

Potencial de Bactérias para Biocontrole do Mofo Branco e Produção de Compostos Relacionados ao Sistema de Defesa em Plantas de Soja

Potential of Bacteria for Biocontrol of White Mold and Production of Compounds Related to the Defense System in Soybean Plants

Denise Pauletto Spanhol^{*a}; José Rogerio de Oliveira^b; Bianca Obes Corrêa^c; Ismail Teodoro de Souza Júnior^d; Marcelo Vedovatto^e; Hélivio Gledson Maciel Ferraz^b; Marlos Ferreira Dornas^f; Rosemary Matias^e

^aUniversidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Defesa Sanitária Vegetal. MG, Brasil.

^bUniversidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Fitopatologia. MG, Brasil.

^cUniversidade Anhanguera Uniderp Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional. MS, Brasil.

^dUniversidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, RS, Brasil.

^eUniversidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Curso de Graduação em Zootecnia. MS, Brasil.

^fUniversidade Anhanguera Uniderp, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção e Gestão Agroindustrial. MS, Brasil.

*E-mail: despanhol@hotmail.com

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de bactérias, na promoção de crescimento, produção de compostos de defesa e no biocontrole do mofo branco em folhas destacadas de duas cultivares de soja. Os ensaios foram realizados com as bactérias antagonistas FIT09 (*Bacillus cereus*) e FIT62 (*B. thuringensis*), do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e com as cultivares de soja M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO. Nos ensaios *in vivo* foram avaliados a capacidade das bactérias na promoção do crescimento de plantas de soja e na constituição dos compostos secundários produzidos pelas plantas oriundas de sementes microbiolizadas com suspensões bacterianas. Além disso, os ensaios de biocontrole do mofo branco, foram realizados com folhas destacadas em estágio V3, as quais foram pulverizadas com as suspensões das bactérias FIT09 e FIT62. As bactérias FIT09 e FIT62 apresentaram compatibilidade com *B. japonicum* e no ensaio de biocontrole com folhas destacadas, verificou-se que a FIT 09 reduziu o diâmetro das lesões necróticas causadas por *S. sclerotiorum* em ambas cultivares de soja avaliadas em teste de folhas destacadas. No ensaio de promoção de crescimento, as bactérias aumentaram o poder germinativo na cultivar M6210 IPRO. Para a avaliação da análise fitoquímica, as bactérias auxiliaram positivamente na produção dos compostos relacionados ao sistema de defesa.

Palavras-chave: Metabólitos Secundários. Fitoquímica. *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bacillus*, *Glycine max*

Abstract

The present study aimed to evaluate the potential of bacteria, in the promotion of growth, production of compounds of defense, and in the biocontrol of white mold in detached leaves of two soybean cultivars. The tests were performed with the antagonist bacteria FIT09 (*Bacillus cereus*) and FIT62 (*B. thuringensis*), with the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* and with the soybean cultivars M6210 IPRO and Brasmax Garra IPRO. In vivo tests evaluated the capacity of bacteria to promote the growth of soybean plants and the constitution of secondary compounds produced by plants from microbiolized seeds with bacterial suspensions. In addition, white mold biocontrol bioassays were carried out with detached leaves in stage V3 and they were sprayed with suspensions of the bacteria FIT09 and FIT62. The bacteria FIT09 and FIT62 were compatible with *B. japonicum* and in the biocontrol assay with detached leaves, it was found that FIT09 promoted superior control of 70% against the disease in both cultivars, however the disease did not manifest in the assay in plants. In the growth promotion test, the bacteria increased the germinative power in cultivar M6210 IPRO, for the assessment of fresh and dry mass there were no differences and for phytochemical analysis, the bacteria positively helped in the production of compounds related to the defense system.

Keywords: Secondary Metabolites. Phytochemistry, *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bacillus*, *Glycine max*

1 Introdução

A soja (*Glycine max* (L). Merrill está entre as culturas agrícolas mais significativas do país, devido ao seu valor socioeconômico e vasto aproveitamento dos seus produtos do complexo agroindustrial e pelo seu consolidado mercado internacional e nacional. É a cultura que mais cresce no país, correspondendo a mais de 56% da área cultivada com grãos (CONAB, 2016). O acréscimo da produtividade está vinculado ao nível tecnológico, manejo e a eficiência dos produtores rurais. A expectativa para produção de grãos no Brasil na safra 2019/2020 é de 251,794.9 mil toneladas (4% superior a safra de 2018/2019) e especificamente para a soja está prevista uma produção de 122,060.2 mil toneladas (6%

superior a safra 2018/2019) (CONAB, 2020). Apesar dos números positivos e do otimismo do setor, deve-se atentar para os fatores que podem afetar a produção. Dentre esses fatores, as doenças estão entre os principais, pois podem reduzir drasticamente a produtividade da cultura da soja.

Já foram identificadas no Brasil em torno de 40 doenças afetando a cultura, sendo causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (YORINORI *et al.*, 2005). De acordo com Almeida e colaboradores (2005), estima-se que os danos ocasionados por doenças podem reduzir a produtividade de 15 a 20%, porém se medidas de controle não forem tomadas as perdas podem ser de até 100% da produção.

Causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, a doença conhecida como mofo branco ocorre com

maior severidade em anos chuvosos, em temperatura amena e com constante umidade do solo (CAMPOS *et al.*, 2010). Sua incidência na cultura da soja aumentou significativamente a partir de 2008, sendo previsto que cerca de 10 milhões de hectares da área brasileira de cultivo de soja estejam infestados pelo patógeno (EMBRAPA, 2017).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial dos isolados bacterianos FIT09 e FIT62 no biocontrole do mofo branco em duas cultivares de soja, bem como avaliar o efeito destes isolados na promoção do crescimento da planta em condições de casa de vegetação e sua capacidade de produção de compostos relacionados ao sistema de defesa das plantas.

2 Material e Métodos

2.1 Local dos experimentos e origem do material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Produção e Sanidade Vegetal, e em casa de vegetação da Universidade Anhanguera UNIDERP, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Foram utilizadas as cultivares de soja de ciclo precoce, cultivadas no centro sul de Mato Grosso do Sul, M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO. Os ensaios foram conduzidos entre os meses de novembro de 2016 a março de 2017.

2.2 Origem, cultivo e manutenção dos microrganismos

Os ensaios foram realizados com bactérias antagonistas isoladas de solo sob cultivo com cana-de-açúcar (coordenadas geográficas de latitude 20°26'21" S e longitude 54°32'27" W, a uma altitude de 531,2 m do nível do mar). Foram utilizados os isolados FIT09 e FIT62 e fúngicos, pertencentes a coleção de microrganismos do Laboratório de Produção e Sanidade Vegetal, da Universidade Anhanguera UNIDERP, Campo Grande-MS, previamente selecionados. Os isolados foram preservados em tubos contendo meio de cultura nutriente-ágar (NA) e cobertos com óleo mineral esterilizado. Para a preparação de inóculo, as bactérias foram cultivadas em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24 h a 28 °C. O fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*, foi obtido de plantas de soja com sintomas de mofo branco, provenientes da cidade de São Gabriel do Oeste, MS, e os isolados foram mantidos por repicagens contínuas em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA). Para a preparação de inóculo, o patógeno foi cultivado em meio BDA (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) e mantido em BOD por 120 h, com temperatura média de 22 °C e fotoperíodo de 12 h.

2.3 Identificação molecular dos isolados biocontroladores

Para extração do material genômico, os isolados bacterianos foram crescidos em meio Luria Bertani por 24-48 h à 28 °C. A extração do DNA genômico foi realizada pelo KIT Wizard® Genomic DNA Purification de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração e pureza do DNA extraído foram mensuradas em espectrofômetro NanoDrop™

2000/c (Thermo Fisher Scientific). Para a caracterização molecular foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores 1492R (5-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3) e 27F (5-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) para o gene 16S rRNA (LANE, 1991).

Para amplificação da sequência parcial da região 16S rRNA foi utilizado: 30 µL GoTaq® Green Master Mix, 1 µM de cada oligonucleotídeo, 1 µL de DNA (60 ng) e o volume final de 50 µL foi completado com água miliQ. As amplificações ocorreram nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C/5 min; 30X de 95 °C/1 min, 54 °C/1 min e 72 °C/2 min; extensão final a 72 °C/10 min. em termociclador BioRad T100 Modelo 3D. Os fragmentos amplificados foram verificados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX EX – (Loccus).

Os produtos de PCR foram purificados de acordo com as recomendações do fabricante para o Kit SV Gel e PCR Clean-Up kit (Promega) e após enviados para sequenciamento na empresa Ludwig Biotecnologia. Após, as sequências obtidas foram analisadas no programa Bioedit e em seguida inseridas no GenBank, sediado no National Center for Biotechnology Information – NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmação da espécie.

2.4 Compatibilidade das antagonistas com *Bradyrhizobium japonicum*

Os isolados bacterianos FIT09 e FIT62 utilizados nesse trabalho, foram testados quanto a compatibilidade com *B. japonicum*, isolado do inoculante líquido Fertibio Soja® e cultivado em meio de cultura Levedura-Manitol (VICENT, 1970). Para o teste de compatibilidade, as bactérias FIT09, FIT62 e *B. japonicum* foram repicadas para placas de Petri com meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970). Com o auxílio de uma alça de platina foi feita uma estria para cada um dos isolados antagonistas e outra estria com *B. japonicum* em lados opostos na placa. Foi realizado no total, quatro placas, com duas repetições para cada bactéria. As placas foram mantidas à 28 °C por 24 h e após esse período, avaliado crescimento das bactérias antagonistas e o *B. japonicum*. Os experimentos, subsequentes, só ocorreram, quando deste ensaio, observou-se o crescimento de todos os microrganismos testados, sem que houvesse formação de halos de inibição.

2.5 Ensaio de promoção de crescimento vegetal

Sementes das cultivares M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO foram microbiolizadas com suspensões das bactérias FIT09 e FIT62 ajustadas para concentrações de $A_{540}=0,50$ (2mL dispersos sobre as sementes, que foram homogeneizadas manualmente, até secagem da suspensão) equivalentes a 10^8 UFC/mL, e também foram microbiolizadas com o inoculante. As testemunhas foram imersas em solução salina (0,85% de NaCl).

As sementes tratadas foram plantadas em vasos com capacidade para cinco litros, previamente preenchidos com solo não esterilizado, coletado em canteiros da horta didática da Universidade Anhanguera UNIDERP, sendo semeadas 5 sementes por vaso. O solo foi adubado com fósforo e potássio, conforme recomendações de Ribeiro *et al.* (1999). Os vasos foram irrigados diariamente até a capacidade de campo e as avaliações do Índice de velocidade de emergência (IVE), foram realizadas diariamente até o sétimo dia após o plantio. Para realizar o cálculo do IVE foi aplicada a equação indicada por Maguire (1962), onde $IVE = (E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn)$, sendo: IVE = índice de velocidade de emergência; E1, E2 e En = número de plântulas emergidas determinado na primeira, na segunda, ...e na última contagem; N1, N2 e Nn = número de dias da semeadura à primeira, à segunda, ...e à última contagem.

2.6 Análise Fitoquímica

Amostras de folhas e caules das plantas de cada tratamento do ensaio de promoção do crescimento foram coletadas aos 35 dias após o plantio para realização também da análise fitoquímica. Após a pesagem da massa fresca e seca, as folhas e os caules de massa seca foram triturados em um liquidificador industrial e em seguida, utilizado para obtenção do extrato etanólico a 14%, que ficaram em repouso por 24 h. Posteriormente, as amostras foram filtradas, para realização da análise fitoquímica (MATOS, 2009).

Os extratos foram avaliados por uma sequência de reações qualitativas para: compostos fenólicos (reação de precipitação com cloreto férrico), flavonoides (reação de cianidina e ácido sulfúrico), taninos (reação com sais de ferro, precipitação de proteínas), acidulação e alcalinização para detecção de antocianinas e catequinas, fluorescência sob luz UV para cumarinas, triterpenos e esteróides (reação de Liebermann-Burchard), glicosídeos cardiotônicos (teste de Baljet e de Kedde), teste de espuma para os açúcares redutores (reação de Benedict) (MATOS, 2009).

As análises foram realizadas visualmente seguindo protocolo com três repetições, para observação de alguma modificação da cor e precipitação com os extratos etanólicos originais. A existência da classe do metabólito secundário foi marcada como positivo e a inexistência de cor e/ ou precipitação como negativo. As intensidades de cor foram denominadas como negativa (0%), parcial (10%), baixa (25%), mediantemente moderada (50%), moderada (75%) e alta (100%) (FONTOURA *et al.*, 2015).

2.7 Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides

Para quantificar os fenóis totais (FT), os extratos etanólicos brutos foram analisados pelo método Folin-Ciocalteu, com ácido gálico (10 a 350 mg.mL⁻¹) como padrão, utilizando-se a curva de calibração $y=0,781x - 0,0031$; $R^2 = 0,9959$ (SOUSA *et al.*, 2007). Os flavonoides (F) foram analisados pela técnica

do cloreto de alumínio, adotando-se como padrão a quercetina ($y = 0,132x + 0,0353$ $R^2 = 0,9949$) (PEIXOTO SOBRINHO *et al.*, 2008). Na leitura dos compostos fenólicos e flavonoides, foi utilizado o espectrofotômetro FEMTO®, Modelo 432, onde as amostras foram mensuradas com comprimento de onda de 450nm e 750nm respectivamente (Hellma, Müllheim, Germany), com três repetições para cada tratamento. Os dados de quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa SAS 9.3.

2.8 Ensaio com folhas destacadas

Foram dispostas 5 sementes de cada uma das cultivares M6210 IPRO e Brasmax Garra IPRO em vasos com capacidade para cinco litros, preenchidos com solo não esterilizado e mantidos em casa de vegetação. O solo foi adubado com fontes de fósforo e potássio, conforme recomendações de Ribeiro e colaboradores (1999). Após 28 dias, os trifólios de plantas em estágio V3 de cada cultivar foram destacados e levados para o laboratório. Inicialmente foram preparadas bandejas plásticas contendo três folhas de papel filtro umedecido. Sobre estas, foram colocados cinco trifólios de cada cultivar de soja, os quais foram pulverizados com as suspensões das bactérias FIT09 e FIT62 ($A_{540} = 0,50 \times 10^8$ UFC/mL). As testemunhas foram pulverizadas com solução salina (0,85% de NaCl). Em seguida, discos de micélio do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* com 5 mm de diâmetro, foram dispostos no folíolo central e, as bandejas vedadas com papel filme e acondicionadas à 22°C com fotoperíodo de 12 h. Após 48 h, foram realizadas avaliações diárias do tamanho do diâmetro da lesão por um período de 7 dias, com auxílio de um paquímetro digital. O ensaio foi instalado em delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições e os valores obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5%.

3 Resultados e Discussão

De acordo com os dados do sequenciamento do fragmento correspondente a região parcial do gene rDNA16S, o isolado FIT09 foi classificado como *Bacillus cereus*, e o isolado FIT62 foi classificado como *B. thuringensis*.

Os microrganismos utilizados nestes ensaios, apresentaram compatibilidade, uma vez que, todos cresceram em meio de cultura, sem interferências negativas (presença de halos de inibição) como descrito no item 2.4. Combinações de antagonistas compatíveis entre si podem possibilitar a colonização do substrato e da rizosfera, de maneira mais eficaz, proporcionando melhor adaptação às mudanças climáticas, além dos diferentes mecanismos de ação que podem favorecer a inibição de patógenos, devido ao maior espectro de ação, vinculada a promoção do crescimento vegetal (CAVAGLIERI *et al.*, 2005).

Nos ensaios de avaliação da promoção de crescimento não foram observadas diferenças significativas entre os índices de velocidade de emergência (Tabela 1). As porcentagens de germinação da cultivar Brasmax Garra IPRO para os tratamentos bacterianos foram inferiores à testemunha, porém iguais ao tratamento com o inoculante (Tabela 1). Já para a cultivar M6210 IPRO, os tratamentos com os isolados FIT09 (*B. cereus*) e FIT62 (*B. thuringensis*) promoveram um aumento no percentual de germinação das sementes, em relação à testemunha e ao inoculante (Tabela 1). Vieira e Castro (2001), analisando a ação de *B. subtilis* na germinação de sementes de soja, observaram que concentrações intermediárias de hormônios aumentaram a germinação. A bactéria *B. subtilis* produz fitohormônios, os quais são capazes de estimular o desenvolvimento radicular da soja (ARAÚJO *et al.*, 2005). Da mesma forma, Araújo (2008), em ensaios com plantas de soja e algodão, observou que um formulado de *B. subtilis* com farinha de ostras proporcionou uma interação benéfica, aumentando a velocidade de germinação das sementes. Mazzuchelli e colaboradores (2014), observaram um

incremento na produção de soja de 30,72%, com a inoculação de *B. subtilis*. No entanto, no presente estudo, os isolados FIT09 e FIT62 não atuaram como promotores de crescimento nas cultivares de soja testadas.

A quantificação dos compostos fenólicos e flavonóides (Tabela 1) mostra que nas folhas de soja da cultivar Brasmax Garra IPRO, em que as sementes foram microbiolizadas com FIT62 (*B. thuringensis*) e com o inoculante, foram detectadas maiores concentrações de compostos fenólicos. Já os teores de flavonóides nas folhas, foi observado que o isolado FIT09 proporcionou nos maiores valores dessa variável para as duas cultivares analisadas. Os caules não seguiram o mesmo perfil na cultivar Brasmax Garra IPRO quando tratadas com a FIT62, pois apresentaram resultados superiores tanto para os teores de compostos fenólicos como para os flavonóides. Para a cultivar M6210 IPRO, os flavonóides apresentaram maiores concentrações quando tratados com a FIT62 (*B. thuringensis*) seguidos do inoculante, enquanto para os compostos fenólicos, o inoculante foi superior seguido da bactéria antagonista FIT09 (*B. cereus*) (Quadro 1).

Quadro 1 - Índice de velocidade de emergência (IVE) e germinação (%) e quantificação dos Compostos Fenólicos e Flavonóides presentes em caules e folhas das cultivares de soja M6210 IPRO e BRASMAX GARRA IPRO, oriundas de sementes microbiolizadas com as bactérias FIT09 (*B. cereus*), FIT62 (*B. thuringensis*) e com o inoculante Fertibio® soja com solução salina (0,85% de NaCl) (testemunha)

Tratamentos	IVE	Germinação (%)	Folhas		Caule		
			Comp. Fenólicos	Flavonóides	Comp. Fenólicos	Flavonóides	
cv. Brasmax Garra IPRO							
Testemunha	4,20a	92a	95,05b	29,35 d	15,64d	7,92c	
Inoculante	3,74a	76b	90,36c	30,00 c	21,89c	7,92c	
FIT09	3,64a	84b	85,93d	37,42 a	25,01b	8,58b	
FIT62	3,55a	80b	117,96a	31,64 b	28,26a	10,03a	
cv. M6210 IPRO							
Testemunha	1,73a	68b	57,04d	26,01c	24,75d	12,50c	
Inoculante	2,49a	68b	139,56a	31,61b	39,86a	13,66b	
FIT09	2,53a	84a	121,86b	32,96a	28,92b	8,11d	
FIT62	2,24a	80a	94,79c	10,29d	25,80c	14,59a	

Médias seguidas pela mesma letra e mesma coluna não possuem diferença estatística pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

Fonte: Dados da pesquisa

Os compostos fenólicos apresentam como mecanismo de ação no sistema de defesa, a inibição do crescimento de fungos, pois inutilizam sistemas enzimáticos que fazem parte da produção de energia e síntese dos constituintes estruturais dos microrganismos (PORTE; GODOY, 2001). Os flavonóides podem atuar como elicitores e também como mecanismos químicos que conferem proteção as plantas contra os fitopatógenos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2001). Cushnie e Lamb (2005) afirmam que os flavonóides induzem alterações metabólicas nos patógenos, impedindo a síntese de ácido nucléico, a atividade da membrana citoplasmática e o metabolismo. A biossíntese e o acúmulo de flavonóides estão interligados a diversas funções nas plantas, como a proteção contra incidência de raios ultravioletas, contra insetos, fungos, vírus, bactérias, e como mecanismo de defesa contra estresses

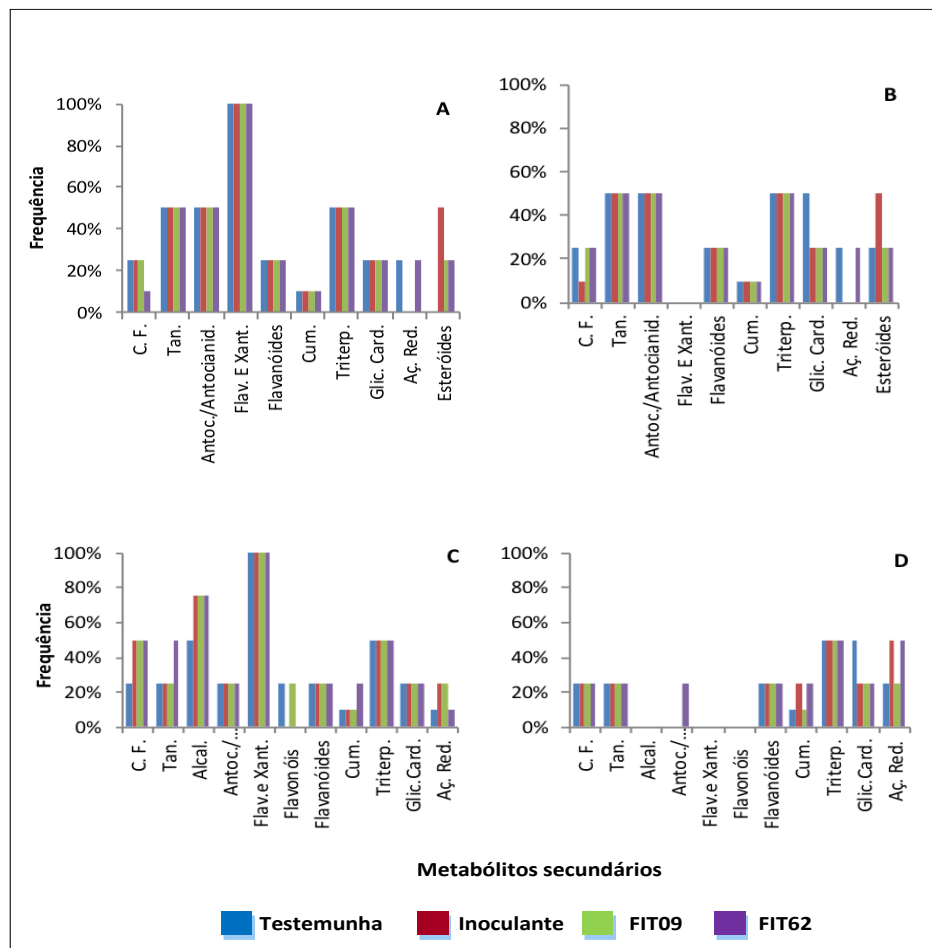
ambientais (SIMÕES *et al.*, 2010).

As bactérias FIT09 e FIT62 auxiliaram positivamente na produção dos metabólitos secundários analisados (Figura 1). Nas folhas e nos caules da cultivar Brasmax Garra IPRO foram detectadas 11 e 10 classes de metabólitos, respectivamente (Figura 1A, 1B). Já nas folhas nos caules da cultivar M6210 IPRO foram detectadas 8 e 9 classes de metabólitos (Figura 1C, 1D). Os constituintes químicos comuns distribuídos nas folhas e caules das duas cultivares foram compostos fenólicos, taninos, flavonóides, antocianinas, antocianidinas, cumarinas, triterpenos, glicosídeos cardiotônicos e açúcares redutores. Os alcalóides foram encontrados somente nas folhas da cultivar Brasmax Garra IPRO (Figura 1A) e os esteróides no caule das duas cultivares (Figuras 1B, 1D). Já as flavonas e xantonas foram encontradas somente no

caule e nas folhas da cultivar Brasmax Garra IPRO, em todos os tratamentos (Figura 1). Apesar de ausência de alguns constituintes, este fato não permite concluir a sua

inexistência, pois o método utilizado pode não detectar constituintes em baixas concentrações (na escala micro e ultramicro) (BRUM *et al.*, 2011).

Figura 1 - Frequência dos metabólitos secundários encontrados nos caules e em folhas das cultivares de soja Brasmax Garra IPRO (Figuras A e B) e M6210 IPRO (C e D), respectivamente, após 35 dias de plantio, cultivadas em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. (parcial +/- = 10%, baixa + = 25%, mediamente moderada ++ = 50%, moderado +++ = 75%, alta intensidade ++++ = 100% e negativa (-) = 0%)



Legenda. CF= Compostos Fenólicos, Tan.= Taninos, Antoc./Antocianid.= Antocianinas e antocianidinas, Flav. E Xant.= Flavonas e Xantonas, Cum.= Cumarinas, Triterp.= Triterpenos, Glic. Card.= Glicosídeos Cardiotônicos, Aç. Red.= Açúcares Redutores.

Fonte: Dados da pesquisa.

A diversidade e a frequência de classes de metabólitos secundários entre folhas e caules e entre as cultivares estudadas podem estar relacionadas a fatores abióticos e bióticos. Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), fatores climáticos (luminosidade, temperatura, pluviosidade) e nutricionais não atuam isoladamente e exercem influência conjunta no metabolismo secundário de plantas.

Os metabólitos secundários não exercem função evidente no crescimento e desenvolvimento vegetal, mas agem no sistema de defesa das plantas contra patógenos, pois apresentam atividades biológicas relacionadas a ação antimicrobiana (TAIZ; ZEIGER, 2009)

Os compostos cumarínicos estão presentes em plantas, principalmente nas folhas, frutas, raízes e talos (HOULT; PAYÁ, 1996). Neste estudo, as cumarinas foram detectadas

em todos os tratamentos com a mesma frequência em folhas de ambas as cultivares (Figura 1), mas diferindo na frequência nos caules das duas cultivares. Para cultivar Brasmax Garra IPRO, a maior frequência no caule foi encontrada no tratamento com a FIT62. Para cultivar M6210 IPRO, os tratamentos com o inoculante e a bactéria FIT62 destacaram-se pela frequência (Figura 1C). Em geral, a produção de cumarinas é influenciada pela sazonalidade, condições ambientais ou estresses provocados por interação com microrganismos e podem afetar a ocorrência em diversas partes da planta, nas quais possuem a função de proteção ao vegetal contra infecções de fungos e contra herbivoria (PEREIRA, 2002).

Os flavonóis e as antocianidinas são as classes de flavonoides consideradas mais importantes. Apenas nas folhas da cultivar M6210 IPRO tratadas com o inoculante e com a

FIT62, houve influência positiva para estas substâncias (Figura 1D). É comum alguns pigmentos como as antocianidinas e antocianinas atuarem como antioxidante e possuírem a capacidade de proteger a planta contra a ação de patógenos (ZHANG *et al.*, 2004).

Já os terpenos foram produzidos em maior quantidade nos caules, independente da cultivar e da bactéria antagonista (Figuras 1A;1C). Segundo Sartori (2005) estes compostos são ativos contra vários microrganismos. Seu modo de ação envolve a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos e após o rompimento da membrana, esses constituintes atuam inibindo aminoácidos do fungo.

Os açúcares redutores foram evidenciados, em mesma frequência, apenas nos caules das duas cultivares das testemunhas e com a inoculação da FIT62 (Figuras 1A; 1C). Já nas folhas, ocorreram diferenças de frequência nas duas cultivares, porém uma maior frequência foi observada na cultivar M6210 IPRO com o inoculante e com a FIT62 (Figura 1D). Esses resultados indicam que o tratamento com inoculante e a FIT62 desencadearam aumento da atividade metabólica das folhas, pois nas folhas maduras ocorre uma maior translocação dos açúcares, consequentemente, aumentando sua respiração (TAIZ; ZEIGER, 2009)

Nas folhas das duas cultivares de soja, foram encontradas as mesmas frequências de glicosídeos cardiotônicos independentes do tratamento (Figuras 1B;1D). O mesmo ocorreu nos caules, exceto na testemunha da cultivar M6210 IPRO que apresentou maior frequência dos glicosídeos cardiotônicos (Figuras 1A;1C).

Os taninos foram influenciados positivamente pela aplicação da bactéria FIT62 nas folhas da cultivar Brasmax Garra IPRO comparado com os caules e com as folhas da cultivar M6210 IPRO (Figura 1).

Os compostos fenólicos e os taninos são os encarregados de proporcionar a resistência de tecidos vegetais jovens ao ataque de patógenos e dessa maneira, são inibidores de várias enzimas hidrolíticas, produzidas por patógenos, durante a patogênese (AGRIOS, 2005). Santos (2004) relatou que as plantas que dispõem de uma grande quantidade de metabólitos secundários possuem um maior índice de sobrevivência, pois apresentam maior resistência a problemas ocasionados por fatores bióticos e, ou abióticos.

Quando avaliado o potencial de controle do mofo branco, via pulverização, observou-se que a bactéria FIT09 proporcionou controle superior a 70% em ambas as cultivares de soja testadas (Quadro 2). Wu *et al.* (2014) demonstraram a eficiência de *Bacillus* sp, na redução em 80% do mofo branco em folhas destacadas de canola via pulverização. Zhang e Xue (2010), constataram 90% de redução da severidade de mofo branco, em ensaios com folhas de soja destacadas, com a pulverização de *B. subtilis*. Já Remuska e Dalla Pria (2007) relataram que *B. thuringiensis* além de controlar o mofo branco em 37,44%, afetou a capacidade do fungo em produzir escleródios.

Quadro 2 - Diâmetro das lesões (DM) provocadas por *Sclerotinia sclerotiorum* e porcentagem de biocontrole em relação a testemunha em bioensaio utilizando folhas destacadas em duas cultivares de soja (*Glycine max*), pulverizadas com solução salina (0,85% de NaCl) e com as suspensões das bactérias FIT09 (*B. cereus*) e FIT62 (*B. thuringiensis*)

Tratamentos	DM (mm)	Controle (%)
	cv. Brasmax Garra IPRO	
Testemunha	4,530a	-
FIT09	0,520b	88,5
FIT62	2,617a	42,2
cv. M6210 IPRO		
Testemunha	3,622a	-
FIT09	1,022b	71,8
FIT62	1,812a	50,0

Médias seguidas pela mesma letra e mesma coluna não possuem diferença estatística pelo teste de Tukey a 0,05% de probabilidade.

Fonte: Dados da pesquisa.

O antagonismo direto realizado contra fitopatógenos abrange os mecanismos de antibiose, como a síntese de substâncias antimicrobianas, a competição por espaço e por nutrientes e a síntese dos compostos voláteis (LEELASUPHAKUL *et al.*, 2008). Segundo Nielsen e Sorensen (1997), em torno de 20 a 40% das espécies de *Bacillus* isoladas do solo, dispõem de alguma forma de antagonismo contra fungos patogênicos. Leelasuphakul e colaboradores (2008) relatam que bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de lisar esporos e produzirem compostos voláteis tóxicos à diferentes fitopatógenos, o que pode contribuir para redução da severidade de doenças em plantas.

4 Conclusão

Pode-se concluir que os isolados bacterianos FIT 09 (*B. cereus*) e FIT 62 (*B. thuringiensis*), foram compatíveis com *B. japonicum* e auxiliaram positivamente na produção de classes de metabólitos secundários relacionados ao sistema de defesa em plantas de soja. A bactéria FIT 09 reduziu o diâmetro das lesões necróticas causadas por *S. sclerotiorum* em ambas cultivares de soja avaliadas em teste de folhas destacadas.

Referências

- AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: AGRIOS, G.N. *Plant pathology*. California: Academic Press, 2005. p.93-114.
- ALMEIDA, A.M.R. *et al.* Doenças da soja. In: KIMATI, H. *et al. Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas*. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.
- ARAÚJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. *Ciênc. Agrotecnol.*, v.32, p.456-462, 2008. doi: 10.1590/S1413-70542008000200017
- ARAÚJO, F.F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.21, p.1639-1645, 2005. doi: 10.1007/

s11274-005-3621-x

BRUM, T.F. et al. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex Megapotamica* (Sprengel) Moldenke. *Ahead Print*, v.37, p.57-62, 2011.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. *Basic plant pathology methods*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995.

CASTRO, V.L.S.S.; MELO, I.S. Avaliação toxicopatológica em ratos expostos à *Pseudomonas putida*. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v.2, p.1-5, 2007.

CAMPOS, H.D. et al. Mofo-branco na cultura da soja e os desafios da pesquisa no Brasil. *Trop. Plant Pathol.*, v.35, Suplemento, p. C-CI, 2010.

CAVAGLIERI, L.; ORLANDO, J.; ETCHEVERRY, M. In vitro influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticilloides* growth and fumonisin B production; effect of seeds treatment on maize root colonization. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.41, p.390-396, 2005. doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01785.x

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. *Séries históricas de produção*. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras>. Acesso em: 2 maio 2020.

CUSHNIE, T.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrobial Agents*, v.26, p.343-356, 2005. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2017/18. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1094445/1/CT140mofobrancoOL.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2020.

FONTOURA, F.M. et al. Seasonal effects and antifungal activity from bark chemical constituents of *Sterculia apetala* (Malvaceae) at Pantanal of Miranda, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Amazonica*, v. 45, p.283-292, 2015. doi:10.1590/1809-4392201500011

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova*, v.30, p.374-381, 2007.

HOULT JR, PAYA, M. 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen. Pharmacol.*, v.27, p.713-22, 1996. doi: 10.1016/0306-3623(95)02112-4

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Coínoculação de soja e feijão com rizóbio e azospirilla: estratégias para melhorar a sustentabilidade. *Rev. Biol. Fertil. Solo*, v.49, p.791-801, 2013.

KADO, C.I; HESKETT, M.S. Seletive media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v.60, p.969-976, 1970.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*. New York: John Wiley and Sons, 1991. p.115-175.

LEELASUPHAKUL, W. et al. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum*) of citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, v.48, p.113-121, 2008. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.09.024

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Scie.*, v.2, p.176-

177, 1962. doi: 10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x

MATOS, F.J.A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 2009.

MAZZUCHELLI, E.H.L. et al. Nodulação da soja em função da coínoculação de *Bradyrhizobium* spp. e *Bacillus subtilis*. Presidente Prudente: Universidade do Oeste Paulista, 2014.

NIELSEN, P.; SORENSEN, J. Multi-target and medium-independent fungal antagonismo by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v.22, p.183-192, 1997. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00370.x

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S. et al. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, v.44, p. 683-689, 2008.

PEREIRA, J.O.P.P.; FREITAS, B. M. Estudo da biologia floral e requerimentos de polinização do muricizeiro (*Byrsonima crassifolia* L.). *Rev. Ciênc. Agron.*, v.33, p.5-12, 2002.

PORTE, A.; GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e química do óleo essencial. *Rev. Bol. Centro Pesq. Proc. Aliment.*, v.19, p.193- 210, 2001.

REMUSKA, A.C.; DALLA PRIA, M. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. *UEPG: Ciênc. Exatas Terra, Agrár. Eng.*, v.13, p.31-36, 2007.

RIBEIRO, A.C; GUIMARÃES, P.T; ALVAREZ, V.H. Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª Aproximação, p.306-307, 1999.

SANTOS, A.R. et al. Constituintes polares das folhas de *Machaonia brasiliensis* (Rubiaceae). *Quím. Nova*, v.27, p.525-527, 2004. doi:10.1590/S0100-40422004000400002

SARTORI, M.R.K. Atividade antimicrobiana de fração de compostos puros obtidos das flores da *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) (Asteraceae). Santa Catarina: Universidade do Vale do Itajaí, 2005.

SIMÕES, M.O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

SOUSA, C.M.M.S. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. Nova*, v.30, p.351-355, 2007. doi:10.1590/S0100-40422007000200021

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre: Artmed, 2009.

VIEIRA, E.L.; CASTRO, P.R.C. Efeito de bioestimulante na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento radicular e produtividade de soja. *Rev. Bras. Sementes*, v.23, p. 222-228, 2001.

VICENT, J.M. *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. ICB HandBook, 15, Oxford: Blackwell Scientific, 1970.

WU, Y. et al. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.24, p.1327-1336, 2014. doi: 10.4014/jmb.1402.02061

YORINORI, J.T. et al. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. *Plant Dis.*, v.89, p. 675-677, 2005. doi: 10.1094/PD-89-0675

ZHANG, J.X.; XUE, A.G. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus*

subtilis strain SB24 under control conditions. *Plant Pathol.*, v.59, p. 382-391, 2010. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02227.x

doi:10.1021/jf034596w

ZHANG, Z. *et al.* Comparison of HPLC methods for determination of anthocyanins and procyanidins in bilberry extracts. *J. Agricultural Food Chem.*, v.52, p.688-691, 2004.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMIES, C.M.O. et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS/ UFSC. 2001.