno, a síntese de compostos com propriedades antimicrobianas, como as fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese (VAN LOON, 1998).

Como exemplos de mecanismos de defesa estrutural pré-formados (passivos ou constitutivos), temos cutícula, tricoma, estômatos, fibras e vasos condutores, enquanto que os bioquímicos podem incluir fenóis, alcalóides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeo fenólicos e cianogênicos, inibidores protéicos, fototoxinas, quitinases e β -1,3 glucanases. Já os pós-formado (ativos ou induzíveis) estruturais podem incluir papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, camadas de abscisão e tiloses e os bioquímicos fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogênese, espécies ativas de oxigênio e fototoxinas. Esses mecanismos atuam de maneira

dinâmica e coordenada no momento e local apropriado e com magnitude adequada (ISAAC, 1992; PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Há alguns critérios básicos proposto por Steiner e Schönbeck (1995) para investigar se a resistência exibida pela planta foi realmente induzida, como: ausência de atividade microbiana direta do indutor sobre o patógeno, necessidade de um intervalo de tempo entre o tratamento da planta com o indutor e a expressão da resistência, supressão prévia da resistência induzida pela exposição prévia da planta a substâncias que inibem a expressão de genes do hospedeiro, inespecificidade da proteção, a resistência deve se manifestar local ou sistemicamente na planta, e a resistência deve ser dependente do genótipo da planta.

Há duas principais formas de resistência, as quais são a Resistência Sistêmica Adquirida - RSA e Resistência Sistêmica Induzida - RSI, sendo que em ambas, as defesas das plantas são ativadas por infecções prévias ou tratamento com agentes indutores que resultam em resistência contra subsequente ataque de patógenos (VALLAD; GOODMAN, 2004).

As diferenças entre a RSA e RSI estão baseadas em estudos envolvendo *Arabidopsis* através de análises genética, bioquímica e diferentes doenças. Portanto, a RSA e RSI são fenômenos distintos e caracterizados pelo tipo de agente indutor e pela via de sinalização do hospedeiro que resulta na expressão de resistência (STICHER et al., 1997; VAN LOON et al., 1998).

A RSA pode ser ativada pela exposição da planta a microorganismos virulentos, avirulentos e não patogênicos ou por indutores químicos como o ácido salicílico, 2,6-dicloroisonicotínico e o Bion[®]. Dependendo da planta e do agente indutor, um intervalo de tempo é necessário para o estabelecimento da RSA que corresponde ao tempo requerido para o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese. A principal característica da RSA é o aparecimento de necroses localizadas induzidas pelo patógeno. Estas necroses podem ser também uma resposta de hipersensibilidade ou uma lesão necrótica local causada por patógeno virulento. A RSA requer o ácido salicílico na via de sinalização para a expressão de proteínas relacionadas à patogênese local ou sistemicamente (STICHER et al., 1997).

A RSI é potencializada por rizobactérias promotoras de crescimento vegetal, designadas internacionalmente por *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria* - PGPR, incluindo principalmente espécies de *Pseudomonas*. Em contraposição a RSA, a RSI não está associada com a formação de lesões necróticas locais, ao acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese

ou ácido salicílico, em vez disso, depende da rota de sinalização regulada pelo jasmonato e etileno (PIETERSE et al., 1998).

2.2.1.2 Elicidores bióticos

Elicidor é a molécula presente em um indutor de resistência capaz de ativar mecanismos de defesa da planta (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005). Originalmente, os eliciadores foram descritos como moléculas capazes de induzir a síntese de fitoalexinas, substâncias antimicrobianas, de baixo peso molecular que conferem resistência contra microrganismos invasores em tecidos vegetais. Atualmente, a definição de eliciadores se tornou mais ampla, como compostos ou moléculas que estimulam repostas de defesa da planta, desde mudanças celulares, como a reação de hipersensibilidade até mudanças moleculares, como a ativação de genes de defesa (HAHN, 1996).

Os eliciadores podem ser agrupados em duas categorias: gerais (inespecíficos) e específicos. Os eliciadores gerais ativam respostas de defesa inespecíficas em diversas espécies de plantas. Enquanto que, eliciadores específicos, codificados por genes de avirulência do patógenos (*Avr*) raça-específica, induz resposta de defesa em cultivares específicos. Os eliciadores já caracterizados apresentaram estruturas químicas variadas incluindo oligossacarídeos, peptídeos, proteínas, lipídeos e glicoproteínas (MONTESANO; BRADER; PALVA, 2003).

Os eliciadores podem ser considerados bióticos, quando, por exemplo, derivam de plantas ou microrganismos ativos ou inativos ou parte destes, como fragmentos da parede celular. Nesse contexto, atividades eliciadoras de respostas de defesa em plantas foram correlacionadas com fragmentos pécticos liberados da parede celular vegetal pela ação de pectinases produzidas por patógenos, bem como produtos extracelulares de origem microbiana. Pesquisas evidenciaram que moléculas fúngicas, incluindo lipídeos insaturados, glicoproteínas e polissacarídeos, mostraram-se capazes de eliciar respostas de defesas em plantas (REIGNAULT; WALTERS, 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que o reconhecimento de eliciadores pelas plantas está relacionado à presença de proteínas na membrana plasmática das células vegetais, que agem como receptores. A existência destes sítios específicos de ligação de natureza protéica tem sido demonstrada para oligossacarídeos, glicopeptídeos e peptídeos (CHEONG; HAHN, 1991; HAHN, 1996).

O processo de sinalização desenvolvido pela célula vegetal para perceber e responder aos estímulos intrínsecos e/ou extrínsecos, pode ser dividido basicamente em três etapas: a **percepção do sinal**, ou reconhecimento, pela interação dos eliciadores com receptores celulares específicos ou inespecíficos que reconhecem um determinado sinal; **a transdução do sinal**, que consiste na transmissão do mesmo para seu sítio de ação dentro da célula, de forma direta ou indireta (via mensageiros secundários (ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno), alterações na fosforilação de proteínas ou ativação de proteínas G; **a tradução do sinal**, que consiste na conversão do sinal em repostas celulares específicas, como por exemplo, a ativação de genes que induzem a síntese de proteínas relacionadas a patogêneses (proteínas-RP) e de enzimas integrantes de rotas metabólicas de fitoalexinas (RESENDE et al., 2007).

2.2.1.3 Elicidores fúngicos e respostas de defesa em plantas

Os eliciadores são moléculas que induzem qualquer reposta de defesa em plantas, desde mudanças celulares, como reação de hipersensibilidade até mudanças moleculares, como a ativação transcricional de genes de defesa. As principais respostas de defesa induzidas pelos eliciadores envolvem a produção de enzimas antimicrobianas, deposição para o fortalecimento da parede celular (papilas), produção de espécies ativas de oxigênio e morte programada de células (DIXON et al., 1994)

Muitos eliciadores derivados da parede celular de fungos que induziram respostas de defesa em plantas já foram isolados e caracterizados. A quitina e a β -D- (1 \rightarrow 3) glucana são os principais polissacarídeos de parede celular de fungos, porém a presença de α -D-(1 \rightarrow 3) glucana é menos freqüentemente descrita. As glucanas são usualmente extraídas com soluções alcalinas sendo que uma α -glucana foi isolada e caracterizada do micélio de um isolado não patogênico de *Rhizoctonia* spp. O eliciador foi solubilizado por tratamento térmico e induziu a atividade de β -1,3 glucanase em brotos de batata (WOLSKI et al., 2005).

Um eliciador de natureza polissacarídica foi purificado de esporos autoclavados do fungo *Mucor ramosissimus* induzindo fitoalexinas em cotilédones de soja (SIMÕES et al., 2005). Por sua vez, Dutsadee e Nunta (2008) purificaram uma elicítina e uma nova proteína de 75 KDa do filtrado da cultura de *Phytophthora palmivora*, as quais induziram a síntese de fitoalexina, peroxidases e compostos fenólicos em suspensões de células de seringueira (*Hevea brasiliensis*). Entretanto, a proteína foi mais ativa em baixas concentrações quando comparada com a elicítina

para ativação das respostas de defesa. Os autores relataram que ambas proteínas aumentaram a resistência em plântulas de seringueira contra *P. palmivora*.

Fragmentos de β -glucanas (1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6) da parede celular de *Pyricularia oryzae* induziu a síntese de fitoalexinas em arroz, mas não em soja, indicando diferenças no reconhecimento do eliciador pelas células de soja (YAMAGUCHI et al., 2000).

Um novo eliciador isolado de *Alternaria alternata* induziu atividade de quitinase em células de fumo. O eliciador purificado foi solúvel em 75% de metanol e a caracterização por espectroscopia de ressonância magnética nuclear determinou que o eliciador é uma mistura de β -1,3 e 1,6 de oligoglucanas. Em tecidos de plantas de fumo, o eliciador induziu a ativação de genes que expressam proteínas de defesa da família PR-3, e genes correlacionados nas rotas de fenilpropanóides e sesquiterpenoides (SHINYA et al., 2006).

2.2.1.4 A levedura *Saccharomyces cerevisiae* como agente de controle de doenças em plantas

As leveduras são amplamente encontradas na natureza sendo que algumas espécies residem no néctar de flores, frutos e superfícies foliares. Certas espécies ocorrem na superfície de frutos em decomposição, enquanto que, outras são encontradas no solo, na água e trato digestivo de mamíferos (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Há mais de 20 anos, patologistas, micologistas, geneticistas e bioquímicos vêm elucidando o potencial de fungos e leveduras como agentes de controle biológico, com isso, é intenso o desenvolvimento de produtos à base destes organismos para utilização comercial no controle de pragas e doenças de plantas. Dentre os mecanismos de interação antagônica utilizados por fungos e leveduras pode-se incluir a produção de enzimas hidrolíticas e antibióticos, competição por nutrientes em plantas e colonização de nichos, indução de mecanismos de defesa em plantas hospedeiras e interferência com fatores de patogenicidade do patógeno (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

A levedura *S. cerevisiae*, a qual pertence ao Reino dos Fungos, é um eucarioto unicelular, cuja parede celular é constituída por duas camadas compostas por três macromoléculas principais: manana-proteína, um complexo no qual o polissacarídeo manana está covalentemente ligado à proteína; glucana, um polissacarídeo de β -1,3 e β -1,6 glicose, e quitina, um polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina (CABIB; ROBERTS; BOWERS, 1982).

A manana-proteína corresponde a aproximadamente 30 % do peso seco da parede celular, e compõe a camada mais externa da parede, estando ligada covalentemente a cadeias de β -1,6-glucana. A β -1,6 glucana correspondente à cerca de 10 % do peso seco da parede celular e são moléculas relativamente pequenas com cerca de 150 resíduos de glicose. Mais da metade da parede celular é formada por β -1,3-glucana (50-60%), que é composta predominantemente por moléculas lineares com cerca de 1500 resíduos de glicose, enquanto que a quitina corresponde a 2% do peso da massa seca da parede da célula (KLIS et al., 2002).

A levedura é utilizada na indústria de panificação, cervejaria, suplementos alimentares e na produção de etanol como combustível (ALEXOPOULOS et al., 1996). Além da importância biotecnológica, a levedura se destaca na área agrícola no controle de fitopatógenos de diversas espécies de plantas.

Um peptídeo com atividade antifúngica foi expresso em células transformadas de *S. cerevisiae*, sendo que os autores relataram que o peptídeo a 50 μ M inibiu totalmente a germinação *in vitro* de esporos de *Colletotrichum coccodes*. Em baixas concentrações, o peptídeo não inibiu a germinação, mas houve redução no crescimento micelial. Os mesmos autores demonstraram que o desenvolvimento da podridão em tomates inoculados com o *C. coccodes* e incubados na presença do peptídeo sintetizado, foi inibida completamente a 50 μ mol (JONES; PRUSKY, 2002).

A produção de compostos voláteis antimicrobianos por *S. cerevisiae* é também uma alternativa no controle de fitopatógenos. Fialho (2004) verificou que as linhagens BG-1 e CR-1 da levedura inibiu em até 83 % o crescimento micelial de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta do citros.

Vários estudos também evidenciaram que moléculas eliciadoras de *S. cerevisiae* podem ativar mecanismos de defesa não específicos em plantas e induzir resistência. O Quadro 1 ilustra alguns exemplos de eliciadores isolados de *S. cerevisiae* capazes de induzir respostas de defesa em plantas.

Uma fração da levedura *S. cerevisiae*, contendo carboidratos, induziu o aumento de compostos de defesa como os ácidos fenólicos em raízes de *Salvia miltiorrhiza*, planta medicinal utilizada pelos chineses (CHEN et al., 2001).

Natureza química do eliciador	Respostas de defesa	Referência
β -glucano	Síntese de gliceolinas em soja	Hahn e Albersheim (1978)
Glicopeptídeo	Induziu a biossíntese de etileno e a atividade de fenilalanina amônialiase em células de tomate	Basse e Boller (1992)
Glicoproteína	Síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo	Wulff e Pascholati (1999)
Carboidratos (manana ligada a N-acetilglicosamina)	Resistência local em pepineiro contra <i>Colletotrichum lagenarium</i> e aumento da atividade de peroxidase	Labanca (2002)
Peptídeo	Produção de espécies ativas de oxigênio	Pauw et al. (2004)

Quadro 1 - Exemplos de eliciadores isolados de *S. cerevisiae* e respostas de defesa em plantas

Um polissacarídeo (glucana), isolado do extrato da levedura *S. cerevisiae* comercial, mostrou-se capaz de induzir o acúmulo de fitoalexinas (gliceolina) em tecidos de soja (HAHN; ALBERSHEIM, 1978).

Pesquisas envolvendo o uso de *S. cerevisiae* como agente de controle de doenças em plantas como milho, sorgo, eucalipto e maracujazeiro contra fitopatógenos vem há vários anos, sendo realizadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica-Esalq/USP. (PASCHOLATI; 1998; SILVA; PASCHOLATI, 1992; STANGARLIN; PASCHOLATI, 1994). Wulff e Pascholati (1999) verificaram que eliciadores glicoprotéicos, obtidos da levedura *S. cerevisiae* estimularam o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. As frações ativas foram resistentes a autoclavagem, solúveis em etanol 50% e ligaram-se a resina aniônica DEAE-Celulose. Por sua vez, o tratamento das frações com proteinase reduziu a atividade eliciadora.

Labanca (2002) também verificou que um carboidrato, possivelmente manana e glucosamina, obtido da parede celular de *S. cerevisiae*, induziu resistência local em pepineiro contra *C. lagenarium*.

Produtos comerciais à base de *S. cerevisiae* estão disponíveis no mercado como biofertilizante ou aditivo para a fermentação de silagem, e não estão registrados com a finalidade de controlar doenças em plantas. Entre estes, pode-se citar o Agro-Mos[®], cujo princípio ativo é representado por mananoligossacarídeo fosforilado derivado da parede celular de *S. cerevisiae* e o ISR 2000[®], o qual é composto por extratos da levedura e da planta *Yucca schidigera*. Esses

produtos têm mostrado efeitos positivos no controle de doenças em videira, batata e tomate, quando utilizados em conjunto com fungicidas, possibilitando assim a redução do número de aplicações destes (DI PIERO et al., 2005).

2.2.1.5 *Colletotrichum lagenarium* agente causal da antracnose

A antracnose, causada por fungos do gênero *Colletotrichum*, é uma das doenças que ataca mundialmente várias espécies de plantas cultivadas. É uma doença importante não apenas pela frequência com que incide, mas também pelos danos que causa, por exemplo, a cultura do pepino e outras cucurbitáceas, como chuchu, melancia, melão e abóbora. É considerado um dos patógenos mais agressivos em pepineiro contribuindo para perdas e redução da qualidade de frutos destinados ao mercado, sendo que quando não se faz um controle adequado, a doença pode provocar perdas de até 100 % (AGRIOS, 1997; KUROZAWA; PAVAN, 1997).

Nas cucurbitáceas, o agente causal da antracnose é o *Colletotrichum lagenarium* (Pass) Ellis & Halsted, o qual apresenta como sinónimas *C. orbiculare* e *C. gloeosporioides* f. sp. *cucurbitae*. O patógeno produz acérvulos (corpo de frutificação assexual) que produzem conídios a partir de conidióforos. Os conídios são hialinos, unicelulares e protegidos por uma matriz mucilaginosa alaranjada. Durante a infecção, os conídios após a germinação formam uma estrutura especializada chamada apressório, a qual está envolvida na penetração do patógeno na planta hospedeira (KUROZAWA; PAVAN; REZENDE, 2005).

Os sintomas iniciam-se pelas folhas mais velhas como lesões encharcadas, seguidas de necrose e manchas circulares circundadas por um halo de tecido amarelado. As lesões crescem rapidamente, tornando-se marrons com centro mais claro. Em pecíolos e hastes infectadas desenvolvem-se lesões deprimidas, alongadas e marrom escuras. A área afetada expande-se, mostrando pontuações escuras no centro, sendo que em condições de alta umidade, observa-se uma massa de esporos de coloração rosa-alaranjada (REGO; CARRIJO, 2000).

A disseminação do patógeno dentro da cultura se dá principalmente por respingos de chuva e de água de irrigação por aspersão, sendo que insetos e equipamentos agrícolas também disseminam o fungo. Condições de alta umidade e temperaturas de 21 a 27 °C são favoráveis ao desenvolvimento da doença. Porém acima ou abaixo dessa faixa de temperatura, a doença pode não se constituir em problema devido a seu lento desenvolvimento. O patógeno sobrevive de uma

estação para outra em restos de cultura e sementes contaminadas. Entre as medidas de controle recomendadas estão à utilização de sementes saudáveis, o emprego de cultivares resistentes, rotação de cultura, eliminação dos restos de cultura e cucurbitáceas silvestres, o manejo adequado da irrigação e o uso de fungicidas (KUROZAWA; PAVAN, REZENDE, 2005).

2.2.2 Material e métodos

2.2.2.1 Planta e patógeno

Sementes de pepineiro (*Cucumis sativus* L.) cv. Caipira Verde foram semeadas em bandejas de isopor, contendo o substrato agrícola Plantimax[®] e mantidas em casa-de-vegetação sob condição ambiental. Seis ou sete dias após a semeadura as plântulas foram retiradas das bandejas e transferidas para vasos, contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica autoclavados, sendo mantidas quatro plântulas por vaso. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação sob condições ambientais.

O fungo *C. lagenarium* foi mantido em folhas de pepineiro infectadas e herbarizadas. Para o isolamento do fungo, procedeu-se a desinfestação de pedaços foliares obtidos a partir da área de transição entre o tecido sadio e doente, com hipoclorito de sódio comercial (1 %). Em seguida, os pedaços foliares foram colocados na superfície de meio de cultivo ágar-água (AA) 2%. Após a obtenção das culturas puras, o fungo foi transferido para placas contendo o meio de cultivo aveia-ágar visando estimular a esporulação. As placas foram incubadas a 25 °C, sob luz U.V.-comprimento de onda longo (NUV).

2.2.2.2 Obtenção do extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae*

Para a extração das moléculas eliciadoras de *S. cerevisiae* foi utilizada a levedura de panificação (fermento biológico Fleischmann[®]), sendo que tabletes de 200 g foram dissolvidos em 1 L de água destilada (HAHN; ALBERSHEIM, 1978; WULFF; PASCHOLATI, 1999). Entretanto, para melhorar a extração e a solubilização das moléculas eliciadoras, a levedura foi submetida a autoclavagem, seguindo o procedimento utilizado por Bonaldo (2005). A suspensão de células de *S. cerevisiae* foi autoclavada a 121 °C em quatro etapas com intervalos de tempo diferentes. Na primeira etapa, o material foi autoclavado por 1 h, na segunda, 2 h, na terceira, 3 h e na quarta, 4 h (totalizando 10 h). Em cada etapa de autoclavagem foi realizado o resfriamento

do material em banho de gelo, sendo que após a autoclavagem, a preparação foi centrifugada a 15.000g por 30 min a 4 °C. O precipitado celular foi descartado e o sobrenadante considerado como **extrato bruto aquoso autoclavado (10 h)**.

Outro procedimento de autoclavagem também foi realizado para a extração de moléculas eliciadoras da levedura. Desta vez, a suspensão da levedura foi autoclavada à 121 °C em quatro etapas de 1 h cada (totalizando 4 h) e o resfriamento do extrato foi realizado em banho de gelo em cada intervalo de autoclavagem. Após a autoclavagem, a preparação foi centrifugada a 15.000g por 30 min, o precipitado celular descartado e o sobrenadante obtido foi considerado como **extrato bruto autoclavado (4 h)**.

Em outro tratamento, células da levedura de panificação (200 g.L⁻¹) foram ressuspensas em água destilada, centrifugadas a 15.000g por 30 min, entretanto, não foram submetidas à autoclavagem. Como controle negativo, as plântulas foram pulverizadas com água destilada e no controle positivo foram pulverizadas com Bion[®], na concentração de 0,005 g /100 mL.

2.2.2.3 Precipitação etanólica do extrato bruto aquoso autoclavado de *Saccharomyces cerevisiae*

Ao extrato bruto de *S. cerevisiae* autoclavado por 4 h foi adicionado álcool etílico lentamente, sob agitação e mantido a 4 °C, na proporção de 1:1 (v/v). Após três dias de repouso, o material foi centrifugado a 5.200g por 45 min e o precipitado ressuspenso em água e armazenado em congelador. O álcool foi evaporado do sobrenadante a 50 °C sob pressão reduzida, sendo que após a evaporação, o sobrenadante resultante (750 mL) foi dialisado (membrana com limite de exclusão 12000-14000 Da) contra 15 L de água destilada a 4 °C por 48 h sendo realizada cinco trocas de água (LABANCA, 2002). Após a diálise, a amostra foi concentrada com polietilenoglicol 20.000 até o volume final de 25 mL e em seguida armazenada e congelada. Em cada uma das etapas de purificação foram determinadas as concentrações de proteínas e carboidratos totais.

2.2.2.4 Cromatografia de Troca Aniônica – CTA

Uma amostra de 60 mL do extrato bruto de *S. cerevisiae* autoclavado por 4 h foi concentrada através de liofilização e em seguida ressuspensa em 10 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,01 M, pH (8,0). A amostra foi filtrada em papel de filtro Whatman n° 1 e 5 mL da amostra foi aplicado a uma coluna (2,5 cm de diâmetro x 15,0 cm de comprimento), contendo resina trocadora de ânions equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,01M pH (8,0). O material adsorvido à resina foi eluído de forma gradual *step wise*, utilizando-se as concentrações de 0,125 M, 0,25 M, 0,50 M e 1 M do mesmo tampão, em fluxo de 2,5 mL/min, e a absorbância monitorada a 280 nm, sendo coletadas frações de 6 mL. As frações referentes aos picos foram reunidas e dialisadas contra água destilada. Em seguida, o volume das frações agrupadas foi concentrado cinco vezes, utilizando-se polietileno glicol (PEG 20.000), sendo então utilizadas nos bioensaios com cotilédones de pepineiro em casa de vegetação.

Em outro experimento, 5 mL do extrato bruto da levedura autoclavado por 4 h e liofilizado foi aplicada a coluna e equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 0,01M pH (8,0) e, o material adsorvido à resina foi eluído de forma gradual *step wise*, utilizando-se as concentrações de 0,125 M, 0,25 M, 0,50 M e 1 M do mesmo tampão, em fluxo de 2,5 mL/min, sendo coletadas frações de 6 mL. As frações foram reunidas de acordo com os picos de absorbância a 280 nm, dialisadas (limite de exclusão 8000 a 15000 Da) contra água destilada e o volume inicial de cada pico (frações agrupadas) foi concentrado duas vezes, utilizando-se polietileno glicol (PEG 20.000) e, usadas nos bioensaios com cotilédones de pepineiro.

Outro procedimento de purificação foi realizado em que uma amostra de 4,0 mL do sobrenadante, obtido pela precipitação etanólica (Figura 1), foi aplicada a coluna DEAE-Celulose equilibrada com tampão Tris- HCl 0,01M (pH 8,0). O material adsorvido à resina foi eluído utilizando-se as concentrações de 0,115 M, 0,215 M, 0,500 M e fluxo de 4 mL/min, sendo coletadas frações de 5 mL. As frações foram reunidas de acordo com os picos de absorbância a 280 nm e dialisadas contra água destilada, sendo o volume inicial de cada pico (frações agrupadas) foi concentrado três vezes, utilizando-se polietileno glicol (PEG 20.000) e utilizadas nos bioensaios com cotilédones de pepineiro.

Todo material submetido à coluna de CTA foi filtrado (filtro com poros de 0,2 µm de diâmetro) e degaseificado por 10 min.

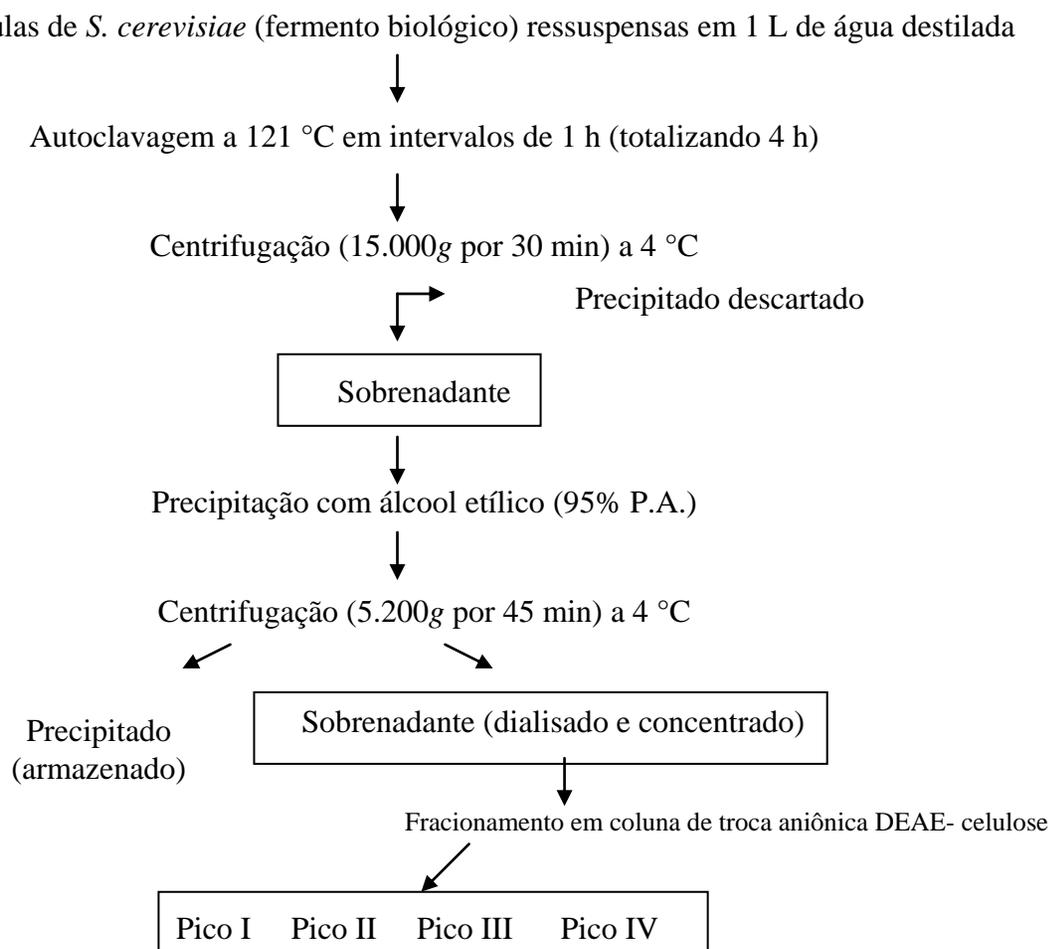


Figura 1 - Etapas gerais do processo de extração e fracionamento de eliciadores de *S. cerevisiae*

2.2.2.5 Bioensaio *in vivo*

Sementes de pepineiro (*Cucumis sativus* L.) cv. Caipira Verde foram semeadas em bandejas de isopor, contendo o substrato agrícola Plantimax[®] e mantidas em casa-de-vegetação sob condição ambiental. Seis ou sete dias após a semeadura as plântulas foram retiradas das bandejas e transferidas para vasos, contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica autoclavados, sendo mantidas quatro plântulas por vaso e cada tratamento consistiu em quatro repetições. Em seguida, cada cotilédone foi pulverizado com os seguintes tratamentos: suspensão de células da levedura não autoclavada ou extratos brutos autoclavados (4 h ou 10 h) ou por frações obtidas na CTA e os controles (água destilada e Bion[®]). Após três dias do tratamento eliciador, as plântulas foram inoculadas com suspensão de conídios de *C. lagenarium* (10^5 conídios mL⁻¹) através de aspersão, e mantidas em câmara úmida por 24 h. Os bioensaios foram

realizados em casa de vegetação sob condição ambiental ou em câmara de crescimento (tipo B.O.D) a 26 °C, sob fotoperíodo (12 h luz / 12 h escuro). A severidade da doença foi avaliada após quatro dias da inoculação das plântulas com o patógeno, em função do aparecimento das lesões nos cotilédones tratados com água destilada. Para tal, cada cotilédone foi destacado da plântula e escaneado para quantificação da área lesionada, com auxílio do Software Quant.

2.2.2.5.1 Efeito do intervalo de tempo entre o tratamento e inoculação com *C. lagenarium* na proteção local de cotilédones de pepineiro

Sementes de pepineiro (cv. Caipira Verde) foram semeadas em bandejas de isopor contendo o substrato Plantimax[®]. Após sete dias da semeadura, os cotilédones foram transferidos para vasos contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica autoclavados, sendo mantidas quatro plântulas por vaso e cada tratamento contendo quatro repetições. Os cotilédones foram pulverizados com água destilada ou extratos brutos de *S. cerevisiae* autoclavados (4 h) e (10 h), aos 3, 5 ou 7 dias, antes da inoculação com o patógeno. Em câmara de crescimento a 26 °C, sob fotoperíodo (12 h luz / 12 h escuro), os cotilédones foram inoculados por aspersão com suspensão de conídios de *C. lagenarium* (10^5 conídios mL⁻¹) e foram mantidos em câmara úmida por 24 h. A severidade da doença foi avaliada após quatro dias da inoculação, em função do surgimento das lesões no tratamento controle (água).

Em outro bioensaio, os cotilédones de pepineiro foram pulverizados com o sobrenadante e o precipitado, obtidos da precipitação etanólica. Cada vaso continha quatro plântulas e cada tratamento consistiu em quatro repetições. Após três dias do tratamento, as plântulas foram inoculadas por aspersão com uma suspensão de conídios de *C. lagenarium* (10^5 conídios mL⁻¹) e foram mantidas em câmara de crescimento a 26 °C, sob fotoperíodo (12 h luz / 12 h escuro). A severidade da doença foi avaliada após quatro dias da inoculação das plântulas com o patógeno, em função do surgimento das lesões no tratamento controle (água).

2.2.2.6 Bioensaio *in vitro*

Com o objetivo de verificar se as preparações de *S. cerevisiae* atuam diretamente sobre o desenvolvimento do patógeno, avaliou-se a germinação de esporos, formação de apressórios e crescimento micelial de *C. lagenarium*. Para o teste com o crescimento micelial, 100 µL de cada tratamento foram espalhados com uma alça de Drigalski sobre a superfície do meio BDA (200 g

L⁻¹ batata, 20 g L⁻¹ dextrose e 15 g L⁻¹ ágar) em placas de Petri com 5 cm de diâmetro. As placas (cinco repetições/ tratamento) foram armazenadas por 12 h, sendo que após este período, as mesmas receberam um disco de 0,3 cm de diâmetro contendo o crescimento micelial de *C. lagenarium* e mantidas sob condições de luz constante, a 26 °C. O crescimento diametral (cm) das colônias foi avaliado por medição a cada 2 dias até o momento em que um dos tratamentos atingisse a borda da placa. Os tratamentos controle consistiram em placas contendo somente água destilada espalhada na superfície do meio ou placas contendo apenas o meio BDA.

Para avaliar a germinação de conídios e a formação de apressórios, 40 µL da suspensão conidial (10⁵ conídios mL⁻¹) e mais 40 µL de um dos tratamentos (água destilada (controle), suspensão de células da levedura e extratos brutos autoclavados) foram depositados em placas de poliestireno, sendo armazenadas em câmara de crescimento a 26 °C, fotoperíodo (12 h escuro/12 h luz). Cada tratamento foi constituído por seis repetições. A germinação de esporos e formação de apressórios foi avaliada após 20 h do início do experimento, através do emprego de lactoglicerol e observação em microscópio ótico (aumento 400 X).

2.2.2.7 Dosagem da concentração de proteínas solúveis e carboidratos totais

A dosagem de proteínas das amostras foi realizada segundo metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando como padrão albumina de soro bovino. Os carboidratos totais foram quantificados nas amostras pelo método fenol sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956), utilizando-se glicose como padrão.

2.2.2.8 Análise de monossacarídeos do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*

A quantificação de monossacarídeos foi realizada no Laboratório Max Feller de Genética de Plantas, Departamento de Genética, ESALQ/USP, sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Alberto Labate. Procedeu-se a quantificação do conteúdo de monossacarídeos do extrato bruto de *S. cerevisiae* autoclavado por 4 h por *High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* – HPAEC – PAD. As amostras foram injetadas com volume de 25 µL determinado pelo *loop* de amostragem.

A coluna utilizada foi a de troca aniônica Dionex[®] CarboPac PA1 (4 x 250 mm) com coluna-guarda CarboPac PA1 (4 x 50mm). As curvas de concentração para cada monossacarídeo foram construídas de acordo com o perfil cromatográfico das amostras com os referidos padrões:

D-Fucose, D-Arabinose, D-Manose e D-Glicose. As quantificações foram realizadas com o auxílio do equipamento ICS 2500, HPLC Dionex® equipado com DS50 gradiente; detector amperiométrico ED50 com eletrôdo de ouro e um amostrador automático AS50. O eluente de arraste utilizado foi 4 mM NaOH e o eluente de limpeza foi 200 mM NaOH, com fluxo de 1 mL.min⁻¹.

2.2.3 Resultados e Discussão

2.2.3.1 Bioensaio *in vivo*

2.2.3.1.1 Efeito dos extratos brutos aquosos de *S. cerevisiae* em cotilédones de pepineiro

Observa-se pela Figura 2 A que os cotilédones tratados com os extratos brutos autoclavados por 4 h ou 10 h apresentaram redução significativa (86% e 82,2%, respectivamente) na severidade da doença, quando comparados com os cotilédones tratados com água. Entretanto, a suspensão de células de *S. cerevisiae* não autoclavada não apresentou efeito protetor significativo nas plântulas (Figuras 2 A e 2 B).

Nota-se que a autoclavagem dos extratos brutos aquosos de *S. cerevisiae* foi necessária no processo de extração de molécula (s) eliciador (as), que possivelmente induziu resistência nos cotilédones de pepineiro contra o fungo patogênico (Figura 2). Wulff e Pascholati (1999) verificaram que o filtrado de células autoclavadas da levedura de panificação (*S. cerevisiae*) causou maior acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo quando comparado com filtrados de células não autoclavadas. Esses resultados indicaram que possivelmente as moléculas eliciadoras são de natureza termoestável.

Sob esse aspecto, Bonaldo (2005) verificou que preparações de *S. cerevisiae* (fermento biológico) autoclavadas seqüencialmente por 1 h, 2 h, 3 h e 4 h (totalizando 10 h) induziu aproximadamente dez vezes mais o acúmulo de fitoalexinas em mesocótilos do sorgo que preparações da levedura autoclavadas por 4 h, uma única vez. A autora relatou que os extratos da levedura autoclavados por 3 ou 4 h seqüencialmente apresentaram maiores concentrações de carboidratos que os extratos autoclavados apenas uma vez. Neste contexto, Hahn e Albersheim (1978) constataram que a atividade eliciadora da fração purificada da levedura de panificação (*S. cerevisiae*) foi proporcional à quantidade de glucanas presentes na fração.

Os processos convencionais para a extração de glucanas da levedura *S. cerevisiae* pode envolver o tratamento com álcali /e ou ácido a quente. Um dos problemas para a extração de

glucanas é sua insolubilidade. Por isso, alguns processos como carboximetilação e sulfoetilação e alguns processos físicos, como tratamento com ultrassom têm sido propostos com o objetivo de aumentar a solubilidade das glucanas (CABIB et al., 1982). Freimund et al. (2003) apresentaram um método de isolamento de β -1,3 glucana de *S. cerevisiae* que consistiu de um processo físico combinado com um tratamento enzimático. O tratamento físico foi a extração a quente (125 °C por 5 h) em solução aquosa de pH neutro não tamponado, seguido de um tratamento enzimático com a protease comercial Savinase. A pureza da glucana obtida foi de 92% e o rendimento foi de 87%. Este processo de isolamento de glucana gerou um subproduto, a manana-proteína, que é um composto que apresenta atividades biológicas, como atividade antioxidante. Neste contexto, a manana extraída de parede celular de leveduras (*Candida utilis*, *Candida albicans* e *S. cerevisiae*) apresentam boa solubilidade e massa molecular relativamente pequena (15-30 KDa) sendo facilmente extraídas por autoclavagem (CABIB et al., 1982).

Vários trabalhos relatam a utilização da autoclavagem para extração de componentes fúngicos com atividade eliciadora na ativação de defesas em plantas. A autoclavagem por 30 min a 121 °C de esporos do fungo *Mucor ramosissimus* favoreceu a extração de eliciadores capazes de induzir a síntese de fitoalexinas em soja e em Rubiaceae nativas (SIMÕES et al., 2005). O extrato bruto aquoso do micélio de *Penicillium chrysogenum*, denominado “Pen”, eliciou respostas de defesa e induziu resistência em plantas de *Arabidopsis thaliana*, tomate, fumo e arroz. Para a preparação do extrato bruto, 150 g de massa seca do micélio de *P. chrysogenum* foram adicionado em 1 L de água destilada e autoclavado por 3 h a 140 °C (THUERING et al., 2006).

No segundo experimento, representado pela Figura 2 B, apenas o extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae* autoclavado por 4 h protegeu significativamente os cotilédones contra a antracnose quando comparado com o tratamento controle. Por sua vez, o extrato bruto autoclavado por 10 h não diferiu significativamente das plantas controle. Desta forma, como o extrato autoclavado por 4 h mostrou maior proteção local dos cotilédones de pepineiro contra antracnose (Figuras 2 A e B), o mesmo foi submetido ao fracionamento dos compostos com atividade eliciadora através da CTA em DEAE-Celulose.

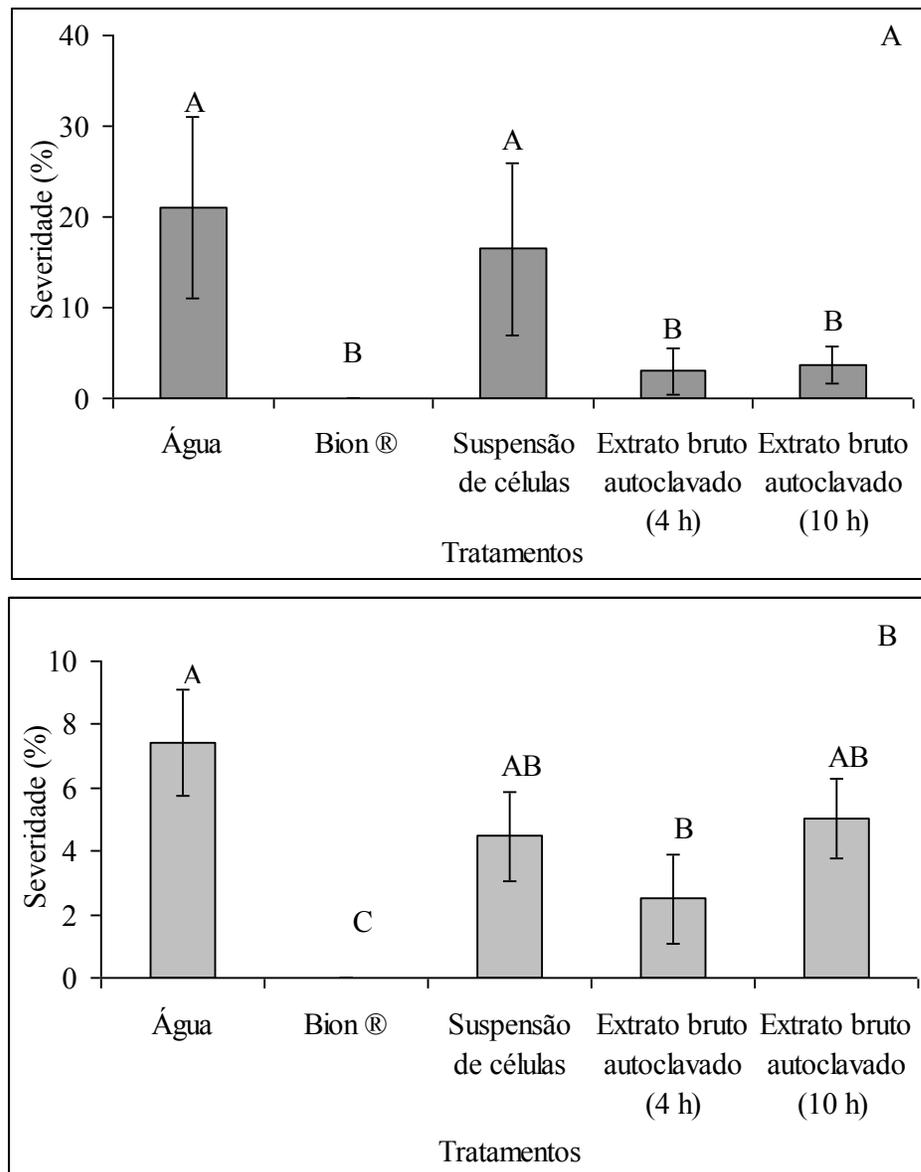


Figura 2 - Efeito da suspensão de células e dos extratos aquosos brutos de *Saccharomyces cerevisiae* autoclavados por 4 h e 10 h na proteção de plântulas de pepineiro contra antracnose. A pulverização das plântulas de pepineiro foi realizada 3 dias antes da inoculação com *Colletotrichum lagenarium*. Barras representam a médias \pm o desvio padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. A) 1º experimento CV= 32,8%. B) 2º experimento CV= 23,51%

2.2.3.1.2 Efeito do intervalo de tempo entre o tratamento e inoculação sobre a proteção de cotilédones de pepineiro contra *C. lagenarium*

A aplicação do extrato bruto autoclavado por 4 h de *S. cerevisiae*, 3 ou 5 dias antes da inoculação do patógeno, reduziu significativamente a severidade da doença quando comparado com o tratamento controle (água). Entretanto, a redução da doença foi maior após 3 dias do tratamento (Tabela 1). Lopez (1991) demonstrou que plantas de sorgo pré-tratadas com *S. cerevisiae* apresentaram aumento no acúmulo de compostos fenólicos em resposta a inoculação com *C. sublineolum*, sugerindo que a levedura pode modificar o metabolismo da planta no sentido de ativar mecanismos de defesa contra o patógeno. Por sua vez, Cia (2005) verificou que a aplicação de células de *S. cerevisiae* (levedura de panificação) na concentração de 20 mg mL⁻¹, 48 e 72 h antes da inoculação de frutos de mamoeiro da cv. Golden com o *Colletotrichum gloeosporioides*, não influenciou na severidade da antracnose. Entretanto, a mesma autora verificou que a aplicação da levedura 24 h antes da inoculação do patógeno nos frutos reduziu significativamente a incidência da doença. Kamida, Pascholati e Bellato (2002) relataram que os mecanismos de proteção de plantas pela levedura, podem ocorrer aparentemente devido à ação direta sobre o patógeno (controle biológico), bem como pela indução de resistência no hospedeiro.

Tabela 1 - Efeito do intervalo de tempo entre o tratamento com o extrato bruto (EB) de *Saccharomyces cerevisiae* autoclavado por 4 h e a inoculação com *Colletotrichum lagenarium* na proteção local de cotilédones de pepineiro contra antracnose

Tratamento	Severidade (%)
Água	10,6 ±3,9 A
EB 3 dias	0,6 ±0,7 B
EB 5 dias	3,3±3,7 B
EB 7dias	4,1±2,4 AB

Nota: Médias ± desvio padrão, seguidas por letras iguais não diferem significamente pelo teste de Tukey a 5%.

2.2.3.1.3 Proteção local de cotilédones de pepineiro utilizando frações parcialmente purificadas do extrato bruto de *S. cerevisiae*

O extrato bruto aquoso autoclavado por 4 h foi submetido à CTA. Os seis picos obtidos foram dialisados contra água destilada e pulverizados em cotilédones de plântulas de pepineiro

(Figura 3). Após três dias do tratamento, as plântulas foram inoculadas com uma suspensão de *C. lagenarium* (10^5 esporos mL⁻¹). Os resultados da Tabela 2 mostram que cotilédones pulverizados com água (controle) apresentaram baixa porcentagem na severidade da antracnose, apesar disso nota-se uma redução significativa da doença em cotilédones tratados com os picos IV e V (frações ligadas à resina) (Tabela 2). Estudos sobre patogenicidade têm revelado variabilidade dentro de espécie de *Colletotrichum*. Por exemplo, Assi et al. (2001) verificaram diferenças na agressividade entre seis isolados de *C. gloeosporioides* de frutos de mangueira por meio de testes de patogenicidade em frutos destacados das variedades Espada, Rosa e Tommy Atkins. Por sua vez, o extrato bruto autoclavado (4 h) foi mais eficiente no controle da doença do que as frações obtidas por CTA (Tabela 2). Segundo Kogel e Beibmann (1992), a perda da atividade eliciadora pode ocorrer após a etapa de purificação, pois o extrato bruto pode conter mais do que um componente eliciador ativo, os quais podem apresentar estruturas diferentes que podem atuar por sinergismo.

Fatores climáticos estão também correlacionados com respostas biológicas (AGRIOS, 1997), como a temperatura que pode exercer influência tanto na infecção quanto na colonização pelo patógeno. Dias et al. (2005) relataram que houve variabilidade entre os isolados de *Colletotrichum* spp., obtidos de cafeeiro, para o crescimento micelial, esporulação e germinação de conídios em relação à temperatura. Os isolados testados *in vitro* apresentaram germinação máxima nas seguintes temperaturas: 22, 27, 29, 33, 30, 34 e 35 °C. Apenas dois isolados apresentaram a mesma temperatura (35 °C) para germinação máxima de conídios. Houve diferença entre a porcentagem de germinação de conídios, sobre papel celofane, também para dois isolados de *C. gloeosporioides* da manga. Um dos isolados formou apressório mais rapidamente a 25 °C e outro a 20 °C (ESTRADA et al., 2000).

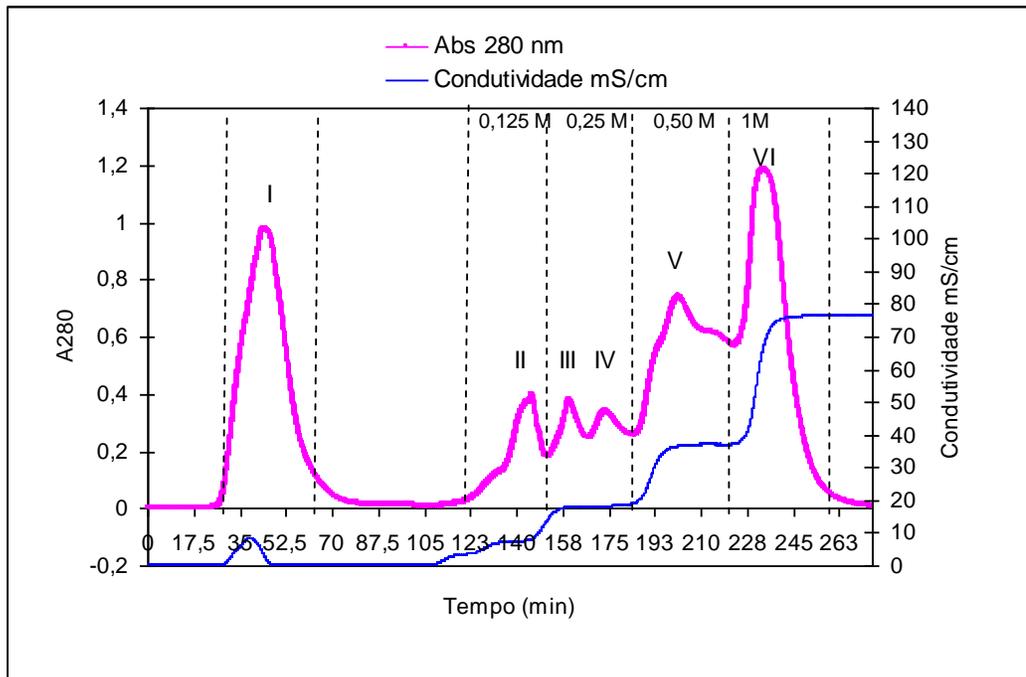


Figura 3 - Cromatografia de troca aniônica do extrato bruto aquoso de *Saccharomyces cerevisiae* autoclavado por 4 h. O material foi aplicado em coluna preenchida com resina DEAE-Celulose, fluxo 2,5 mL/min. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão bicarbonato de amônia 0,01 M (pH 8,0). O material adsorvido foi eluído no mesmo tampão a 0,125 M, 0,25 M, 0,50 M e 1M

Observa-se ainda na Tabela 2, que a concentração máxima de proteínas solúveis (14,07 mg) e carboidratos totais (32,30 mg) foi detectada no pico I (frações não ligadas à resina). Os picos IV e V, os quais protegeram as plântulas contra a antracnose, apresentaram maiores concentrações de proteínas (5,58 mg e 4,15 mg, respectivamente) quando comparados com os picos II e III obtidos por CTA. Carboidratos também foram detectados nos picos IV e V, mas em menores concentrações (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito do extrato bruto (EB) aquoso de *Saccharomyces cerevisiae* autoclavado por 4 h e dos picos (frações agrupadas), obtidos a partir da cromatografia de troca aniônica, sobre a severidade da antracnose em cotilédones de pepineiro

Tratamento	Concentração total de proteínas (mg) ¹	Concentração total de carboidratos (mg) ²	Recuperação (%)		Severidade de antracnose (%) ³	
			Proteínas	Carboidratos		
Água	-	-	-	-	5,32 ± 2,75 A	
EB 4 h	59,65	272,4	100	100	0,6 ± 0,36 DE	
CTA	P I	14,07	32,30	23,58	11,85	3,41 ± 1,53 AB
	P II	0,48	31,02	0,80	11,38	2,37 ± 0,50 BCD
	P III	2,35	0,69	3,94	0,25	3,62 ± 0,52 ABC
	P IV	5,58	0,23	9,35	0,08	1,24 ± 0,92 CDE
	P V	4,15	1,09	6,95	0,40	1,45 ± 0,70 CDE
	P VI	ND	0,10	ND	0,03	5,99 ± 0,78 A

ND = Não detectado

EB= extrato bruto autoclavado por 4 h

CTA= cromatografia de troca aniônica

¹ Quantificação pelo Método de Bradford

² Quantificação pelo Método Fenol- Sulfúrico

³ Médias (± desvio padrão) seguidas por letras iguais não diferem significativamente a 5% pelo teste de Tukey

Na tentativa de obter mais frações da levedura, o extrato bruto autoclavado (4 h) foi novamente submetido à CTA. Nota-se que o perfil das cromatografias representadas pelas Figuras 3 e 4 foi semelhante, entretanto, cinco picos foram obtidos (Figura 4). Observa-se que apenas o pico III proporcionou redução (78 %) na severidade da antracnose quando comparado com os cotilédones tratados com água (Figura 5). Possivelmente, o grupo de moléculas eliciadoras representadas pelos picos IV (Figura 3) e III (Figura 4) possui características semelhantes, pois as moléculas adsorvidas foram eluídas da coluna de troca aniônica a 0,25 M do tampão bicarbonato de amônia. Entretanto, o extrato bruto autoclavado demonstrou maior eficiência na proteção dos cotilédones contra a antracnose, reduzindo em 83 % a severidade da doença (Figura 5).

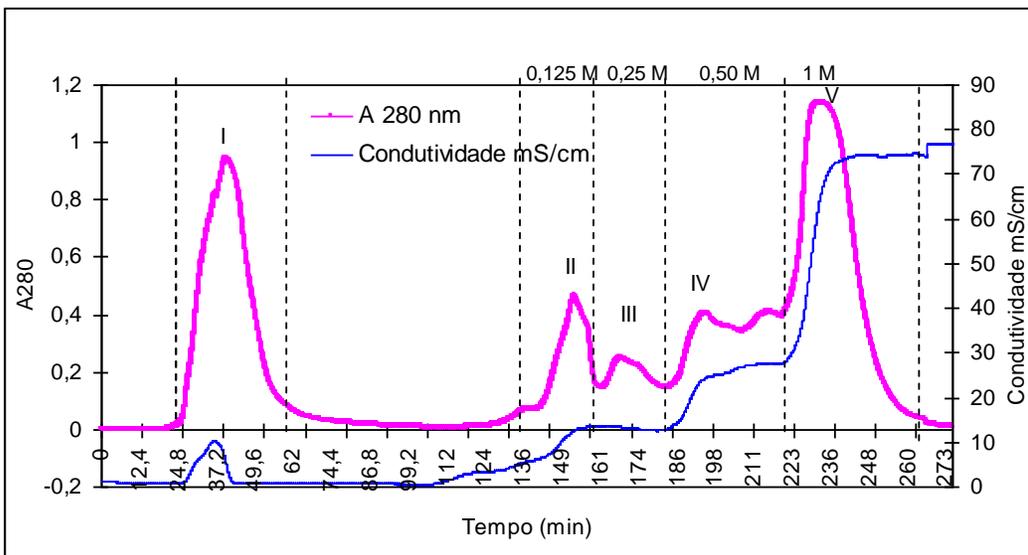


Figura 4 - Cromatografia de troca aniônica do extrato bruto aquoso de *Saccharomyces cerevisiae* autoclavado por 4 h. O material foi aplicado em coluna preenchida com resina DEAE-Celulose, fluxo 2,5 mL/min. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão bicarbonato de amônia 0,01 M (pH 8,0). O material adsorvido foi eluído no mesmo tampão a 0,125 M, 0,25 M, 0,50 M e 1M

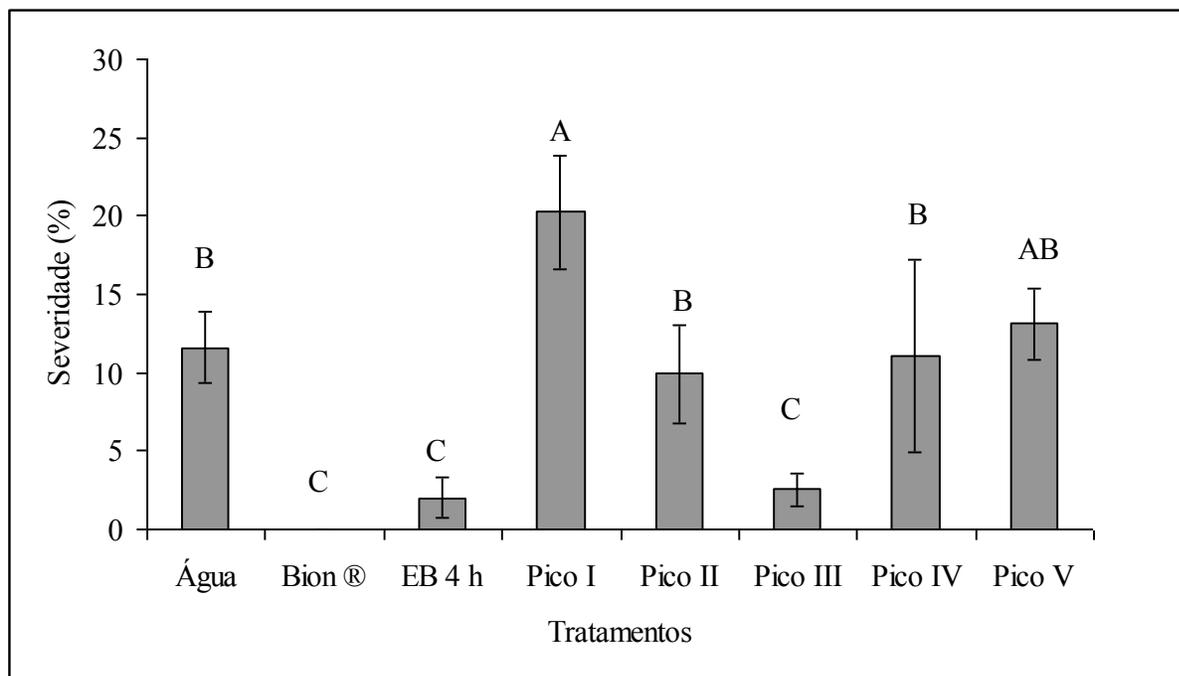


Figura 5 - Efeito dos picos (frações agrupadas) do extrato bruto (EB) autoclavado por 4 h de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidos a partir da cromatografia de troca aniônica e do Bion® sobre a severidade da antracnose. Barras representam a média ± o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. CV= 16,21

Outro procedimento de extração de moléculas eliciadoras do extrato bruto autoclavado (4 h) foi realizado objetivando obter frações com maior efeito protetor das plântulas contra antracnose. Portanto, a próxima etapa consistiu em extrair moléculas eliciadoras do extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae* autoclavado (4 h) através da precipitação etanólica. Observa-se pelas Figuras 6 e 7 que o extrato bruto, o sobrenadante e o precipitado foram eficientes no controle da antracnose reduzindo significativamente a doença em torno de 98%. Para continuar o processo de purificação, o sobrenadante foi escolhido, pois o precipitado mostrou-se pouco solúvel em água dificultando a sua pulverização sobre cotilédones de plântulas de pepineiro.

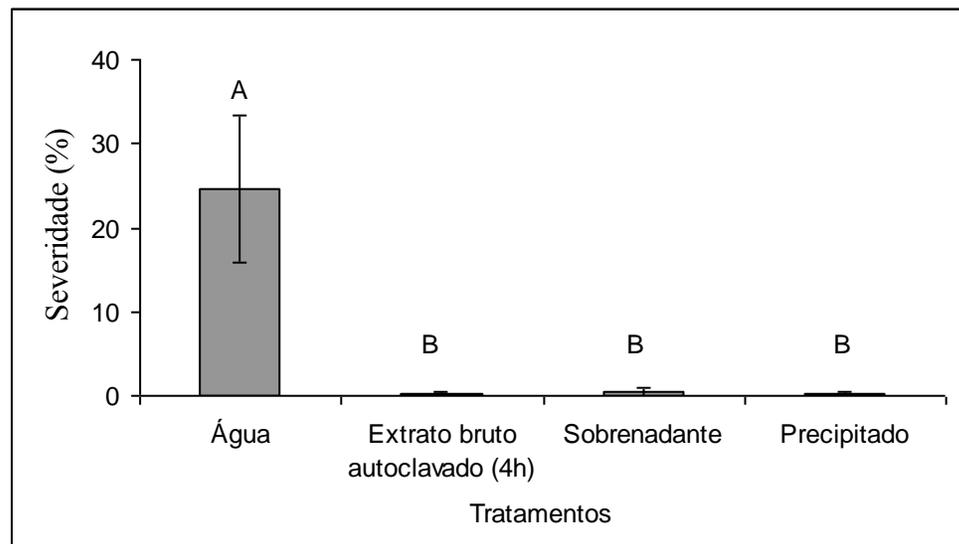


Figura 6 - Efeito das preparações obtidas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a antracnose em cotilédones de pepineiro. O extrato bruto aquoso (EB) autoclavado por 4 h foi submetido à precipitação etanólica, pela qual obteve-se o sobrenadante e o precipitado. Barras representam a média \pm o desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%. CV=22,22

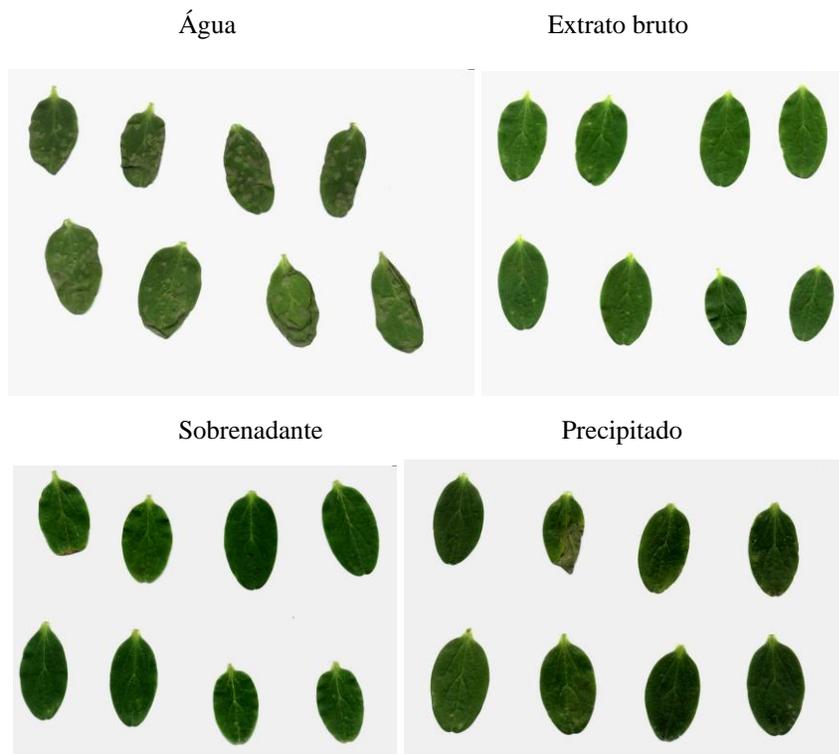


Figura 7 - Efeito das preparações obtidas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre a antracnose em cotilédones de pepineiro. Após 3 dias do tratamento com as preparações da levedura, os cotilédones foram inoculados com uma suspensão de conídios de *Colletotrichum lagenarium*. A avaliação da severidade foi realizada quatro dias após a inoculação

O sobrenadante oriundo da precipitação etanólica, foi submetido à CTA, sendo obtidos 4 picos (Figura 8), os quais foram utilizados no tratamento dos cotilédones.

Nota-se pela Tabelas 3 que os picos I e II, obtidos por CTA apresentaram em sua composição maior concentração de carboidratos (13,2 e 19,2 mg, respectivamente) do que proteínas (0,24 e 4,77 mg, respectivamente). Na etapa de purificação das frações eliciadoras (picos I e II), a recuperação de carboidratos foi maior do que proteínas (Tabela 3). O fato dos picos I e II apresentarem menos proteínas e mais carboidratos provavelmente está correlacionado a maior atividade protetora das plântulas indicando possivelmente carboidratos provenientes da parede celular da levedura.

A Tabela 4 (experimento 1) demonstra que os picos I (frações que não se ligaram à resina) e II (frações que se ligaram a resina) reduziram em 81 e 72 %, respectivamente, a severidade da antracnose, quando comparado com os cotilédones tratados com água. Por sua vez, no experimento 2 (Tabela 4), os picos I e II continuaram protegendo os cotilédones, embora as

plântulas controle (água) tenham apresentado baixa porcentagem da doença. Sob tal aspecto, Labanca (2002) verificou que plântulas de pepineiro tratadas com as frações CA 1 (frações ligadas a resina) e CA 2 (não ligadas a resina) de *S. cerevisiae* apresentaram redução entre 50 e 70 % de área lesionada causada por *C. lagenarium* e aumento da atividade de peroxidases, um marcador bioquímico da possível indução de resistência.

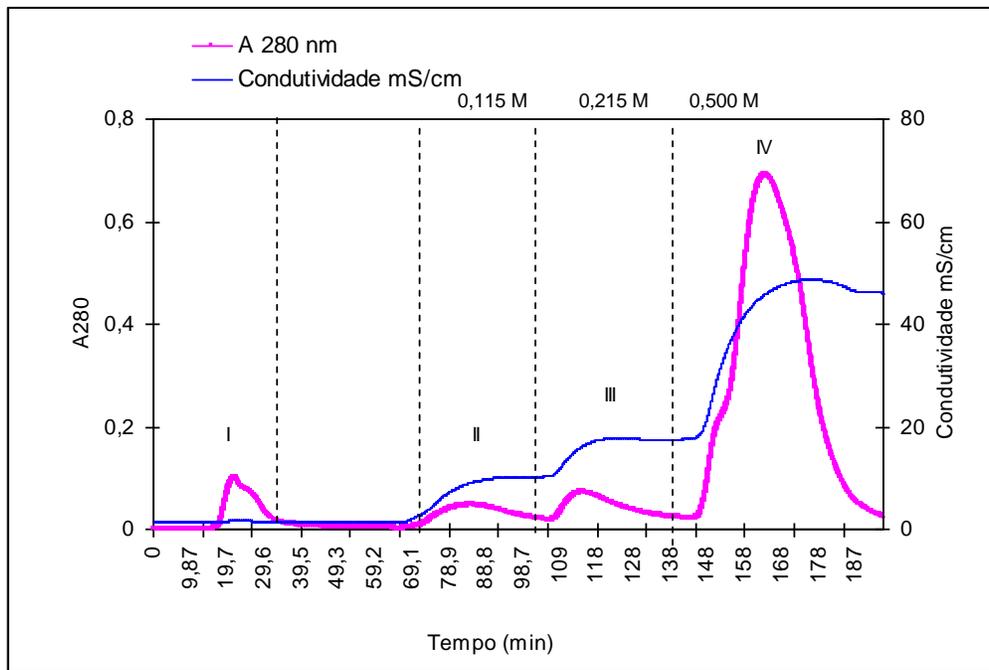


Figura 8 - Cromatografia de troca aniônica do sobrenadante, obtido a partir da precipitação etanólica do extrato bruto aquoso de *Saccharomyces cerevisiae* autoclavado por 4 h. O material foi aplicado em coluna preenchida com DEAE-celulose. A cromatografia foi efetuada com tampão Tris-HCl 0,01 M (pH 8,0) em fluxo 4 mL/min, e o material adsorvido foi eluído com NaCl no mesmo tampão

Tabela 3 - Quantificação de proteínas solúveis e carboidratos totais resultantes das etapas de purificação do extrato aquoso bruto autoclavado por 4 h de *Saccharomyces cerevisiae*

Etapas da purificação	Volume (mL)	Concentração total (mg)		Recuperação (%)	
		Proteínas	Carboidratos	Proteínas	Carboidratos
EB 4h	1000	3.240	24.690	100	100
Sobrenadante ¹	750	855	9.281	26,38	37,59
Sobrenadante dialisado e concentrado ²	4	27,2	63,76	100	100
P I	24	0,24	13,24	0,88	20,76
P II	43	4,77	19,22	17,53	30,14
P III	39	7,99	3,75	29,37	5,88
P IV	44	5,85	5,14	21,50	8,06

¹ Sobrenadante obtido da precipitação etanólica do extrato bruto aquoso autoclavado por 4 h.

² Amostra do sobrenadante obtido da precipitação etanólica a ser submetida a CTA.

Tabela 4 - Efeito dos picos (frações agrupadas) do extrato bruto (EB) autoclavado por 4 h de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidos a partir da cromatografia de troca aniônica, sobre a severidade da antracnose em cotilédones de pepineiro

Tratamento	Concentração		Severidade (%) ³	
	Proteínas (mg/mL) ¹	Açúcares totais (mg/mL) ²	Experimento 1	Experimento 2
Água	-	-	40,10 ± 18,75 A	8,44 ± 3,75 A
P I	0,010	0,552	7,42 ± 3,44 C	2,11 ± 1,82 B
P II	0,111	0,447	11,12 ± 9,87 BC	2,72 ± 1,82 B
P III	0,207	0,097	28,28 ± 15,32 ABC	5,05 ± 3,10 AB
P IV	0,133	0,117	33,19 ± 13,47 AB	5,13 ± 1,54 AB

¹ Quantificação pelo Método de Bradford.

² Quantificação pelo Método Fenol- Sulfúrico.

Médias ± desvio padrão seguidas por letras iguais não diferem significativamente a 5% pelo teste de Tukey.

2.2.3.2 Bioensaio *in vitro*

2.2.3.2.1 Efeito das preparações de *S cerevisiae* sobre o crescimento micelial, germinação de conídios e formação de apressórios por *C. lagenarium*

Nos ensaios *in vitro*, o extrato bruto aquoso autoclavado (4 h), o sobrenadante e o precipitado (precipitação etanólica) não inibiram o crescimento micelial de *C. lagenarium* quando comparado com o tratamento controle (água) (Figura 9). Porém, o extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae* autoclavado (4 h) e o sobrenadante estimularam a germinação de esporos e a formação de apressórios por *C. lagenarium* (Figura 10). Labanca (2002) obteve resultado semelhante, quando constatou que frações obtidas do extrato de *S. cerevisiae* incorporadas em meio de cultivo não alteraram o crescimento micelial de *C. lagenarium*, mas estimularam a esporulação do patógeno.

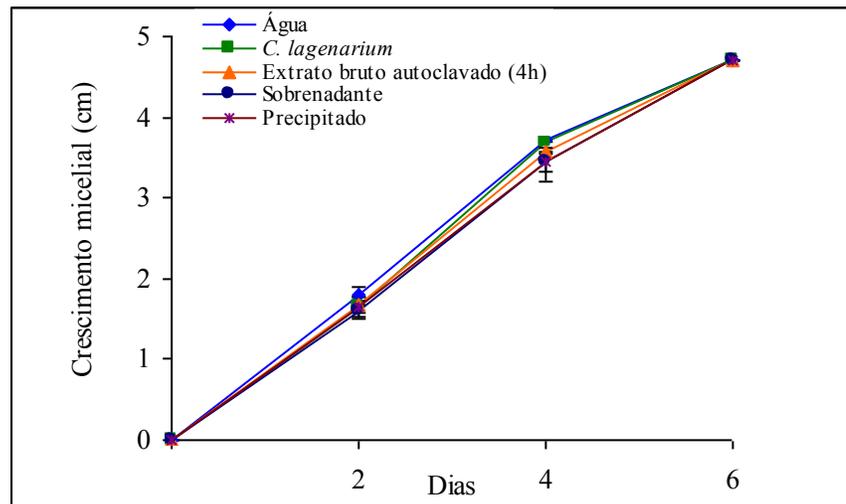


Figura 9 - Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae* no crescimento micelial de *Colletotrichum lagenarium*. EB 4 h (extrato bruto aquoso autoclavado por 4 h). O sobrenadante e o precipitado foram obtidos na precipitação etanólica do extrato bruto autoclavado. Barras representam o desvio padrão da média

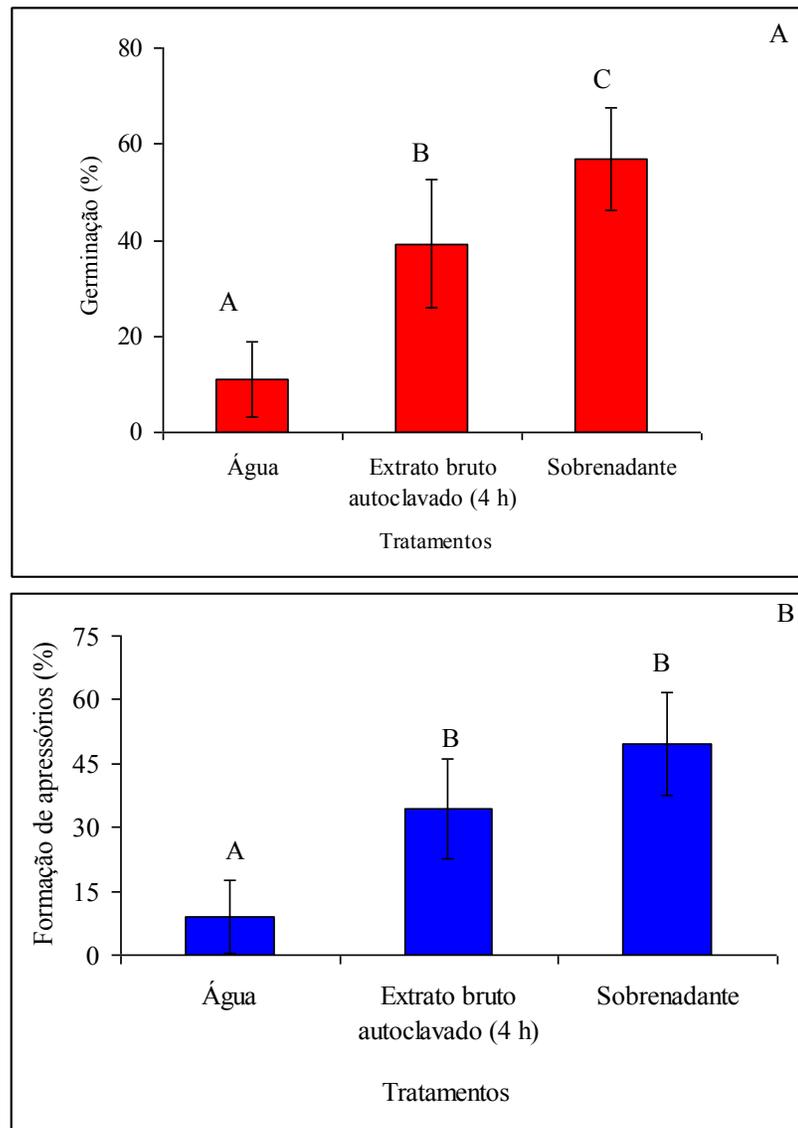


Figura 10 - Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios (A) e na formação de apressórios (B) por *Colletotrichum lagenarium*. Os tratamentos foram: EB 4 h (extrato bruto aquoso de *Saccharomyces cerevisiae* autoclavado por 4 h), sobrenadante, obtido por precipitação etanólica do extrato bruto (EB 4h). Barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

Os seis picos obtidos na CTA (Figura 3) foram utilizados no ensaio *in vitro*, sendo que os resultados mostraram que o extrato bruto de *S. cerevisiae* e os picos II, V e VI estimularam significativamente a germinação dos conídios de *C. lagenarium*. Enquanto que os picos I, III e IV não diferiram do tratamento controle (água) (Figura 11 A). Quanto à formação de apressórios o extrato bruto e os picos II, V e VI também estimularam a formação da estrutura de infecção,

enquanto que, os picos I, III e IV não apresentaram efeito sobre a formação dos apressórios (Figura 11 B). Os resultados indicam que o extrato bruto e algumas frações obtidas na CTA podem ter servido como fontes de nutrientes favorecendo o desenvolvimento de estruturas fúngicas do patógeno. A levedura é mundialmente conhecida como fonte de proteínas, polissacarídeos, vitaminas do complexo B e minerais essenciais (REED; NAGODAWITHANA, 1991). O efeito estimulador do extrato bruto de *S. cerevisiae* e frações de *S. cerevisiae* na germinação de esporos e formação de apressórios por *C. lagenarium* e *Colletotrichum sublineolum* também foram observados por Bonaldo e Pascholati (2007).

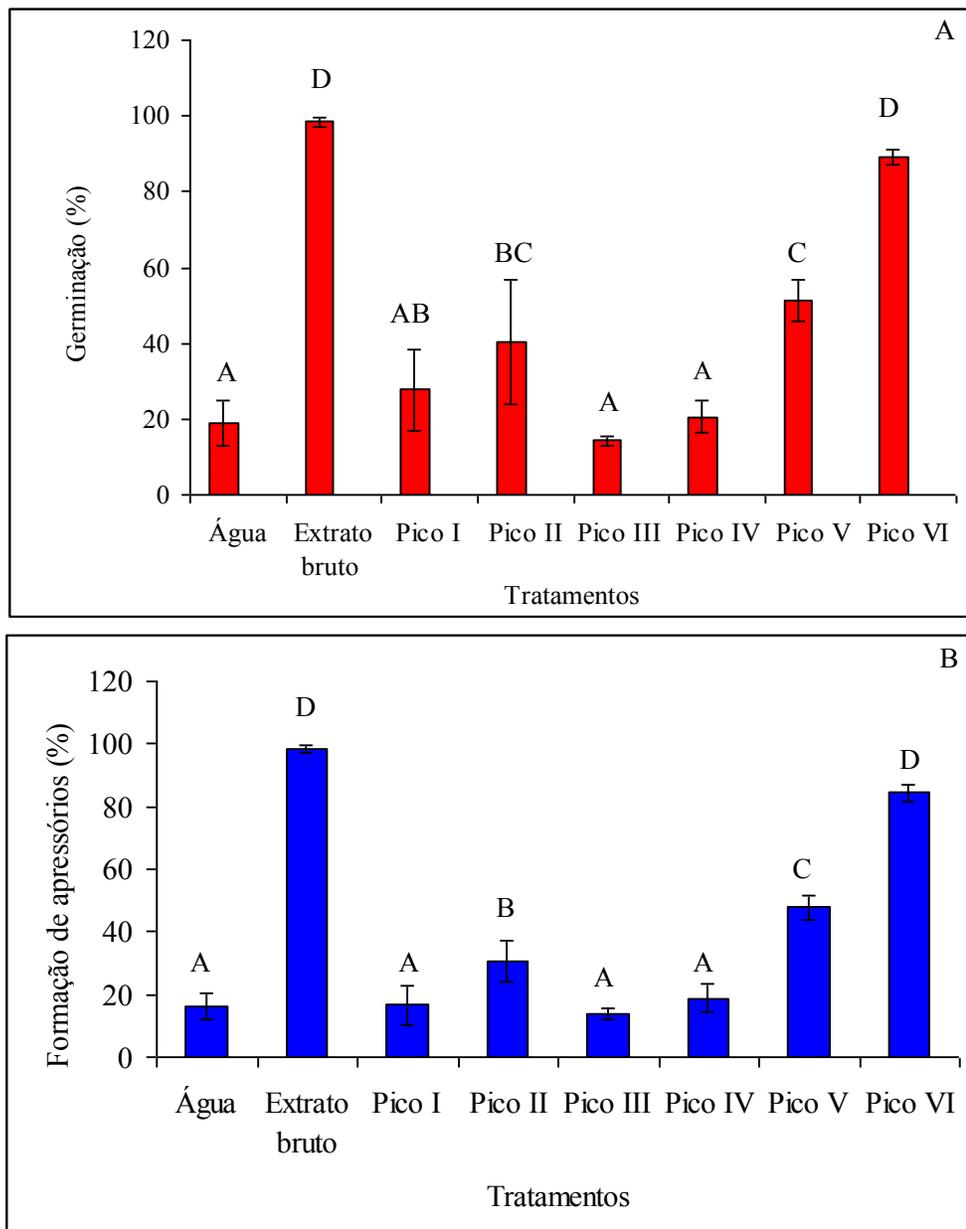


Figura 11 - Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios (A) e na formação de apressórios (B) por *Colletotrichum lagenarium*. Os tratamentos foram: EB 4 h (extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae* autoclavado por 4 h), sobrenadante, obtido por precipitação etanólica do extrato bruto (EB 4h). Barras representam a média \pm desvio padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

2.2.3.3 Análise de monossacarídeos de preparações de *S. cerevisiae*

A análise da composição de açúcares do extrato bruto aquoso de *S. cerevisiae* autoclavado revelou a presença de glicose e manose em maiores proporções, seguidos de arabinose e traços de fucose (Figura 12). A composição de açúcares dos picos I e II também foi analisada, porém não foi detectada nas amostras a presença de monossacarídeos. Considerando que o processo de diálise elimina moléculas menores que 12 KDa, os picos I e II pode conter macromoléculas de naturezas polissacarídica e protéica.

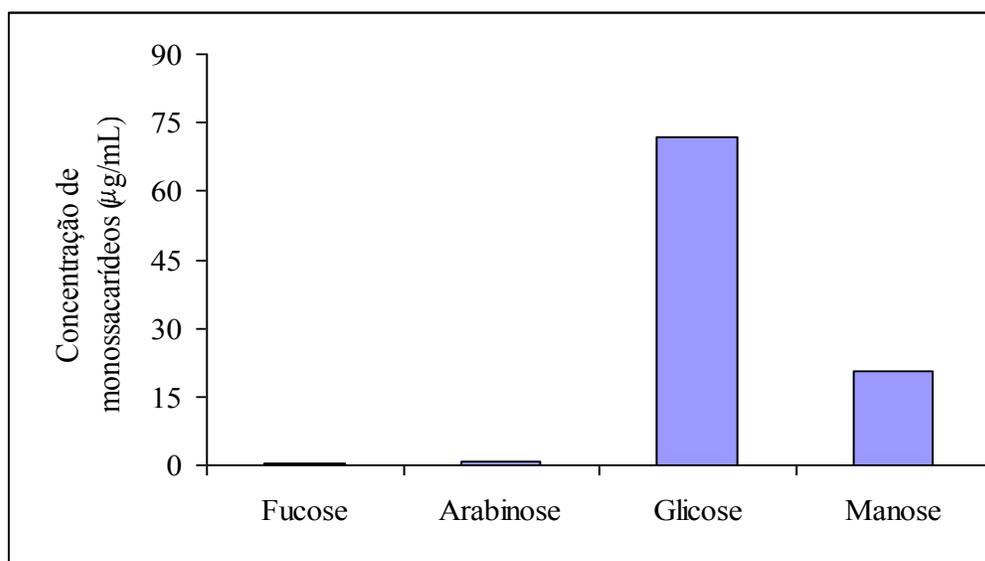


Figura 12 - Monossacarídeos neutros obtida por análises de HPAEC/PAD do extrato bruto de *S. cerevisiae* autoclavado por 4 h

2.3 Considerações finais

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que a levedura comercial *S. cerevisiae* contém frações indutoras de resistência conta a antracnose.

Os compostos com atividade eliciadora estão presentes no extrato bruto autoclavado (4 h), nas frações (sobrenadante e precipitado) obtidas pela precipitação etanólica e nos picos I (frações que não se ligam a resina DEAE-celulose) e II (frações que se ligaram a resina DEAE-celulose) obtidos pela CTA. Provavelmente, os eliciadores presentes nos picos sejam macromoléculas principalmente de natureza polissacarídica, termoestáveis, solúveis em água com massa molecular maior que 12 KDa.

A maior proteção de plântulas de pepineiro induzidas por preparações da levedura *S. cerevisiae* ocorreu aos três dias da inoculação por *C. lagenarium*.

No bioensaio *in vitro*, o extrato aquoso autoclavado e as frações de *S. cerevisiae* não influenciaram o crescimento micelial do patógeno, porém estimularam a germinação de conídios e a formação de apressórios.

A baixa severidade da antracnose causada por *C. lagenarium* e a dificuldade da reprodutibilidade dos resultados dificultaram o avanço do processo de purificação e caracterização das frações com atividade eliciadora.

Referências

AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4. ed. New York: Academic Press, 1997. 635 p.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. 869 p.

ASSIS, T.C.; MENEZES, M.; ANDRADE, D.E.G.T.; COELHO, R.S.B.; OLIVEIRA, S.M.S. Estudos comparativos de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* quanto ao efeito de nutrição de carboidratos no crescimento, esporulação e patogenicidade em frutos de três variedades de mangueira. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 27, p. 208-212, 2001.

BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cell. **Plant Molecular Biology**, Oxford, v. 46, p. 189-214, 1995.

BONALDO, S.M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. 2005. 150 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S. Efeito das frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 233-238, 2007.

BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F. ROMEIRO, R. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. 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. 1, p. 11-28.

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

CABIB, E.; ROBERTS, S.; BOWERS, P. Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 51, p. 763-793, 1982.

CHEN, H.; CHEN, F.; CHIU, F.C.K.; LOB, C.M.Y. The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 28, p. 100-105, 2001.

CHEONG, J.J.; HAHN, M.G. A specific, high-affinity binding site for the hepta β -glucoside elicitor exists in soybean membranes. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 3, p. 137-147, 1991.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. 2005. 187 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

DEISING, H.B.; REIMANN, S.; PASCHOLATI, S.F. Mechanisms and significance of fungicide resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 286-295, 2008.

DIAS, M.D.; POZZA, E.A.; ABREU, M.S.; MIRANDA, E.O. Efeito da temperatura no crescimento micelial produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arabica* L. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, p. 545-552, 2005.

DI PIERO, R.M.; GARCIA, D.; TONUCCI, N.M. Indutores bióticos. In: CALVALCANTI, 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.

DIXON, R.A.; HARRISON, M.J.; LAMB, C.J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopatology**, Lawrence, v. 32, p. 479-501, 1994.

DUBOIS, M.; HAMINTON, K.; REBERS, P.; SMITH, C. Colorimetric methods for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, New York, v. 167, p. 350-356, 1956.

DUTSADEE, C.; NUNTA, C. Induction of peroxidase, scopoletin, phenolic compounds and resistance in *Hevea brasiliensis* by elicitor and a novel protein elicitor purified from *Phytophthora palmivora*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 179-187, 2008.

ESTRADA, A.B.; DODD, J.C.; JEFFRIES, P. Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 49, p. 608-618, 2000.

FIALHO, M. **Efeito *in vitro* de *Saccaromyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citrus**. 2004. 56 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FREIMUND, S.; SAUTER, M.; KAPELLI, O.; DUTHER, H. A new no-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from bakes's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydrate Polymers**, Oxon, v.54, p. 159-171, 2003.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plant. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 34, p. 387-412, 1996.

HAHN, M.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen Interaction-XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. **Plant Physiology**, New York, v. 62, p. 107-111, 1978.

HAMMERSCHMIDT, R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defense: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007. chap. 1, p. 1-8.

ISAAC, S. **Fungal-plant interaction**. London: Chapman & Hall, 1992. 418 p.

JONES, R.W.; PRUSKY, D. Expression of an antifungal peptide in *Saccharomyces*: a new approach for biological control of the postharvest disease caused by *Colletotrichum coccodes*. **Phytopathology**, Lancaster, v. 92, p. 33-37, 2002.

KAMIDA, H.M.; PASCHOLATI, S.F.; BELLATO, C.M. Influência de *Saccharomyces cerevisiae* na expressão gênica da fenilalanina amônia-liase em tecido de sorgo protegido contra *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 26, p. 74-77, 2000.

KLIS, F.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamic of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 26, p. 239-256, 2002.

KOGEL, K.H.; BEIBMANN, B. Isolation and characterization of elicitors. In: LINSKENS, H.J.; JACKSON, J.F. **Plant toxin analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1992. v. 13, p. 239-254.

KUROKAWA, C.; PAVAN, M.A. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1997. cap. 29, p. 325-337.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M.A.; REZENDE, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 293-302.

LABANCA, E.R.G. **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepineiro (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002. 118 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

- LOPEZ, A.M.Q. **Controle alternativo da antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils em sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench)**. 1991. 203 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1991.
- MONTESANO, M.; BRADER, G.; PALVA, E.T. Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 4, p. 73-79, 2003.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. cap. 5, p. 417-453.
- PASCHOLATI, S.F. **Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos**. 1998. 123 p. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.
- PAUW, B.; VAN DUIJN, B.; KIJNE, J.W.; MEMELINK, J. Activation of the oxidative burst by yeast elicitor in *Catharanthus roseus* cells occurs independently of the activation of genes involved in alkaloid biosynthesis. **Plant Molecular Biology**, Oxford, v. 55, p. 797-805, 2004.
- PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defense pathways. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 52-58, 1999.
- PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeast to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 21, p. 400-401, 2003.
- REED, G.; NAGOTHAWITHANA, T.W. **Yeast technology**. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991. 454 p.
- REGO, A.M.; CARRIJO, I.V. Doenças das cucurbitáceas. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. v. 2, p. 535-598.
- REIGNAULT, P.; WALTERS, D. Topical application of inducers for disease. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. **Induced resistance for plant defense: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2007. chap. 10, p. 179-200.
- RESENDE, M.L.V.; BARRETI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.D. da; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 173-242, 2007.
- SILVA, S.R.; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection**, Stuttgart, v. 99, n. 2, p. 159-167, 1992.

SIMÕES, K.; DIETRICH, S.M.C.; HAHN, M.G.; BRAGA, M.R. Purification and characterization of a phytoalexin elicitor from spores of the saprobe *Mucor ramosissimus*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 4, p. 735-744, 2005.

STADNIK, M. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 26, p. 175-177, 2000.

STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 20, p. 16-21, 1994.

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Ed.). **Induced resistance to disease in plants: developments in plant pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 86-110.

STICHER, L.B; MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Lawrence, v. 35, p. 235-270, 1997.

THUERIG, B.; FÉLIX, G.; BINDER, A.; BOLLER, T.; TAMM, L. An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related responses and induces in *Arabidopsis thaliana* independently of known signalling pathways. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 67, p. 180-193, 2006.

SHINYA, T.; MÉNARD, R.; KOZONE, I.; MATSUOKA, H.; SHIBUYA, N.; KAUFFMANN, S.; MATSUOKA, K.; SAITO, M. Novel β -1,3-, β -1,6-oligoglucan elicitor from *Alternaria alternata* 102 for defense responses in tobacco. **FEBS Journal**, Oxford, v. 273, p. 2421-2431, 2006.

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

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

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, Lancaster, v. 95, p. 1368-1373, 2005.

WALLING, L.L. The myriad plant responses to herbivores. **Journal Plant Growth Regulation**, New York, v. 19, p. 195-216, 2000.

WOLSKI, E.A.; LIMA, C.; AGUSTI, R.; DALEO, G.R.; ANDREU, A.B.; LEDERKREMER, R.M. An α -glucan elicitor from the cell wall of a biocontrol binucleate *Rhizoctonia* isolate. **Carbohydrate Research**, Oxford, v. 340, p. 619-627, 2005.

WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, p. 428-435, 1999.

YAMAGUCHI, T.; YAMADA, A.; HONG, N.; OGAWA, T.; ISHII, T.; SHIBUYA, N. Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 12, p. 817-826, 2000.

3 AVALIAÇÃO DE AGENTES BIÓTICOS (*S. cerevisiae* e Agro-Mos[®]) E ABIÓTICO (Bion[®]) NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA CONTRA INSETO (*Tuta absoluta* x TOMATEIRO), NEMATÓIDE (*Meloidogyne incognita* x PEPINEIRO) E ORGANISMO NÃO-ALVO (*Bradyrhizobium elkanii* x SOJA)

RESUMO

A indução de resistência é uma ferramenta que vem sendo utilizada na prevenção e controle de doenças em plantas. Os mecanismos de defesa na planta podem ser ativados por agentes bióticos e abióticos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos de agentes bióticos (levedura comercial *S. cerevisiae* e Agro-Mos[®]) ou abiótico (Bion[®]) na indução de resistência em tomateiro contra o inseto *T. absoluta*, em pepineiro contra o nematóide *M. incognita*, bem como verificar o efeito na interação simbiótica de soja com *B. elkanii*. No experimento com o inseto, plantas de tomateiro foram pulverizadas com o extrato bruto de *S. cerevisiae* autoclavado, Agro-Mos[®] ou Bion[®]. Após 4 dias do tratamento, quatro lagartas foram liberadas sobre folíolos de tomateiros tratados, sendo que a aplicação dos agentes não interferiu significativamente na mortalidade de lagartas, no peso de pupas, na duração e viabilidade larval e pupal. Para o experimento com o nematóide, plântulas de pepineiro foram pulverizadas com o extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* ou Bion[®] em 3 períodos distintos: 4 dias da inoculação das plantas pelo nematóide, no dia da inoculação e 4 dias após a inoculação. Após 45 dias da inoculação das raízes de pepineiro por *M. incognita*, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas, como população final (número de ovos e juvenis), fator de reprodução e massa da matéria fresca das raízes. Para se avaliar o efeito dos agentes bióticos e abiótico na indução de resistência sobre o organismo não alvo, raízes de plantas de soja foram inoculadas com *B. elkanii* e após 48 h da inoculação, cotilédones e o primeiro par de folhas verdadeiras foram tratados com o extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] ou Bion[®]. Em outro experimento, cotilédones e o primeiro par de folhas verdadeiras foram tratados com os agentes e após 48 h, raízes das plantas foram inoculadas com *B. elkanii*. Os resultados mostraram que o tratamento com o extrato da levedura, Agro-Mos[®] e Bion[®] não afetou a nodulação das raízes por *B. elkanii*, a massa da matéria seca e fresca dos nódulos, a matéria seca e fresca da parte aérea, como também a altura das plantas. Porém, plantas de soja tratadas com o extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* exibiram aumento significativo do teor de nitrogênio na parte aérea. De forma geral, os agentes testados não se mostraram eficientes no controle do inseto e do nematóide, porém, não apresentaram efeito negativo na interação simbiótica da soja com o rizóbio.

Evaluation of biotic (*S. cerevisiae* and Agro-Mos[®]) and abiotic (Bion[®]) agents in the resistance induction against insect (*Tuta absoluta* x tomato), nematode (*Meloidogyne incognita* x cucumber) and non-target organism (*Bradyrhizobium elkanii* x soybean)

ABSTRACT

The resistance induction is a tool that has been used in the prevention and control of diseases in plants. The defense mechanisms of the plants can be activated by biotic and abiotic agents. Thus the objectives of this work were to evaluate the effect of biotic agents (commercial yeast *S. cerevisiae* and Agro-Mos[®]) or abiotic (Bion[®]) in the induction of resistance in tomato plants against the insect *T. absoluta*, in cucumber plants against the nematode *M. incognita* as well as to verify the effect of the induction on the symbiotic interaction of soybean and *B. elkanii*. In the experiment with the insect, tomato plants were sprayed with the crude autoclaved aqueous extract of *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] or Bion[®]. After 4 days of the treatment, four caterpillars were placed onto folioles detached from tomato plants. The results showed that the agents did not interfere significantly in the larval mortality, pupal weight and length and viability of larval and pupal stages. For the experiment with the nematode, cucumber plants were sprayed with the crude extract autoclaved of *S. cerevisiae* or Bion[®] in three different times: 4 days before the inoculation of the plants with the nematodes, in the same day of the inoculation and 4 days after the inoculation. After 45 days of the inoculation of cucumber roots, there were no significant differences among the treatments regarding any of the variables analyzed as final population (number of eggs and juveniles), reproduction factor and the root dry weight. The effects of the agents on the symbiotic interaction of soybean and rhizobium were investigated too. Roots of soybean plants were inoculated with *B. elkanii* and after 48 h the cotyledons and the first pair of true leaves were treated with the agents (crude autoclaved extract of *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] or Bion[®]). In another experiment, the cotyledons and the first pair of true leaves were treated with the agents and after 48 h the roots of soybean plants were inoculated with *B. elkanii*. The results showed that the agents did not interfere on the effect on the colonization of soybean roots by *B. elkanii* as well as on the vegetative development of the plants. However, it was verified a significant increase in nitrogen in the stem leaf dry weight of the soybean plants treated with the crude autoclaved extract of *S. cerevisiae*. Finally, the tested agents were not efficient in the control of the insect and the nematode, however, they did not exhibit any negative effect in the symbiotic interaction of soybean with the rhizobium.

3.1 Introdução

O tomate (*Lycopersicon esculentum*) é uma das hortaliças de maior importância no mundo, sendo que o Brasil ocupa o oitavo lugar na produção mundial e o sétimo no processamento (CAMARGO FILHO, 2001). Os principais estados brasileiros produtores de tomate são Goiás, São Paulo e Minas Gerais, além de algumas regiões do Espírito Santo (CANÇADO JÚNIOR et al., 2003). Atualmente, o tomate é considerado uma cultura de alto risco, devido sua alta suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças (LOOS et al., 2004). Uma das pragas mais importantes da cultura é a traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) (Lepidoptera: Gelechiidae), sendo que o inseto ocorre em todo o ciclo da cultura atacando folhas, ramos e frutos. O controle da traça tem sido feito, em geral, através de aplicações sucessivas de inseticidas sintéticos. O uso contínuo destes produtos é indesejável por vários motivos, dentre os quais pode-se citar o desenvolvimento de populações resistentes do inseto, o aparecimento de novas pragas ou a ressurgência de outras, a ocorrência de desequilíbrios biológicos, os efeitos prejudiciais aos inimigos naturais, ao homem e animais, além de seu alto custo (BRUNHEROTTO; VENDRAMIM, 2001).

Outro parasita que tem provocado sérios danos as culturas de interesse econômico são os nematóides, principalmente aqueles formadores das galhas em raízes (gênero *Meloidogyne* spp.), de cistos (*Globodera* e *Heterodera* spp.) e os migratórios (*Pratylenchus* e *Radopholus* spp.). Pesquisas têm estimado prejuízos na produção que chegam até 20% para algumas culturas e em termos monetários, as perdas mundiais excedem 100 bilhões de dólares anualmente (BIRD; KALOSHIAN, 2003). Os nematicidas têm sido utilizados no controle destes parasitas de plantas, porém, recentemente, preocupação como a contaminação do meio ambiente, a toxicidade aos seres vivos, e resíduos em alimentos têm causado muitas restrições ao uso de produtos químicos na agricultura (THOMASON, 1987).

Dentre as alternativas ao controle químico, várias outras técnicas vêm sendo estudadas, como a indução de resistência em plantas. Considerada uma promissora tecnologia para a proteção das espécies vegetais, a indução de resistência tem por objetivo ativar os mecanismos latentes de defesa de um hospedeiro vegetal suscetível ou moderadamente resistente contra o ataque de patógenos (PASCHOLATI et al., 2005).

Uma ampla quantidade de substâncias de origem biótica ou não biótica, de natureza e estrutura diversificadas tem demonstrado eliciar várias reações de defesa em plantas. Essas substâncias são conhecidas como indutores (eliciadores), são geralmente inespecíficas, pois

ativam reações de defesa não específicas em diferentes espécies vegetais a vários patógenos. Entretanto, diferenças quanto à eficiência dos indutores podem existir.

Outro aspecto da indução de resistência é seu efeito sobre organismos benéficos. Na resistência, alterações metabólicas ocorrem nas plantas, quando estas reconhecem o eliciador e inicia-se a ativação de mecanismos de defesa, como a síntese de metabólitos secundários, alterações fisiológicas, fortalecimento da parede celular com a deposição de lignina, produção de quitinases e glucanases e a imediata produção de espécies ativas de oxigênio (RADMAN et al., 2003). Neste contexto, relações benéficas entre plantas e organismos podem ser prejudicadas. Estas relações envolvem fungos simbiotes, rizóbios, bactérias promotoras de crescimento, inimigos naturais de predadores ou parasitas de herbívoros e polinizadores (KUHN et al., 2006).

Há poucos trabalhos na literatura investigando o efeito negativo da aplicação de agentes indutores em plantas na colonização por microsimbiontes. Dada a importância das simbioses mutualísticas para leguminosas de relevância econômica, tal efeito não é desejável. As leguminosas como soja geram grande interesse pelo fato de serem cultivadas na ausência de adubação nitrogenada, pois o processo de fixação de nitrogênio atmosférico ocorre em função da associação simbiótica entre bactérias do solo e as leguminosas. Assim, o nitrogênio necessário para o desenvolvimento da soja poderá ser fornecido eficientemente através da simbiose com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (KUYKENDALL; SAXENA; DEVINE, 1992). Do ponto de vista econômico, o processo de fixação de nitrogênio permite que o cultivo da soja no país atinja alta produtividade sem a aplicação de produtos nitrogenados no solo, resultando na economia de bilhões de dólares por safra em fertilizantes (DOBEREINER, 1997).

Em vista do exposto, esta linha de investigação na indução de resistência proporcionará novas informações sobre o custo e benefício da defesa das plantas e será potencialmente usada para o desenvolvimento de novas estratégias para a proteção das culturas (PIETERSE; DICKE, 2007). Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de alguns agentes bióticos (*S. cerevisiae* e Agro-Mos[®]) e abiótico (Bion[®]) na indução de resistência em tomateiro contra *T. absoluta*, em pepineiro contra *M. incognita* e na interação simbiótica da soja com *Bradyrhizobium elkanii*.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão bibliográfica

3.2.1.1 Indutores de resistência

As plantas possuem mecanismos de defesa que podem ser ativados local e sistematicamente tornando-se mais resistentes contra patógenos por meio do tratamento com indutores de resistência. O agente indutor é qualquer composto ou fator capaz de ativar mecanismos de defesa da planta. Um indutor de resistência contém uma ou mais moléculas responsáveis diretamente pela ativação da defesa, sendo que essas moléculas são denominadas eliciadores (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO; 2005).

Os indutores de RSI variam muito e podem incluir fungos, bactérias, vírus, nematóides, insetos, metabólitos e produtos de patógenos ou não patógenos, polímeros orgânicos e inorgânicos (KUC, 2001).

Os eliciadores podem ser agrupados de acordo com sua origem, em bióticos e abióticos. Os eliciadores bióticos são divididos em exógeno (moléculas ou fragmentos de parede celular de microrganismos patogênicos ou não patogênicos ou compostos isolados do meio de cultivo do microrganismo) e endógeno (moléculas liberadas da planta) como por exemplo, oligogalacturonídeos ou outros oligômeros de parede celular. Por sua vez, os abióticos incluem agentes físicos (temperatura, radiações UV e gama) e químicos como moléculas orgânicas sintetizadas como o acibenzolar-S-metil, ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno, íons metálicos, alguns antibióticos e fungicidas. Esta classificação se sobrepõe à medida que as substâncias de origem biológica estão sendo sintetizadas em condições de laboratório (RESENDE et al., 2007).

Compostos como o acibenzolar-S-metil, comercializado no mercado sob as marcas Bion[®] na Europa e Actigarg[®] nos EUA, elicia respostas de defesa em uma variedade de espécies vegetais contra vários patógenos (fungos, bactérias e vírus) e em alguns nematóides e insetos (INBAR et al., 2001). Outro produto que tem demonstrado eficiência no controle de doenças é o Agro-Mos[®] produto comercial à base de mananoligossacarídeo fosforilado da parede celular da levedura *S. cerevisiae*, desenvolvido pela Improcrop do Brasil, uma subsidiária da Alltech Biotechnology. Em um estudo testando produtos que atuassem como indutores de resistência na proteção de mamões contra podridões pós-colheita foi verificado que a aplicação de Agro-Mos[®]

reduziu a incidência de antracnose em torno de 70 %, no entanto, o produto não foi eficiente no controle da podridão causada por *Lasiodiplodia* (DANTAS et al., 2004).

3.2.1.2 Mecanismos envolvidos na resistência de plantas a nematóides e insetos

Os nematóides parasitas de plantas, embora representem uma pequena minoria de espécies dentro do filo Nematoda, recebem ampla atenção, principalmente por serem considerados fator limitante na produção agrícola em culturas como batata, beterraba, cereais, soja e tomate (BAKKER et al., 2006).

A indução de resistência em plantas contra fitonematóide pode variar de acordo com a espécie e o estado nutricional da planta hospedeira, do tipo de indutor e patógeno envolvido. Embora haja poucos trabalhos que relatam a eficácia da indução de resistência em plantas contra fitonematóides, acredita-se que no contexto da preservação do meio ambiente, a indução de resistência em plantas pode ser incluída em programas de manejo integrado contra nematóides, reduzindo assim o uso de nematicidas (SALGADO; SILVA, 2005).

Os hormônios de plantas como o ácido jasmônico e o etileno têm um papel fundamental na sinalização da expressão de defesas em plantas. Alguns genes de defesa estão sob o controle da rota do jasmonato, como aqueles que codificam para inibidores de proteinases (IPs), proteínas cruciais para impedir a alimentação e o desenvolvimento do nematóide (GHEYSEN; FENOLL, 2002).

Duas principais respostas de resistência têm sido estudadas, baseadas em observações microscópicas de várias interações incompatíveis entre nematóides e plantas. O primeiro tipo é caracterizado por uma rápida reação de hipersensibilidade resultando em necrose no sítio de alimentação, que ocorre alguns dias após a infecção, enquanto que o segundo tipo bloqueia o desenvolvimento de células nutritoras em um estágio mais recente do processo de infecção pelo nematóide. A reação de hipersensibilidade é um mecanismo de defesa que ocorre contra ampla variedade de patógenos, incluindo nematóides endoparasitas, sendo caracterizada pela explosão oxidativa resultante da produção de espécies ativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-) e acúmulo de fenilpropanóides (BAKKER et al., 2006). A ativação de rotas metabólicas envolvidas na biossíntese de fitoalexinas, deposição de calose e/ou lignina e acúmulo de compostos fenólicos são algumas respostas de defesa das plantas contra

fitonematóides. Outros mecanismos têm sido relatados na resistência de plantas a nematóides, como aumento da atividade de enzimas como fenilalanina amônia-liase (FAL), acúmulo de peroxidases, polifenoloxidasas, superóxido dismutase, quitinases e inibidores de proteinases (SALGADO; SILVA, 2005).

A resistência induzida a insetos está geralmente associada à via do octadecanóide (biossíntese do ácido jasmônico) que leva a produção de inibidores de proteinase e metabólitos secundários, como compostos fenólicos, terpenos, alcalóides, glucosinolatos, hidrocarbonos e glicosídeos cianogênicos (INBAR et al., 2001). Porém, outras vias podem ser acionadas na respostas de defesas das plantas ao ataque de insetos. Por exemplo, insetos sugadores como os afídeos são conhecidos por eliciar defesas de plantas reguladas pela via do ácido shiquímico (ácido salicílico), enquanto que lagartas mastigadoras de folhas, eliciam respostas reguladas pela via do ácido jasmônico (POELMAN; VAN LOON; DICKE, 2008).

3.2.1.3 Indução de resistência em plantas e efeitos sobre interações simbióticas com microrganismos

A resistência induzida é uma forma não específica de resistência em plantas que pode ser ativada por indutores (eliciadores) contra várias espécies de patógenos. A produção de compostos tóxicos pela planta com a finalidade de barrar o agente agressor poder causar danos ao tecido e conseqüente redução da produtividade. Após o reconhecimento das moléculas eliciadoras, a planta aciona rotas de sinalização que levarão a expressão de vários mecanismos de defesa, como a síntese de fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas - RP) e alterações na composição da parede celular vegetal, que estão associadas com a RSI ou com a RSA contra patógenos (WALTERS; HEIL, 2007). A expressão de respostas de defesa pode causar um custo ecológico ao interferir nas interações mutualísticas entre plantas e simbiontes (KUHN et al., 2006).

Os custos ecológicos são uma característica da indução de resistência que pode resultar em efeitos negativos nas interações mutualísticas de plantas com outros organismos. Assim, na simbiose de leguminosas-*Rhizobium*, vários estudos tem mostrado que a aplicação de ácido salicílico resultou em efeito negativo na formação e/ou funcionamento dos nódulos em raízes de leguminosas (WALTERS; HEIL, 2007). Resultados similares foram obtidos por Ramanujam et

al. (1998), os quais verificaram que o tratamento com o AS em *Vigna mungo* reduziu a nodulação e a atividade fixadora de nitrogênio. Em experimentos com plantas de soja foi observado que a aplicação exógena de AS, na concentração de 5 mM, reduziu o número, a matéria seca de nódulos de raízes e o crescimento das plantas (LION et al., 2000).

Outros estudos têm mostrado efeitos inibitórios no desenvolvimento e na atividade de nódulos de raízes em plantas tratadas com indutores químicos. Após seis semanas do tratamento com Bion[®], plantas de *Vicia faba* apresentaram nódulos menores e em menor quantidade que aquelas não tratadas (HEIL, 2001). Resultados contraditórios foram obtidos por Sonnemann, Finkhaeuser e Wolters (2002), os quais verificaram o efeito da resistência induzida por Bion[®] em plantas de cevada e na biota do solo. Os autores relataram que o tratamento com o indutor não alterou a composição da biota do solo, como também não influenciou a infecção de raízes das plantas por fungos micorrízicos. Entretanto, o Bion[®] reduziu significativamente o crescimento das raízes e aumentou a infecção das mesmas pelo nematóide parasita *Pratylenchus*. Segundos os autores, as plantas respondem à indução de resistência de várias formas: alterações na fisiologia e morfologia da raiz, alocação de carbono e exsudação radicular. A exsudação radicular constitui em importante fonte de carbono para a microbiota e macrobiota do solo e pode ser significativo na atuação da microbiota decompositora. A exsudação radicular pode influenciar diretamente organismos simbioses, parasitas, saprófitos e fitopatógenos rizosféricos.

Alguns efeitos negativos da defesa podem afetar relações mutualísticas entre planta e microrganismos. Por exemplo, fatores nod (fatores que permitem a bactéria *Rhizobium leguminosarum* infectar raízes das plantas) contêm uma cadeia de quitina, a qual pode ser hidrolisada por quitinases, sintetizadas pela planta hospedeira, interferindo assim na infecção pelo rizóbio (OLDROYD, 2001). A expressão de β -1,3 glucanase interferiu na colonização do fungo micorrízico arbuscular *Glomus mosseae* em raízes de plantas de fumo (VIERHEILIG et al., 1994).

3.2.1.4 A traça-do-tomateiro

O traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*) (Meyrick) é um microlepidóptero que ocorre em toda América do Sul, incluindo Venezuela, Colômbia, Chile, Bolívia, Argentina, Peru, Uruguai e Brasil (BRUNHEROTTO; VENDRAMIM, 2001). É considerada, atualmente, uma das principais

pragas da cultura do tomateiro no Brasil, devido à alta incidência da praga em áreas de cultivo, podendo causar perdas de 25% a 50% dos frutos (VILLAS BÔAS; CASTELO BRANCO; MEDEIROS, 2005).

A biologia de *T. absoluta* caracteriza-se por um ciclo com 40 dias aproximadamente, o qual pode variar de acordo com as condições ambientais a que o inseto é submetido. A traça apresenta comportamento crepuscular-noturnos-aurorais, permanecendo na face inferior das folhas das plantas de tomateiro durante o dia. A postura dos ovos pode ocorrer em folhas, hastes ou frutos, sendo que os ovos apresentam coloração branco-brilhantes ou amarelo-claros, tornando-se avermelhados ou marrons próximos à eclosão da lagarta (SILVA; CARVALHO, 2004).

Os adultos são pequenas mariposas de coloração cinza prateada com aproximadamente 1 cm de comprimento. As lagartas de 1º ínstar são verde-claras, possuem a cabeça maior do que o corpo, enquanto que lagartas dos ínstars posteriores apresentam coloração verde, intensificada à medida que as lagartas crescem. A pré-pupa apresenta cor verde-escura e uma faixa longitudinal dorsal rósea a avermelhada e mede aproximadamente 9 mm de comprimento. As pupas apresentam coloração marrom-amarelada (SILVA; CARVALHO, 2004).

Os danos são ocasionados durante todo ciclo da cultura do tomateiro e atingem folhas, brotações, flores, hastes e fruto. As lagartas formam galerias irregulares (minas) nas folhas e se alimentam destas. Ao final do ciclo das lagartas, é possível observar nas folhas locais transparentes, os quais consistem apenas em epidermes. Os frutos danificados ficam impróprios para a comercialização, além disso, aberturas deixadas pelos insetos facilitam a entrada e a infecção por patógenos (VILLAS BÔAS; CASTELO BRANCO; MEDEIROS, 2005).

O controle químico é uma das práticas mais empregada pelos agricultores, sendo que em algumas regiões chegam a fazer duas a três aplicações semanais. Estudos indicam que o uso constante de inseticidas pode favorecer a seleção de populações de insetos resistentes. Além disso, a aplicação de inseticidas não é suficiente para eliminar toda população de inseto presente na lavoura (CASTELO BRANCO et al., 2001). Segundo Villas Boas, Castelo Branco e Medeiros (2005), o controle de pragas é um processo complexo e não pode ser utilizado um único método, e sim, pelo manejo integrado que envolve medidas de controle cultural, biológico e químico, quando necessário.

3.2.1.5 *Meloidogyne incognita*

Os nematóides formadores de galhas (gênero *Meloidogyne*) constituem o grupo de parasitas de plantas, considerados mundialmente, de maior importância econômica, atacando mais de 2000 espécies de plantas causando elevados danos à agricultura. Estes parasitas estão amplamente distribuídos, principalmente nos países tropicais, apresentando uma extensa gama de hospedeiros, além disso, estão entre os principais patógenos de plantas responsáveis por afetar a produção mundial de alimentos (HUSSEY; JANSSEN, 2002).

Dentre as espécies de *Meloidogyne*, consideradas importantes economicamente, encontram-se *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla*, as quais são responsáveis por 95 % da infestação em áreas cultivadas. Estas espécies atacam culturas de grande importância como pimentão, tomate, pepino, beterraba, repolho, brócolis, salsa, abóbora, goiaba, fumo e café (SIKORA; FERNÁNDEZ, 2005).

Os nematóides formadores das galhas são endoparasitas sedentários e biotróficos altamente evoluídos que possuem uma relação alimentar complexa com seu hospedeiro. Em *Meloidogyne*, larvas juvenis de segundo estágio (J2) eclodem dos ovos, migram no solo em busca de raízes de uma planta hospedeira. Após infectar as mesmas, os juvenis migram intercelularmente em tecidos corticais da região da raiz, diferenciando a célula da raiz em célula com função de nutrir o parasita ao longo de seu ciclo de vida. Desta forma, os juvenis induzem a formação de um sítio permanente de alimentação. Plantas severamente infectadas por *Meloidogyne* apresentam o sistema radicular reduzido e o sistema vascular completamente desorganizado, prejudicando a absorção e o transporte de água e nutrientes.

Uma vez que fitonematóides sejam introduzidos em uma área, é praticamente impossível erradicá-los completamente, pois seus ovos permanecem viáveis por longos anos no solo. Assim, o emprego de medidas adequadas de controle pode favorecer a redução da população de fitonematóides e a manutenção dos mesmos em níveis baixos. Alguns métodos de controle empregados em áreas infestadas com nematóides incluem, entre outros métodos, a rotação de culturas, destruição de plantas infectadas, plantas antagonistas, controle biológico, variedades resistentes e controle químico. O uso de nematicidas, no controle químico, vem sofrendo restrições em alguns países, pois possui vários inconvenientes como a alta toxicidade, elevado custo, persistência no solo, contaminação de águas subterrâneas, amplo espectro de ação sobre

organismos benéficos do solo e aparecimento de populações de nematóides mais resistentes (HUSSEY; JANSSEN, 2002).

3.2.1.6 Rizóbios e interações simbióticas com leguminosas

Em sistemas simbióticos fixadores de nitrogênio atmosférico, bactérias do solo gram-negativas do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* conhecidas como rizóbio, podem estabelecer interações simbióticas com plantas da família Leguminosae (Fabaceae). Durante a simbiose, os nódulos são formados em raízes de leguminosas, nos quais bactérias diferenciadas fixam o nitrogênio atmosférico que é posteriormente transformado em amônia, sendo convertido em amidas e ureídos. Em troca, a planta fornece à bactéria fotoassimilados, principalmente sacarose (CORDEIRO, 2004).

A associação simbiótica entre rizóbio- leguminosa é baseada em uma intensa troca de sinais entre ambas as partes e em um alto nível de especificidade da planta hospedeira. Muitos compostos estão envolvidos nessa etapa de reconhecimento e aderência, uma vez que para a nodulação ocorrer, a planta precisa ser suscetível e compatível com o tipo de rizóbio. Plantas leguminosas excretam flavonóides que interagem com uma ou mais proteínas regulatórias Nod D da bactéria para induzir a expressão de genes responsáveis pela nodulação, como também a ativação de enzimas envolvidas na produção e secreção de moléculas sinais (lipo-oligossacarídeos), as quais são responsáveis para a formação dos nódulos (VAN SPRONSEN et al., 2003).

O rizóbio nativo ou introduzido no solo, por meio de inoculação necessita multiplicar próximo à raiz, a qual exuda alto nível de nutrientes (açúcares, aminoácidos, vários ácidos dicarboxílicos e compostos aromáticos), sendo que muito deles, atuam como atrativo para a bactéria (GARD; GEETANJALI, 2007). Apenas a presença da bactéria na rizosfera da leguminosa pode induzir a formação de estrutura nodular sem a entrada dos microrganismos, sugerindo que a mesma produz um sinal que desencadeia a multiplicação de células corticais (CORDEIRO, 2004).

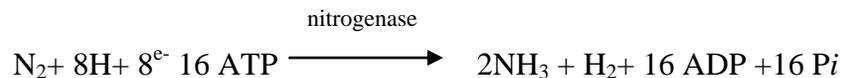
A penetração ou infecção radicular da bactéria pode ocorrer de três formas: através do pêlo radicular com a formação de uma estrutura tubular (corrente de infecção), pela epiderme intacta e por rupturas da epiderme e do córtex provocadas pelas raízes laterais ou ferimentos.

Em plantas de soja (*Glycine max*), as bactérias produzem enzimas que degradam parte da parede celular, sofrendo uma invaginação, iniciando a produção de uma estrutura tubular (corrente de infecção), no interior da qual as bactérias são conduzidas até as células corticais jovens, e estas se dividem. Após serem liberadas da corrente de infecção, as bactérias sofrem transformações morfológicas e fisiológicas, passando a ser denominadas de bacteróides, os quais são responsáveis pelo processo de fixação (TAIZ; ZIEGER, 2004).

Para que ocorra a fixação biológica de nitrogênio é necessário que a nitrogenase, enzima que catalisa as reações N_2 a NH_3 , se encontre em condições anaeróbicas. Para isso, proteínas associadas ao processo de fixação, como a leg-hemoglobina, presente nos nódulos de leguminosas, tem como função suprir o simbionte com o O_2 necessário à sua respiração e, ao mesmo tempo impedir a inativação da nitrogenase pelo gás. Características estruturais do nódulo, especialmente ligadas ao córtex, como endoderme, fibras, esclereídes, e inclusões de glicoproteínas nos espaços intercelulares, regulando o suprimento de O_2 , também desempenham papel importante na proteção da nitrogenase (TAIZ; ZIEGER, 2004).

A leg-hemoglobina é composta por um grupo heme (semelhante à hemoglobina presente no sangue de mamíferos) ligada a um grupo protéico correspondente a globina e é encontrada no citossol. Os nódulos de leguminosas em atividade fixadora apresentam coloração rosada ou avermelhada pela presença de altas concentrações de leg-hemoglobina (700 μM em nódulos de soja) (TAIZ; ZIEGER, 2004).

No processo de fixação, a tripla ligação que existe entre os átomos de nitrogênio é rompida e cada um se liga a três átomos de hidrogênio, utilizando energia despendida pelo ATP. A fixação biológica do nitrogênio se dá segundo a reação:



A amônia formada é imediatamente protonada (H^+), convertendo-se assim em amônio ou íon amoniacal (NH_4^+) que é utilizada na produção de amidas ou ureídes.

Nas plantas, o nitrogênio é componente responsável por várias reações e faz parte da estrutura da clorofila, enzimas e proteínas. Por ser elemento essencial seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e a translocação de fotoassimilados e a taxa de crescimento entre folhas e raízes, sendo o crescimento foliar afetado primeiramente. A

consequência é a diminuição do crescimento das plantas e da produtividade (TAIZ; ZIEGER, 2004).

3.2.2 Material e métodos

3.2.2.1 Preparação dos agentes bióticos e abiótico

Para a preparação do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, 200 g do fermento comercial Fleischmann[®] foram dissolvidos em 1 L de água destilada e autoclavados em 4 etapas, totalizando 1 h cada. Em seguida, a preparação foi centrifugada a 15.000g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante obtido foi considerado como extrato bruto autoclavado. O Agro-Mos[®] foi preparado na concentração de 2 mL/L e o Bion[®] na dosagem de 0,005g/100 mL.

3.2.2.2 Experimento com inseto

3.2.2.2.1 Efeito do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] e Bion[®] sobre *T. absoluta* (traça-do-tomateiro)

O experimento foi conduzido no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos e Plantas Inseticidas, coordenado pelo Prof. Dr. José Djair Vendramim, no Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP.

Sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) cv. Santa Clara foram semeadas em vasos contendo substrato Plantimax[®] e mantidas em condições de casa de vegetação. Após 30 dias, as plantas foram pulverizadas com extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®], Bion[®] ou água destilada (plantas controle). Cada vaso foi constituído por duas plantas sendo que cada tratamento foi constituído por seis vasos, os quais colocados em sala climatizada com temperatura de 25 °C e 14 h de fotofase.

Aos quatro dias do tratamento foliar com os indutores, um folíolo de cada tratamento foi destacado do tomateiro e colocado individualmente em placa de Petri (6 cm de diâmetro) e os pecíolos foram envolvidos por algodão umedecido. Em cada folíolo foram liberadas 4 lagartas recém-eclodidas. Cada tratamento foi constituído de 4 repetições, sendo cada repetição composta por 5 placas (20 lagartas), considerando 4 repetições em um total de 80 indivíduos liberados por tratamento. Após a liberação das lagartas, as unidades experimentais (placas) foram colocadas em

sala climatizada (temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e 14 h de fotofase). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e a mortalidade de lagartas foi observada a cada 2 dias. Também foram avaliados ao longo da condução do experimento parâmetros relacionados ao peso de pupas e ciclo biológico que incluiu duração e viabilidade larval e pupal.

3.2.2.3 Experimento com nematóide

3.2.2.3.1 Obtenção e inoculação de ovos e juvenis de *M. incognita* em plântulas de pepineiro

Sementes de pepineiro cv. Caipira Verde foram semeadas em bandejas contendo o substrato Plantmax. Após 7 dias da semeadura, as plântulas foram transferidas para copos de plástico com volume de 500 mL contendo uma mistura de solo, areia e matéria orgânica autoclavados.

Ovos e juvenis de *M. incognita* (Kofoid and White) foram obtidos de raízes de plantas de sorgo. Os ovos foram extraídos pelo método de Boneti e Ferraz (1981), sendo as raízes trituradas em liquidificador com hipoclorito de sódio 0,5 % por 30 segundos. A suspensão de ovos resultante foi utilizada para inoculação, a qual foi feita pela pipetagem de 1 mL da suspensão, contendo 1000 ovos, colocada em furos de cerca de 2 e 4 cm de profundidade ao lado da raiz de cada plântula de pepineiro. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado e mantido em casa de vegetação, sob condição ambiental.

3.2.2.3.2 Efeito do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* e Bion[®] na multiplicação de *M. incognita* em plântulas de pepineiro

Para o tratamento com os indutores, cotilédones das plântulas foram pulverizados com extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* e Bion[®] em três períodos distintos: 4 dias antes da inoculação das plântulas com os nematóides, no dia da inoculação e 4 dias após a inoculação. As plântulas controle foram pulverizadas com água destilada. Empregaram-se 12 repetições por tratamento e cada repetição foi representada por uma planta por copo.

Aos 45 dias da inoculação, as raízes das plantas foram lavadas, secas em papel de filtro para obter a massa da matéria fresca. Em seguida, os nematóides foram extraídos das raízes pelo método descrito por Bonetti e Ferraz (1981), sendo que o fator de multiplicação foi obtido pela razão da população final (Pf) pela população inicial (Pi).

3.2.2.4 Experimento com rizóbio

3.2.2.4.1 Origem, manutenção e multiplicação do inóculo

A estirpe SMS 463 de *Bradyrhizobium elkanii* foi cedida pelo Prof. Dr. Ladaslav Sodek do Instituto de Biologia da Unicamp. A manutenção (meio inclinado) e a multiplicação (meio líquido) da bactéria foram realizadas em meio de cultura de Norris e Date (1976), pH 6,8-7,0, formulado com os seguintes sais e respectivas concentrações: K_2HPO_4 ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,8 \text{ g L}^{-1}$), NaCl ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ($0,01 \text{ g L}^{-1}$), extrato de levedura ($0,8 \text{ g L}^{-1}$), manitol ($10,0 \text{ g L}^{-1}$) e 5 mL L^{-1} de azul de bromotimol a 0,5 % (p/v) em metanol. O meio inclinado (sólido) foi obtido adicionando-se 15 g L^{-1} de ágar ao meio líquido. Após autoclavados (a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min) e resfriados, os meios foram inoculados em câmara de fluxo laminar e incubados a $28\text{-}30 \text{ }^\circ\text{C}$ no escuro. Após o crescimento das bactérias foi adicionada vaselina líquida (Labsynth), previamente autoclavada, cobrindo todo o meio de cultura sólido, e os tubos de ensaio armazenados sob temperatura de $4\text{-}6 \text{ }^\circ\text{C}$. O meio líquido, após ter sido inoculado, foi incubado sob agitação, por cinco dias quando a suspensão de bactérias atingiu cerca de 10^9 ufc mL^{-1} . Para a inoculação, raízes de plantas de pepineiro foram imersas em meio líquido contendo a cultura bacteriana.

3.2.2.4.2 Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. IAC-17, cedidas pelo Prof Dr. Ladaslav Sodek foram semeadas em bandejas plásticas contendo vermiculita como substrato e mantidas em condições de casa de vegetação. A vermiculita foi lavada em água corrente durante 1 h antes de ser utilizada para o cultivo da soja. Nove dias após a semeadura, as plântulas foram selecionadas e transferidas para vasos de 3 L contendo vermiculita, os quais formaram mantidos em condições de casa-de-vegetação.

3.2.2.4.3 Soluções nutritivas

As plantas foram nutridas com solução preparada segundo Hoagland e Arnon (1950), sem nitrogênio mineral, colocando-se duas vezes por semana 200 ou 250 mL de solução por vaso. A solução foi preparada com os seguintes componentes: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (2 mM); KH_2PO_4 (1 mM); $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (2 mM), K_2SO_4 (2 mM); H_3BO_3 (0,046 mM); $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (9,1 mM); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

(0,765 mM); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,32 m M); H_2MoO_4 (0,56 m M). Outra solução com micronutrientes também foi preparada para ser adicionada em vasos com as plantas, sendo que a mesma foi constituída de uma solução de Fe-EDTA 1000 vezes concentrada, contendo $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ (33,2 g L^{-1}), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (25 g L^{-1}) e NaOH (3,65 g L^{-1}).

3.2.2.4.4 Preparação dos agentes bióticos e abiótico

Para a preparação do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, 200 g do fermento comercial Fleischmann[®] foram dissolvidos em 1 L de água destilada e autoclavados em 4 etapas, com durações de 1 h cada. Em seguida, a preparação foi centrifugada a 15.000g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante obtido foi considerado como extrato bruto autoclavado. O Agro-Mos[®] foi preparado na concentração de 2 mL/L, o Bion[®] na concentração de 0,005g/100 mL e água destilada foi aspergida nas plantas controle.

3.2.2.4.5 Efeito do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, Agro-mos[®] e Bion[®] sobre a nodulação de plantas de soja por *B. elkanii*

Dois experimentos foram conduzidos para se avaliar o efeito de Bion[®], Agro-Mos[®] e do extrato bruto autoclavado *S. cerevisiae* na nodulação e no desenvolvimento vegetativo de plantas de soja inoculadas com *B. elkanii*. Em um experimento, ao 9º dia após a semeadura, raízes de plântulas de soja foram inoculadas por *B. elkanii* e após 48 h da inoculação, as plântulas tiveram os cotilédones e o primeiro par de folhas verdadeiras pulverizados com os agentes. Em outro experimento, ao 9º dia após a semeadura, os cotilédones e o primeiro par de folhas verdadeiras de plântulas foram pulverizados com os agentes e após 48 h do tratamento, as raízes das plântulas foram inoculadas com *B. elkanii*.

3.2.2.4.6 Coleta do material vegetal e parâmetros avaliados

A coleta do material vegetal foi realizada aos 46 dias após a semeadura, sendo que os seguintes parâmetros foram avaliados:

Nódulo: Os nódulos foram destacados do sistema radicular da planta, sendo em seguida, contados e pesados em balança analítica. Para se determinar a matéria seca, os nódulos permaneceram em estufa ventilada, a 55 °C, até massa constante.

Planta: Foi determinada a altura da planta medindo-se a distância vertical entre o nó cotiledonar até a inserção do trifólio do último nó vegetativo visível na haste principal da planta. Procedeu-se também a determinação das matérias fresca e seca da parte aérea e matéria seca do sistema radicular. Para a obtenção da matéria seca, as plantas permaneceram em estufa ventilada, a 55 °C, até massa constante.

3.2.2.4.7 Dosagem do teor de nitrogênio da parte aérea, raiz e nódulos das plantas de soja

O teor de nitrogênio da parte aérea, raiz e nódulo foi determinado pelo método microkjeldahl (Yasuhara; Nokihara, 2001).

3.2.2.4.8 Delineamento experimental e análise estatística

Os experimentos realizados foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 6 repetições, onde cada vaso, contendo duas plantas compôs a unidade experimental. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando-se o programa estatístico ESTAT.

3.2.3 Resultados e discussão

3.2.3.1 Efeito do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] e Bion[®] na traça-do-tomateiro (*T. absoluta*)

A aplicação do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, Agro-Mos[®] e Bion[®] não alterou significativamente nenhuma das variáveis analisadas, como mortalidade de lagartas, peso das pupas, duração e viabilidade larval e pupal de *T. absoluta* (Tabelas 1 e 2). A ausência de efeito protetor de tomateiros pulverizados com os agentes contra *T. absoluta* pode ser explicado pela possível ativação de uma rota de sinalização independente da via do ácido salicílico, pois

pesquisas na literatura demonstram que a expressão de defesas induzidas por *S. cerevisiae* e pelo indutor químico Bion[®] é dependente da via do ácido salicílico.

Sob tal aspecto, Raacke et al. (2006) investigaram a atividade eliciadora de suspensão de células autoclavadas de *S. cerevisiae*, obtidas de fermento comercial, em plantas de *Arabidopsis* mutantes para salicilato, jasmonato e camalexina (fitoalexina) contra fitopatógenos como *Pseudomonas syringae* e *Botrytis cinerea*. No caso de *P. syringae*, nenhuma proteção foi detectada em mutantes para salicilato, enquanto que os mutantes em jasmonato e na biossíntese de camalexina foram protegidos pela atividade eliciadora da levedura, indicando que esta via não contribuía para a proteção induzida pela levedura. Por sua vez, a suspensão de células autoclavadas da levedura reduziu os sintomas de *B. cinerea* para todos os mutantes testados. Os autores concluíram que a proteção induzida pela levedura contra *P. syringae* era dependente da via do ácido salicílico, enquanto que a indução de resistência contra o fungo fitopatogênico não estava associada à rota de sinalização do ácido salicílico, jasmônico e da camalexina.

Neste contexto, Bion[®] é um composto sintético com função semelhante as do ácido salicílico. No entanto, as vias de sinalização de resistência induzida a patógenos ainda não estão completamente elucidadas e têm surgido indícios de possíveis conexões entre essas vias e as de resistência a insetos (VENDRAMIM; FRANÇA, 2005). Doares et al. (1995) verificaram que o ácido salicílico e o ácido acetilsalicílico inibiram a síntese de inibidores de proteinases em tomateiro, bloqueando a expressão de genes da via de biossíntese do ácido jasmônico. Há evidências indicando que o ácido salicílico está envolvido em múltiplas vias de defesa, as quais podem interagir com o ácido jasmônico e etileno (sinergisticamente ou antagonicamente) ou ativar independentemente uma resposta induzida (PIETERSE; VAN LOON, 1999).

A aplicação de Bion[®] em tomateiros não influenciou no crescimento de lagartas de diferentes ínstares. O indutor induziu resistência contra patógenos, mas diminuiu a expressão do gene *PINII*, que é ativado pela via de biossíntese do ácido jasmônico e cujo produto é um inibidor de proteinase, o que levou a um aumento na suscetibilidade da planta a insetos mastigadores de folhas (FIDANTSEF et al., 1999).

Em outro experimento, plantas de algodão induzidas ou não por Bion[®] foram infestadas por mosca-branca (*Bemisia tabaci*) e *Helicoverpa armigera*. O tratamento com o indutor não afetou a fase larval de *H. armigera* (90% de sobrevivência), como também não houve efeito sistêmico na preferência hospedeira da mosca-branca. Os autores concluíram que a indução de resistência,

pela via do ácido salicílico em plantas de algodão teve pouco ou nenhum efeito sobre os herbívoros testados (INBAR et al., 2001). Resultados contrários foram obtidos por Nombela et al. (2005), os quais constataram que a aplicação de Bion[®] em plantas de tomate (cv. Marmande) induziu resistência local afetando adultos (fêmeas e machos) da mosca branca *B. tabaci*. Segundo os autores, a influência do Bion[®] foi intensamente relacionada com a concentração do produto, pois as concentrações de 0,2 ou 0,4 g L⁻¹ de Bion[®], aplicadas cinco dias antes da infestação das plantas por *B. tabaci*, reduziram significativamente o número de pupas, larvas do primeiro ínstar e o número de ovos, embora a fecundidade da fêmea não tenha sido afetada. Quando o produto foi aplicado na concentração de 0,1 g L⁻¹ (equivalente a 0,05 g L⁻¹ de ingrediente ativo) não houve redução significativa nas variáveis testadas quando comparado com as plantas controle.

Em outro estudo, o fungo fitopatogênico *Colletotrichum lagenarium* foi testado como eliciador de resistência contra ácaros e insetos sugadores e mastigadores (AJLAN; POTTER, 1991). Entretanto, o fungo não afetou o crescimento de *Tetranychua urticae*, a duração do desenvolvimento larval e peso de pupa de *Spodoptera frugiperda*, bem como a reprodução de *Aphis gossypii*.

Tabela 1 - Efeito do extrato bruto autoclavado de *Saccharomyces cerevisiae*, Agro-Mos[®] e Bion[®] sobre a mortalidade, peso de pupas e duração média do ciclo (L1 a adulto) de *Tuta absoluta* criada em folhas de tomateiro

Tratamentos	Mortalidade (%)	Peso da pupa (mg)*	Duração Média do (Ciclo L1 a Adulto)*
Água	0,56 ± 0,135 A	2,26 ± 0,091 A	17,86 ± 0,250 A
Extrato bruto de <i>S. cerevisiae</i>	0,31 ± 0,123 A	2,33 ± 0,085 A	18,19 ± 0,281 A
Agro-Mos [®]	0,37 ± 0,163 A	2,27 ± 0,082 A	18,39 ± 0,165 A
Bion [®]	0,93 ± 0,228 A	2,29 ± 0,105 A	18,27 ± 0,201 A
CV (%)	35,72	17,0	5,74

Nota: Médias (± EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 %, n=20

*Dados originais, porém para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

Tabela 2 - Efeito do extrato bruto autoclavado de *Saccharomyces cerevisiae*, Agro-Mos[®] e Bion[®] sobre a duração e viabilidade das fases larval e pupal de *Tuta absoluta* criada em folhas de tomateiro

Tratamentos	Fase larval		Fase pupal	
	Duração (Dias)*	Viabilidade (%)	Duração (Dias)*	Viabilidade (%)
Água	11,10 ± 0,183 A	85	6,87 ± 0,263 A	78
Extrato de <i>S. cerevisiae</i>	10,74 ± 0,174 A	93	7,41 ± 0,272 A	65
Agro-Mos [®]	11,38 ± 0,201 A	91	7,28 ± 0,148 A	51
Bion [®]	10,71 ± 0,241 A	79	7,64 ± 0,221 A	82
CV (%)	8,20	14,91	14,56	29,10

Nota: Médias (± EP) seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % n=20

*Dados originais, porém para análise estatística, os dados foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$

Embora os agentes testados não tenham afetado o desenvolvimento da traça-do-tomateiro nas condições experimentais utilizadas neste trabalho, o controle de insetos através da indução de resistência pode ser uma valiosa ferramenta no manejo integrado de pragas. Haja visto que o tratamento com agentes indutores pode efetivamente aumentar as defesas da planta, antes do ataque de pragas, contribuindo assim na redução de doses e aplicações de inseticidas.

3.2.3.2 Efeito do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* e do Bion[®] na multiplicação de *M. incognita* em raízes de pepineiro

Aos 45 dias da inoculação de *M. incognita* em plântulas de pepineiro, foi realizada a avaliação da população final (número de ovos e juvenis de *M. incognita*), fator de reprodução (população final/população inicial) e massa da matéria fresca da raiz. O extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* e o Bion[®], aplicados em três períodos nos cotilédones de plântulas de pepineiro, não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 3). Alguns fatores podem explicar a ausência de proteção contra *M. incognita*. Por exemplo, mecanismos de resistência ativados pelo extrato da levedura ou Bion[®] poderiam ter atuado após a penetração dos juvenis em raízes. O conhecimento da melhor época de aplicação e dosagem do indutor é necessário, por exemplo, Owen, Green e Deverall (2002) verificaram que a

aplicação foliar de Bion[®] (50 µg de i. a./mL) em videiras afetou o desenvolvimento de espécies de *Meloidogyne* spp. nas raízes. O efeito foi verificado 3 semanas após a inoculação, período da interação compatível entre planta e nematóide, quando células gigantes são induzidas e mantidas no hospedeiro para nutrição e crescimento dos nematóides.

Tabela 3 - Efeito do extrato bruto autoclavado de *Saccharomyces cerevisiae* e Bion[®] sobre a multiplicação de *Meloidogyne incognita* em pepineiro

Tratamento	Fator de reprodução (PF/PI)	População final (n° de ovos e juvenis)	Massa fresca do sistema radicular (g)
Água	54,44 ± 21,53 A	54438,75 ± 21529,73 A	15,79 ± 4,34 A
Extrato bruto de <i>S. cerevisiae</i>	42,98 ± 13,64 A	42978,06 ± 13644,08 A	17,89 ± 6,37 A
Bion [®]	39,33 ± 18,05 A	39331,11 ± 18045,20 A	15,20 ± 3,49 A

Notas: Médias seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Fator de reprodução= população final (PF)/população inicial (PI) de nematóides.

Resultados similares foram obtidos com a aplicação foliar de Bion[®] em mudas de cafeeiro cv. Catuaí-144 contra *M. exigua*. Salgado, Resende e Campos (2007) relataram que a aplicação do indutor químico em mudas de cafeeiro não afetou na população final (número de ovos e juvenis), número de galhas, fator de reprodução e massa da matéria fresca da raiz. As mudas foram tratadas com Bion[®], na dosagem de 0,2 g i.a. /L, 7 dias antes da inoculação de 7000 ovos/planta de *M. exigua* e aos 2 e 7 dias após a inoculação. Os autores argumentaram que um dos fatores que pode ter influenciado nesse resultado foi o inóculo constituído de ovos, os quais eclodiram ao longo do tempo de condução do experimento. Talvez o inóculo constituído por juvenis fosse o mais indicado, já que a fase de penetração e início da formação do sítio de alimentação do nematóide nas raízes poderia coincidir com a fase de máximo efeito do indutor.

Neste contexto, Owen, Green e Deverall (2002) observaram que a pulverização de Bion[®] (50 µg de i. a /mL) em folhas de videira não alterou o número de juvenis de *Meloidogyne* spp em raízes da planta quando comparado com as plantas não tratadas, 3 dias após a inoculação dos nematóides. Neste experimento, as raízes de plantas de videira foram inoculadas com 1000 ou

5000 juvenis por planta. Os autores argumentaram que mecanismos de resistência atuaram em estágios de infecção após a penetração dos juvenis nas raízes.

Na literatura, trabalhos com indução de resistência em plantas contra fitonematóides apresentaram resultados contraditórios. Wyss, Grundler e Munch (1992) constataram que a aplicação foliar de Bion[®] em folhas de videira, reduziu significativamente em 80 % a deposição de ovos pelo nematóide das galhas em raízes, 10 semanas após a inoculação das plantas com os nematóides. O indutor também induziu o aumento da atividade de β -1,3 quitinase em folhas aos 7 e 28 dias após o tratamento e em raízes aos 5 dias após o tratamento. Sonnemann, Finkhaeuser e Wolters (2002) verificaram que a aplicação de Bion[®] (60 g ha⁻¹) em plantas de cevada reduziu o crescimento das raízes e causou aumento significativo na infecção pelo nematóide parasita *Pratylenchus* sp. Os autores comentam que o aumento da infecção em raízes de cevada pelos nematóides foi provocado pelas alterações no exudato, favorecendo a atração dos parasitas e alterações na morfologia da raiz, facilitando a invasão de nematóides.

Outro fator que pode interferir com a patogenicidade dos nematóides das galhas é o estágio de desenvolvimento da planta, visto que, os estágios iniciais de desenvolvimento são os mais vulneráveis ao ataque (EAPEN, 1992).

3.2.3.3 Efeito do Bion[®], Agro-Mos[®] e do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* na interação simbiótica de soja com *B. elkanii*

A Figura 1 apresenta os resultados de dois experimentos, sendo que o experimento no qual, raízes de plantas de soja foram inoculadas com *B. elkanii* 48 h antes do tratamento foliar com Bion[®], Agro-Mos[®] e extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, estão representados pelos gráficos **a**, **b** e **c**. Neste experimento, o número e as massas de matéria seca e fresca dos nódulos de planta tratadas com os agentes não apresentaram alterações significativas com relação as plantas tratadas com água (controle). Em outro experimento, observa-se nos gráficos **d**, **e** e **f** da mesma figura, que a inoculação das raízes por *B. elkanii* após 48 h do tratamento com os agentes também não afetaram o número e as massas da matéria seca e fresca dos nódulos das raízes de soja. Hoffmann e Cardoso (2001) observaram que a aplicação de Bion[®] (25 mg L⁻¹) em plantas de soja inoculadas com *B. elkanii*, aos 18 dias após o plantio, não reduziu o número ou a massa da matéria seca dos nódulos ou crescimento das plantas. Entretanto, os mesmos autores relataram

a ocorrência de redução da colonização por *B. elkanii* em raiz de soja, quando o indutor foi aplicado via raiz, aos 4 ou 18 dias após o plantio, reduzindo o número e a massa da matéria seca dos nódulos. A indução de peroxidases em raiz de soja foi relatada pelos autores após a aplicação de Bion[®], o qual interferiu negativamente sobre a colonização das raízes pelo rizóbio.

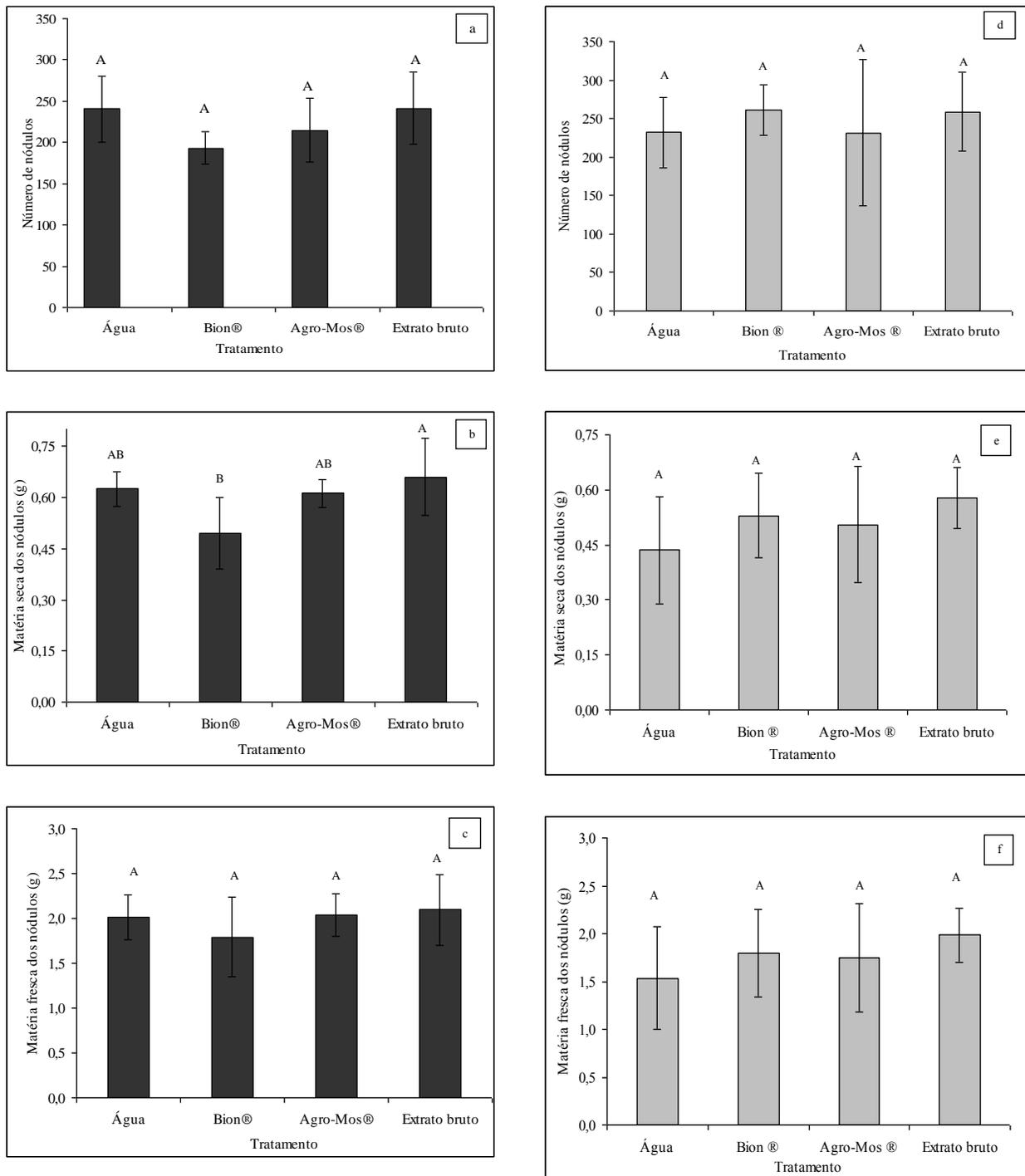


Figura 1- Efeito do Bion®, Agro-Mos® e extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* sobre o número de nódulos, massa da matéria fresca e seca de plantas de soja inoculadas 48 h antes do tratamento com os agentes (a, b e c) e 48 h após o tratamento com os agentes (d, e e f) por *Bradyrhizobium elkanii*. Barras representam a média \pm o desvio padrão. Média seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

A pulverização dos agentes em plantas de soja após 48 h da inoculação das raízes com *B. elkanii* não afetaram o desenvolvimento das plantas como mostra a Figura 2. Observa-se que as massas da matéria fresca e seca da parte aérea e matéria seca da raiz das plantas não diferiram significativamente entre os tratamentos (gráficos **a**, **b** e **c**). Os resultados representados nos gráficos **d**, **e**, e **f** (Figura 2) demonstraram que o tratamento da plantas com os agentes 48 h antes da inoculação das raízes com *B. elkanii*, também não afetou as massas da matéria fresca e seca da parte aérea, a matéria seca da raiz das plantas quando comparados com plantas controle. A Figura 3 demonstra que os agentes pulverizados após 48 h da inoculação das raízes com *B. elkanii* ou 48 h antes da inoculação também não influenciaram na altura das plantas de soja com relação aquelas pulverizadas com água (controle).

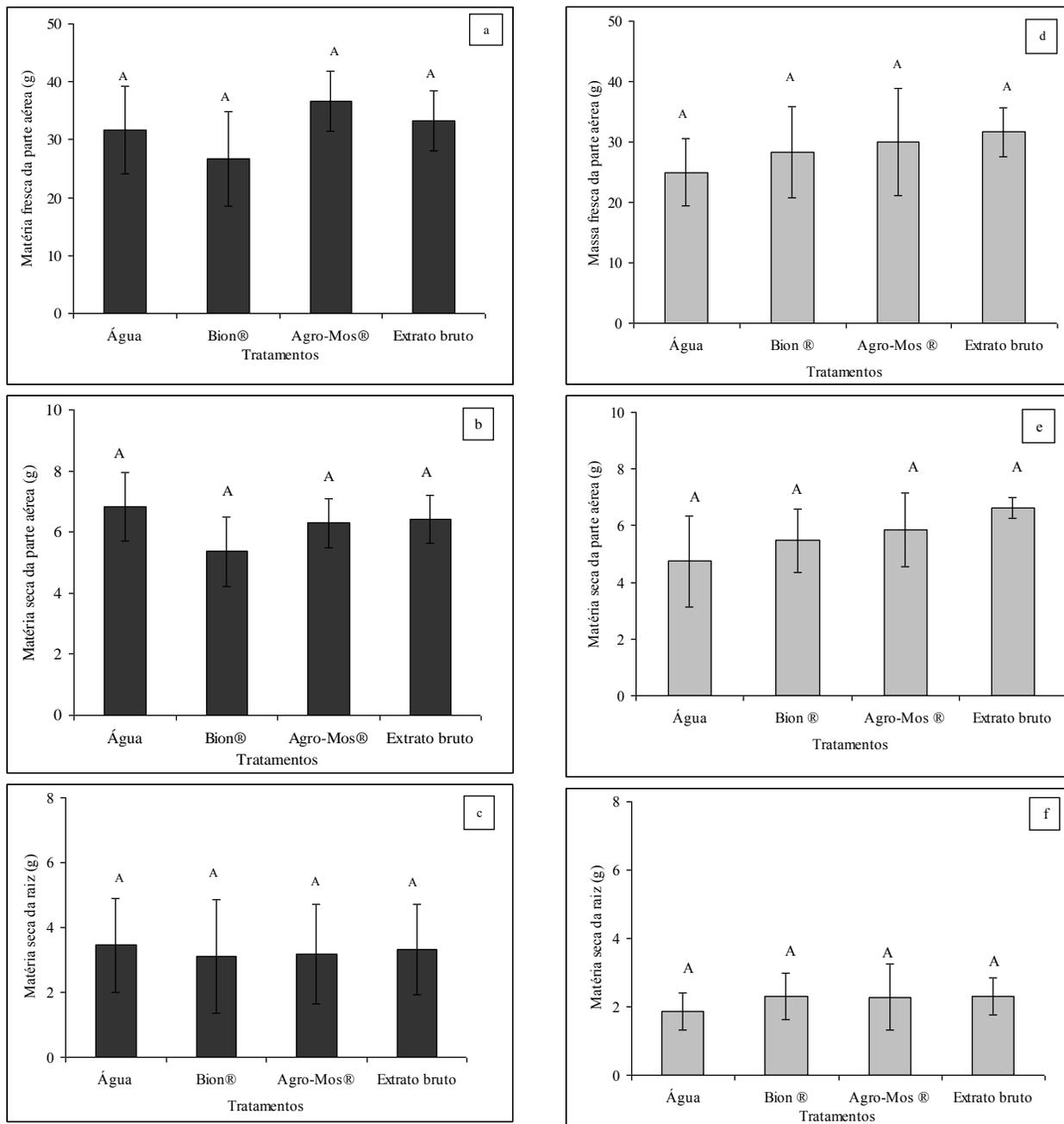


Figura 2 - Efeito do Bion[®], Agro-Mos[®] e extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* sobre a matéria fresca e seca da parte aérea da planta, matéria seca da raiz de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* 48 h antes do tratamento com os agentes (**a**, **b** e **c**) e 48 h após o tratamento com os agentes (**d**, **e** e **f**). Barras representam a média \pm o desvio padrão. Média seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

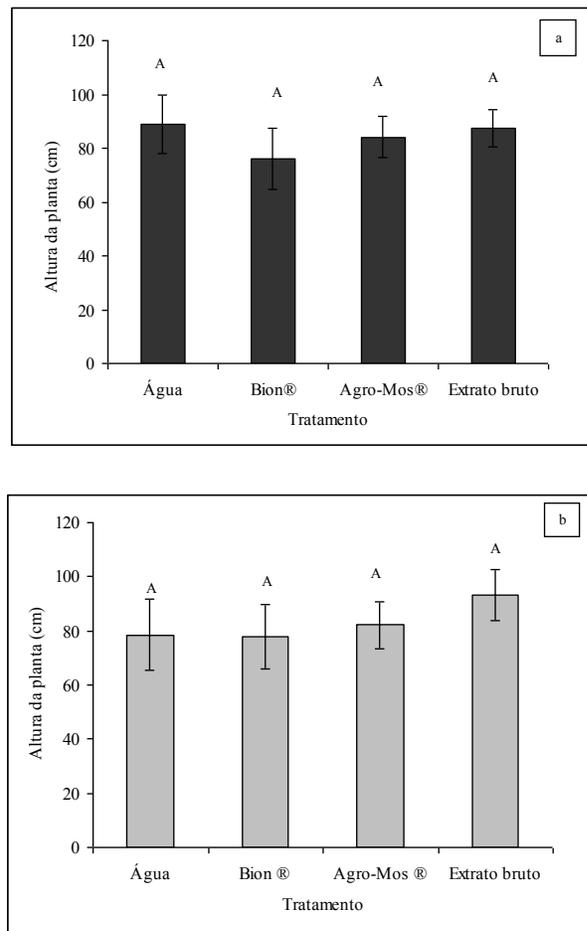


Figura 3 - Efeito do Bion[®], Agro-Mos[®] e extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* sobre a altura de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* 48 h antes do tratamento com os agentes (a) e 48 h após o tratamento com os agentes (b). Barras representam a média \pm o desvio padrão. Média seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

A quantidade de nitrogênio da parte aérea, raiz e nódulos representada nos gráficos a, b e c (Figura 4) de plantas de soja inoculadas por *B. elkanii*, 48 h antes do tratamento com os agentes, não foi alterada com relação às plantas controle. Por outro lado, no experimento em que as plantas foram tratadas com o extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* 48 h antes da inoculação das raízes com *B. elkanii*, as mesmas apresentaram um aumento na quantidade de nitrogênio da parte aérea da planta (Figura 4, gráfico d), o qual pode ser reflexo de maior atividade de fixação de nitrogênio nos nódulos. O Bion[®] e o Agro-Mos[®] não alteraram a quantidade de nitrogênio na raiz ou nódulo das plantas (Figura 4 e gráficos e e f). Observa-se ainda pela Figura 5 (gráfico a) que plantas inoculadas por *B. elkanii* antes do tratamento com os agentes não tiveram alterações

significativas na quantidade de nitrogênio total. Entretanto, na mesma figura (gráfico **b**) nota-se maior quantidade de nitrogênio total em plantas de soja tratadas com o extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* 48 h antes da inoculação com *B. elkanii* quando comparadas com as plantas controle. O Bion[®] e o Agro-Mos[®] não influenciaram o teor de nitrogênio total das plantas (gráfico **b**).

García et al. (2004) investigaram os efeitos de diferentes isolados de PGPRs na fixação biológica, nodulação de plantas de soja inoculadas com *Sinorhizobium fredii*, utilizando diferentes formas de inoculação. A inoculação das plantas com *S. fredii* antes da inoculação com PGPRs aumentou a matéria seca da parte aérea, matéria fresca da raiz e o número de nódulos com relação às plantas não inoculadas. A alteração do teor de nitrogênio nas plantas foi dependente do isolado de PGPRs utilizado. Em plantas inoculados com *S. fredii* e após 5 dias inoculadas com *Pseudomonas fluorescens* foi verificado um aumento significativo do teor de nitrogênio. Os autores observaram também que plantas de soja inoculadas previamente com PGPRs e após 5 dias inoculadas com *S. fredii* apresentaram aumento significativo da matéria seca da parte aérea e matéria fresca da raiz, no número de nódulos como também no teor de nitrogênio das plantas. Segundo os autores, as PGPRs não apenas promoveram alterações fisiológicas como induziram o aumento da fixação biológica de nitrogênio em plantas de soja.

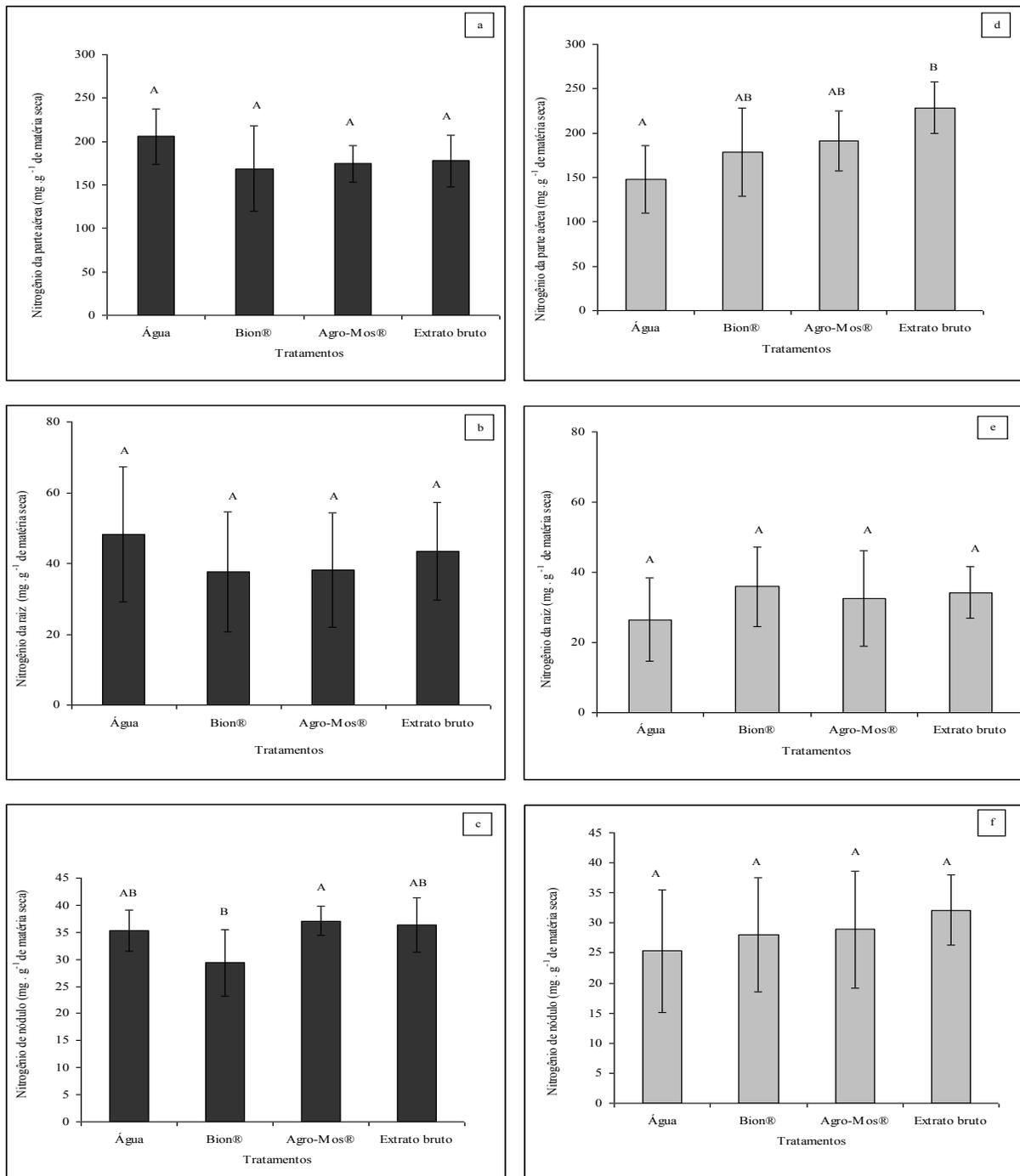


Figura 4 - Efeito do Bion[®], Agro-Mos[®] e extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* sobre o teor de nitrogênio da parte aérea, raiz e nódulos de plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* 48 h antes do tratamento com os agentes (a, b e c) e 48 h após o tratamento com os agentes (d, e e f). Barras representam a média ± o desvio padrão. Média seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

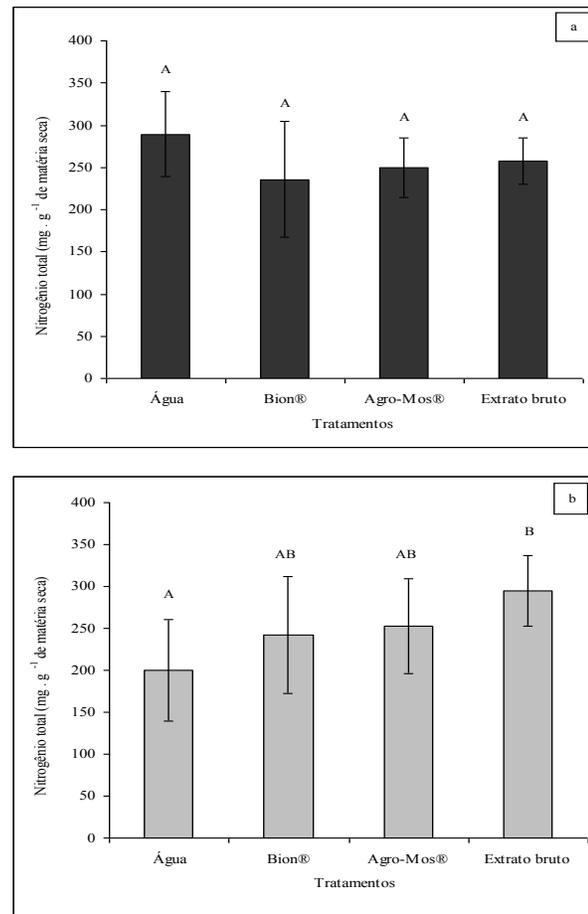


Figura 5 - Efeito do Bion[®], Agro-Mos[®] e extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* sobre o teor de nitrogênio total em plantas de soja inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* 48 h antes do tratamento com os agentes (a) e 48 h após o tratamento com os agentes (b). Barras representam a média \pm o desvio padrão. Média seguida pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

O fato dos agentes aplicados nas plantas não demonstrarem efeito negativo na colonização por *B. elkanii* em raízes de soja, antes ou após a inoculação das mesmas, talvez possa ser explicado pela ausência de translocação de sinal da parte aérea da planta para a raiz, pois sabe-se que o acizenzolar-S-metil é translocado na planta sistemicamente. Estudos moleculares em plantas de fumo e *Arabidopsis* mostraram que o composto atua na via metabólica do ácido salicílico, molécula sinal na ativação de genes relacionados à RSA (BENHAMOU; BÉLANGER, 1998). Outra hipótese para explicar os resultados obtidos neste trabalho é a possível supressão das respostas de defesas da planta pelo rizóbio, mesmo que inicialmente induzidas pelos agentes.

Estudos revelaram que rizóbios e micorrizas arbusculares possuem mecanismos provavelmente similares a aqueles encontrados nos patógenos, os quais precisam vencer mecanismos de defesa para estabelecer a interação. O papel de lipopolissacarídeos (LPS) como eliciadores na indução de resposta de defesa é invertido na simbiose entre a bactéria fixadora de nitrogênio *Sinorhizobium meliloti* e *Medicago truncatula*. Ao invés de eliciar respostas de defesa, o LPS suprime essas reações como a produção de espécies ativas de oxigênio eliciadas pela invertase de *S. cerevisiae*, promovendo o estabelecimento da simbiose (TELLSTRÖM et al., 2007). Rizóbios mutantes com alterações no LPS foram deficientes nas interações simbióticas com os hospedeiros (CAMPBELL et al., 2003).

O papel dos polissacarídeos extracelulares de rizóbios tem sido discutido como compostos com atividade supressora na defesa em plantas hospedeiras, mecanismo essencial para o sucesso da simbiose. Por outro lado, durante os estádios iniciais da interação simbiótica, reações de defesa na planta são ativadas pela invasão do simbionte. Esta reação parece estar envolvida com mecanismos pelos quais as plantas controlam o número de infecções, nódulos inativos e o controle da incompatibilidade nas interações específicas (MITHÖFER et al., 1996).

O ácido salicílico (AS) é um dos sinalizadores para a expressão da resistência contra doenças em plantas, sendo que essa molécula está intimamente ligada à reação de hipersensibilidade localizada e a RSA. Além disso, interfere diretamente em vários aspectos do processo de infecção de bactérias patogênicas. O AS também desempenha um papel fundamental no estabelecimento da simbiose de leguminosas e rizóbio. Além de mediar respostas de defesa das plantas, o composto controla a formação dos nódulos em raízes de leguminosas. Um aumento do nível de ácido salicílico em raízes de alfafa foi observado após a inoculação com rizóbio impedindo a produção de fator Nod, sendo que a aplicação exógena de AS inibiu a formação de nódulos em raízes de leguminosas (MARTÍNEZ-ABARCA et al., 1998).

Espécies ativas de oxigênio já foram identificadas na interação *Rhizobium*-leguminosa. A intensa explosão oxidativa pode ser interpretada como uma reação de defesa da planta para controlar e limitar a entrada da bactéria, onde por exemplo, o acúmulo de peróxido de hidrogênio foi observado em plantas inoculadas com rizóbio (VASSE et al., 1993). Para combater o estresse oxidativo durante a interação simbiótica, a planta hospedeira e o rizóbio possuem um arsenal de compostos antioxidantes à disposição. As bactérias, por exemplo, acionam enzimas detoxificantes para se defender das EAOs, como catalase, superóxido dismutase e peroxidases.

Quando a planta leguminosa hospedeira é infectada pelo rizóbio, a planta produz espécies ativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio no local da infecção. Esta resposta assemelha-se a uma reação de hipersensibilidade da planta durante interações incompatíveis planta-patógeno. Por sua vez, em interações simbióticas compatíveis, o rizóbio é capaz de controlar reações de defesa do seu hospedeiro através da molécula sinal conhecida como fator Nod (oligossacarídeos de lipoquitina), a qual induz várias respostas na planta como encurvamento dos pêlos radiculares, indução da formação de nódulos primórdios, após a ativação da divisão celular cortical. Além disso, fator Nod tem papel importante no controle de reações de defesa da planta suprimindo o acúmulo de ácido salicílico e a produção de EAOs em leguminosas (MARTÍNEZ-ABARCA et al., 1998).

Concomitante a produção de EAOs, o reconhecimento de um patógeno avirulento por uma planta resistente induz no rápido acúmulo de óxido nítrico. O óxido nítrico ativa a expressão de vários genes de defesa, aumenta o nível de EAOs no interior da célula e modula a síntese de compostos relacionados a defesa, como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Assim, a produção de óxido nítrico foi detectado em nódulos fixadores de nitrogênio e a modulação de níveis de óxido nítrico provocou modificações do número de nódulos em raiz. Diferentes respostas apontam um possível papel de óxido nítrico como modulador transcricional em interações patogênicas e simbióticas (SOTO et al., 2009).

Durante as interações simbióticas entre soja e a bactéria fixadora de nitrogênio *B. elkanii*, ocorre à produção de glucanas (ligações β -1,3-1,6) pela bactéria, sendo que vários trabalhos demonstraram que esses polissacarídeos possuem atividade supressora na respostas de defesa induzidas por eliciadores. Em soja foi verificado que a atividade eliciadora de glucanas derivadas de *Phytophthora sojae* foi inibida por polissacarídeos (glucanas ligações β - 1,3 e 1,6) de *B. elkanii*, resultado que pode indicar um mecanismo favorável para o sucesso da interação entre planta e simbionte (MITHÖFER et al., 1996). Glicopeptídeos com atividade eliciadora e oligossacarídeos obtidos de *B. elkanii* com atividade supressora mostraram competir na ligação por receptores de membrana em células de tomateiro (BASSE et al., 1993).

4 Considerações finais

Os agentes testados não se mostraram eficientes no controle do inseto (*T. absoluta*) e do nematóide (*M. incognita*), porém não afetaram a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio por *B. elkanii* em raízes de soja, como também não interferiram no desenvolvimento vegetativo das plantas. Por outro lado, as plantas de soja tratadas previamente com o extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae* apresentaram um aumento do teor de nitrogênio.

Referências

- AJLAN, A.M.; POTTER, D.A. Does immunization of cucumber against anthracnose by *Colletotrichum lagenarium* affect host suitability for arthropods? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 58, p. 83-91, 1991.
- BAKKER, E.; DEES, R.; BAKKER, J.; GOVERSE, A. Mechanisms involved in plant resistance to nematodes. In: TUZUN, S.; BENT, E. **Multigenic and induced systemic resistance in plants**. New York: Springer Science, 2006. chap. 14, p. 314-334.
- BASSE, C.W.; FATH, A.; BOLLER, T. High affinity binding of a glycopeptides elicitor to tomato cell and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, p. 14724-14731, 1993.
- BENHAMOU, N.; BÉLANGER, R.R. Induction of systemic resistance to *Pythium* damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, p. 13-21, 1998.
- BIRD, D.M.; KALOSHIAN, I. Are root special? Nematodes have theirs say. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 62, p. 115-123, 2003.
- BONALDO, S.M.; PASCHOLATI, S.F. ROMEIRO, R. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. 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. 1, p. 11-28.
- BONETI, J.I.S.; FERRAZ, S. Modificações do método de Hussey & Barker para extração de ovos de *Meloidogyne exigua* em raízes de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, p. 533, 1981.
- BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J.D.; Bioatividade de extratos aquosos de *Melia azedarach* L. sobre o desenvolvimento de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro. **Neotropical Entomology**, Itabuna, v. 30, p. 455-459, 2001.
- CAMARGO FILHO, W.P. Perspectivas dos mercados de tomate para indústria e mesa. **Informações Econômicas**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 51-54, 2001.

CAMPBELL, G.R.; SHARYPOVA, L.A.; SCHEIDLE, H.; JONES, K.M.; NIEHAUS, K.; BECKER, A.; WALKER, G.C. Striking complexity of lipopolysaccharide defects in a collection of *Sinorhizobium meliloti* mutants. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 185, p. 3853–3862, 2003.

CANÇADO JÚNIOR, F.L.; CAMARGO FILHO, W.P.; ESTANISLAU, M.L.L.; PAIVA, B.M.; MAZZEI, A.R.; ALVES, H.S. Aspectos econômicos da produção e comercialização do tomate de mesa. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, p. 7-18, 2003.

CASTELO BRANCO, M.; FRANÇA, F.H.; MEDEIROS, M.A.; LEAL, J.G.T. Uso de inseticidas para o controle da traça-do-tomateiro e traça-das-crucíferas: um estudo de caso. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 60-63, 2001.

CORDEIRO, L. Fixação do nitrogênio. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 3, p. 76-93.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R.S.B.; SILVA, L.X. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridão pós-colheita. **Summa Phytopatologica**, Botucatu, v. 30, p. 314-319, 2004.

DOARES, S.H.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; CONCONI, A.; RYAN, C.A. Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemic and jasmonic acid. **Plant Physiology**, New York, v. 108, p. 1741-1746, 1995.

DOBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contribution. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 771-774, 1997.

EAPEN, S.J. Influence of plant age on root-knot nematode development in Cardamom. **Nematologia Mediterrânea**, Bari, v. 20, p. 193-195, 1992.

FIDANTSEF, A.L.; STOUT, M.J.; THALER, J.S.; DUFFEY, S.S.; BOSTOCK, R.M. Signal interaction in pathogen and insect attack: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 54, p. 97-114, 1999.

GARCÍA, J.A.L.; PROBANZA, A.; RAMOS, B.; BARRIUSO, J.; MAÑERO, F.J.G. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. Osumi. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 265, p. 143-153, 2004.

GARD, N.; GEETANJALI. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. **Agronomy for sustainable development**, Versailles, v. 27, p. 59-68, 2007.

GHEYSEN, G.; FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopatology**, Lawrence, v. 40, p.191-219, 2002.

HEIL, M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens- a promising field for ecological research. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 4, p. 65-79, 2001.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950. 347 p.

HOFFMANN, L.V.; CARDOSO, E.J.B.N. Inibição da colonização por *Bradyrhizobium elkanii* mas não por *Glomus intraradices* em soja pelo ativador de defesa vegetal BTH. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 58, p. 795-799, 2001.

HUSSEY, R.S.; JANSSEN, G.J.W. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. In: STARR, J.L.; COOK, R.; BRIDGE, J. **Plant resistance to parasitic nematodes**. Egham: CABI Bioscience, 2002. chap. 3, p. 43-69.

INBAR, M.; DOOSTDAR, H. GERLING, D.; MAYER, R.; Induction of systemic acquired resistance in cotton by BTH has a negligible effect on phytophagous insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 99, p. 65-70, 2001.

KUC, J. Concepts and direction of induced systemic resistance in plant and its application. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrech, v. 107, p. 7-12, 2001.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.P.; CARDOSO FILHO, J.A.; PORTZ, R.L.; OSSWALD, W. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 14, p. 251-302, 2006.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum*, Jordan, 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.

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

LOOS, R.A.; SILVA, D.J.H.; FONTES, P.C.R.; PICANÇO, M.C.; GONTIJO, L.M.; SILVA, E.M.; SEMEÃO, A.A. Identificação e quantificação dos componentes de perdas de produção do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 238-242, 2004.

MARTÍNEZ-ABARCA, F.; HERRERA-CERVERA, J.A.; BUENO, P., SANJUAN, J.; BISSELING, T.; OLIVARES, J. Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfafa symbiosis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 11, p.153-155, 1998.

MITHÖFER, A.; BHAGWAT, A.A.; FEGER, M.; EBEL, J. Suppression of fungal β -glucan-induced plant defence in soybean (*Glycine max* L.) by cyclic 1,3-1,6- β -glucans from the symbiont *Bradyrhizobium japonicum*. **Planta**, Berlin, v. 199, p. 270-275, 1996.

NOMBELA, G.; PASCUAL, S.; AVILES, M.; GUILLARG, E.; MUNIZ, M. Benzothiadiazole induces local resistance to *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato plants. **Journal Economic Entomology**, College Park, v. 98, p. 2266-2271, 2005.

NORRIS, D.O.; DATE, R.A. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H.; BRYAN, W.W. (Ed.). **Tropical pasture research: principles and methods**. Brisbane: CAB, 1976. p. 134-173.

OLDROYD, G.E. Dissecting symbiosis: development in nod factor signal transduction. **Annals of Botany**, Oxford, v. 87, p. 709-718, 2001.

OWEN, K.J.; GREEN, C.D.; DEVERALL, B.J.A benzothiadiazole applied to foliage reduces development and egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology Society**, Collingwood, v. 31, p. 47-53, 2002.

PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 125-138.

PIETERSE, C.M.J.; VAN LOON, L.C. Salicylic acid-independent plant defense pathways. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 4, p. 52-58, 1999.

PIETERSE, C.M.J.; DICKE, M. Plant interactions with microbes and insects from molecular mechanisms to ecology. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, p. 564-569, 2007.

POELMAN, E.H.; VAN LOON, J.J.A.; DICKE, M. Consequences of variation in plant defenses for biodiversity at higher trophic levels. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 13, p. 534-541, 2008.

RAACKE, I.C.; VON RAD, U.; MUELLER, M.J.; BERGER, S. Yeast increases resistance in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by salicylic acid-dependent as well as – independent mechanisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, p. 1138-1146, 2006.

RADMAN, R.; SAEZ, T.; BUCKE, C.; KESHAVARZ, T. Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 37, p. 91-102, 2003.

RAMANUJAM, M.P.; JALEEL, V.A.; KUMARAVELU, G. Effect of salicylic acid on nodulation, nitrogenous compounds and related enzymes of *Vigna mungo*. **Biologia Plantarum**, Dordrecht, v. 41, p. 307-311, 1998.

RESENDE, M.L.V.; BARRETI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.; SILVA, D.; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.O.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, M.A. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 15, p. 173-242, 2007.

SALGADO, S.M.L.; RESENDE, M.L.V.; CAMPOS, V.P. Efeito de indutores de resistência sobre *Meloidogyne exigua* do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 1007-1013, 2007.

SALGADO, S.M.L.; SILVA, L.H.C.P. Potencial da indução de resistência no controle de fitonematóides. 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. 7, p. 155-165.

SIKORA, R.A.; FERNÁNDEZ, E. Nematode parasites of vegetables. In: LUC, M.; SIKORA, R.A.; BRIDGE, J. **Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture**. Egham: CABI Bioscience, 2005. chap. 9, p. 319-392.

SILVA, A.C.; CARVALHO, G.A. Manejo integrado de pragas. In: ALVARENGA, M.A.R. (Ed.). **Tomate: produção em campo em casa-de-vegetação e em hidroponia**. Lavras: Editora UFLA, 2004. cap. 10.

SONNEMANN, I.; FINKHAUSER, K.; WOLTERS, V. Does induced resistance in plants affect the belowground community? **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, p. 179-185, 2002.

SOTO, M.J.; SANJUÁN, J.; OLIVARES, J. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. **Microbiology**, Reading, v. 152, p. 3167-3174, 2006.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. de E.R. Santarém et al. 3. ed. Porto Alegre: Artemed, 2004. 719 p.

TELLSTRÖM, V.; USADEL, B.; THIMM, O.; STITT, M.; KUSTER, H.; NIEHAUS, K. The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, p. 825-837, 2007.

THOMASON, I.J. Challenges facing nematology: environmental risks with nematicides and the need for new approaches. In: VEECH, J.A.; DICKSON, D.W. **Vistas on nematology**. Hyattsville: Society of Nematology Inc, 1987. p. 469-476.

VAN SPRONSEN, P.C.; TAK, T.; ROOD, A.M.M.; VAN BRUSSEL, A.; KIJNE, J.W.; BOOT, K.J.M. Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v. 16, p. 83-91, 2003.

VASSE, J.; DEBILLY, F.; TRUCHET, G. Abortion of infection during the *Rhizobium-meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. **Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 555-566, 1993.

VENDRAMIM, J.D.; FRANÇA, S.C. Indução de resistência a insetos. 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. 1, p. 11-28.

VIERHEILIG, H.; ALT, M.; MOHR, U.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and -1,3 glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 143, p. 337-343, 1994.

VILLAS BÔAS, G.L.; CASTELO BRANCO, M.; MEDEIROS, M.A. **Novas formas de manejo integrado da traça-do-tomateiro**. Brasília: EMBRAPA, 2005. 5 p. (Comunicado Técnico, 29).

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

WYSS, U.; GRUNDLER, F.; MUNCH, A. The parasitic behaviour of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Nematologica**, Leiden, v. 38, p. 98-111, 1992.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. High throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic kjeldahl method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4581-4583, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)