

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CÂMPUS DOIS VIZINHOS

FABIANE JACINTO

**POTENCIAL DE *Beauveria bassiana* E METABÓLITOS NA INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA E NO CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES EM SOJA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS

2019

FABIANE JACINTO

POTENCIAL DE *Beauveria bassiana* E METABÓLITOS NA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E NO CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES EM SOJA

Projeto de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior em Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, como requisito parcial para obtenção do título de Bióloga.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Miguel Mazaro

DOIS VIZINHOS

2019



TERMO DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso n° ____

Potencial de *Beauveria bassiana* e metabólitos na indução de resistência e no controle de doenças foliares em soja

por

Fabiane Jacinto

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado às 09 horas do dia 12 de junho de 2019, como requisito parcial para obtenção do título de Biólogo (Curso Superior em Ciências Biológicas– Licenciatura, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos). O candidato foi arguido pela banca examinadora composta pelos membros abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Thayllane de Campos Siega
(PPGAG, UTFPR – Pato Branco)

Prof. Sérgio Miguel Mazaro
Orientador
UTFPR – Dois Vizinhos

Stheffani Lucca dos Santos
(PPGAG, UTFPR – Pato Branco)

Profª. Marcele Felippi
Coordenadora do Curso de Ciências
Biológicas
UTFPR – Dois Vizinhos

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”

AGRADECIMENTOS

A minha família, por sempre me apoiar e incentivar meus sonhos, nunca medindo esforços para que eu possa alcançar meus objetivos.

Em especial minha mãe Ivonice Paza que me ensinou a sempre persistir.

Ao orientador Sérgio Miguel Mazaro, por todo auxílio, paciência e confiança no decorrer de todo o trabalho.

Ao grupo de estudo em Fitopatologia.

A todos meus amigos e colegas que sempre de alguma forma colaboraram e incentivaram no trabalho.

Muito obrigada!

“Nunca o homem inventará nada mais simples nem mais belo do que uma manifestação da natureza. Dada a causa, a natureza produz o efeito no modo mais breve em que pode ser produzido.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

JACINTO, Fabiane. **Potencial de *Beauveria bassiana* e metabólitos na indução de resistência e no controle de doenças foliares em soja**. 2019. 37 f. Trabalho (Conclusão de Curso) – Programa de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) apresenta grande importância na economia no Brasil e em âmbito mundial, contudo, o elevado número de pragas e doenças nessa cultura acarreta perdas significativas na produção. A *Beauveria bassiana* encontra-se amplamente utilizada no controle biológico de insetos pragas na cultura da soja. No entanto, os biológicos e seus metabólitos vêm sendo relatados com potencial de indução de resistência de plantas, seja a insetos ou doenças. Desse modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de *B.bassiana* e metabólitos de *B.bassiana* na ativação de defesa vegetal e no controle de doenças foliares da cultura da soja. Os experimentos foram realizados no laboratório de Controle Biológico, no laboratório de Bioquímica e Indução de Resistência e na Estação Experimental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Campus Dois Vizinhos, Paraná (PR). O delineamento experimental para todos os experimentos foi inteiramente casualizado. No primeiro trabalho os tratamentos à base de *B.bassiana*, metabólitos de *B. bassiana* e Acienzolar-S-Metil foram avaliados em cotilédones de soja. Sementes foram semeadas em bandejas de polipropileno, tendo como substrato areia autoclavada. Após 7 dias os cotilédones foram removidos das plântulas e lavados em água destilada, e determinada massa de matéria fresca. Na face abaxial dos cotilédones, foram feitos cortes superficial e sobre esses cortes, foram depositadas as soluções elicitoras ou se tratando da testemunha água destilada. Em seguida, depositadas em placas de Petri. As placas devidamente tampadas e não vedadas foram mantidas em câmara BOD na temperatura de 26°C, e ausência de luz. Passando-se 20 horas, os cotilédones foram retirados para as análises bioquímicas e quantificação de fitoalexinas, atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) e compostos fenólicos. Com o resultado do primeiro trabalho, observou-se potencial de ativação de defesa vegetal, então, desenvolveram-se outros dois trabalhos verificando o potencial dessa ativação em atuar efetivamente no controle de doenças foliares. Nesse sentido, para verificar efeitos sobre ferrugem asiática e oídio, foram feitos os estudos *in vivo* utilizando a metodologia de folha destacada (FRAC - Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas) e também aplicação à campo. Os tratamentos para esses dois estudos em doenças foliares foram *B.bassiana*, metabólitos e os fungicidas trifloxistrobina+protioconazol e oxicloreto de cobre. Os resultados foram tabulados, avaliados quanto à normalidade e realizado a análise de variância. Os resultados observados indicaram que a *B.bassiana* e metabólitos induzem a resistência em plantas de soja, ativando a enzima FAL, a síntese de fitoalexinas e o incremento de compostos fenólicos. No entanto, não apresentou potencial de controlar as doenças foliares ferrugem e oídio na cultura da soja.

Palavras chaves: Controle alternativo. Fitoalexinas. Manejo de doenças.

ABSTRACT

JACINTO, Fabiane. **Potential of *Beauveria bassiana* and metabolites in induction of resistance and control of leaf diseases in soybean.** 2019. 37 f. Undergraduate thesis – Graduation Program in Biological Sciences, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, 2019.

Soybean cultivation (*Glycinemax* (L.) Merrill) presents great importance in the Brazilian economy and worldwide, however, the high number of pests and diseases in this crop brings significant losses in production. The *Beauveria bassiana* is widely used in biological control of insect pests in soybean crop. However, this fungus and metabolites had been reported with potential of inducing plants resistance against insects and diseases. The objective of this work was to evaluate the potential of *B. bassiana* and its metabolites in the activation of plant defense and in the control of foliar diseases in soybean crop. The experiment was carried out in the Biological Control Laboratory, Biochemistry and Resistance Induction Laboratory and at the Experimental Station of Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Dois Vizinhos Campus, Paraná (PR). The experimental design for all the experiments was completely randomized. In the first work the treatments of *B. bassiana*, its metabolites and Acienzolar-S-Metil were evaluated in soybean cotyledons. Seeds were planted in trays of polypropylene, having as substratum autoclaved sand. After seven days the cotyledons were removed from the seedlings and washed in distilled water and determined the mass of fresh matter. In the cotyledons abaxial face, superficial cuts were made and above this cuts, the elicitor solutions were deposited or, as control, distilled water. Next, deposited in Petri dishes. The plates were properly closed and unsealed and kept in a BOD chamber at 26°C and no light. After 20 hours, the cotyledons were removed to biochemical analyzes and quantification of phytoalexins, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme activity and phenolic compounds. With the results from the previous work, it was observed potential of vegetal defense, so, two other studies were developed verifying the potential of this activation in acting effectively in the control of foliar diseases. In order to verify effects on Asian rust and powdery mildew, the *in vivo* studies were carried out using the detached leaf methodology (FRAC - Fungicide Resistance Action Committee) and also applied to the field. The treatments for these two studies in leaf diseases were *B. bassiana*, metabolites and the fungicides trifloxystrobin + prothioconazole and copper oxychloride. The results were tabulated, evaluated for normality and the analysis of variance was performed. Results indicated that *B. bassiana* and metabolites induced resistance in soybean plants, activating the PAL enzyme, the synthesis of phytoalexins and increase in phenolic compounds. However, it has no potential to control leaf diseases rust and powdery mildew in soybean cultivation.

Key words: Alternative Control. Phytoalexins. Disease Management.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
3	OBJETIVOS	13
3.1	Objetivos Gerais	13
3.2	Objetivos Específicos	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	Histórico e utilização de biocidas organo-sintéticos	14
2.2	Doenças de impacto na cultura: Oídio e Ferrugem Asiática	15
2.3	Contaminação	16
2.4	Controles Alternativos e a utilização do Controle Biológico	17
2.5	Indução de resistência	18
2.6	<i>Beauveria bassiana</i>	19
4	METODOLOGIA DE PESQUISA	21
4.1	Local	21
4.2	Tratamentos e Delineamento experimental	21
4.3	Obtenções dos produtos com potencial de indução	23
4.4	Primeiro experimento – <i>In vitro</i>	23
4.4.1	Análises bioquímicas	24
4.4.2	Teor de proteínas	24
4.4.3	Atividade de Fenilalanina amônia-liase	25
4.4.4	Quantificação de Compostos Fenólicos	25
4.5	Segundo Experimento - <i>In vivo</i>	26
4.5.1	Eficiência no controle em folhas destacadas	26
4.5.2	Eficiência no controle em Oídio a campo	27
5	RESULTADOS	28
5.1	Indução de resistência	28
5.1.1	Ativação de Fitoalexinas em soja	28
5.1.2	Atividade Fenilalanina amônia-liase	30
5.1.3	Quantificação de Compostos Fenólicos	31
5.1.4	Proteínas Totais	32
5.2	Efeitos sobre folhas destacadas	33
5.3	Avaliações do efeito sobre Oídio a Campo	34
6	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS	35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Ativação de fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja por *Beauveria bassiana* e metabólitos, Dois Vizinhos, 2019.....27
- Tabela 2.** Avaliação da enzima Fenilalanina amônia-liase em cotilédones de soja tratados com *Beauveria bassiana*. Dois Vizinhos, 2019.....29
- Tabela 3.** Avaliação de compostos fenólicos no processo de indução de resistência em plantas de soja. Dois Vizinhos, 2019.....30
- Tabela 4.** Avaliação do teor de proteínas no processo de defesa das plantas sobre efeitos de *Beauveria bassiana*. Dois Vizinhos, 2019.....30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Avaliações experimentais realizadas e seus respectivos tratamentos.....21
- Figura 2** - Produto utilizado para o preparo do meio de cultura de *B.bassiana*.....22
- Figura 3** - Procedimentos realizados com cotilédones para a determinação de fitoalexinas
.....23
- Figura 4** - Procedimentos realizados na metodologia (FRAC-Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas).....26
- Figura 5** - Área experimental da cultura da soja utilizada para análises a campo.....26
- Figura 6** - Demarcações de folhas de soja para a aplicação dos tratamentos.....27
- Figura 7** – Severidade de Ferrugem Asiática (%) em folhas destacadas de soja, submetidas a tratamentos biológicos e químicos.....32

LISTA DE ABREVIATURAS

ASB - Albumina de Soro Bovino

BDO - Demanda Bioquímica de Oxigênio

°C - Graus Celsius

FAL - Fenilalanina amônia-liase

HCL - Ácido Clorídrico

MCA - Metanol, Clorofórmico e água

Min- Minutos

mL- Mililitros

Mg - Miligramas

Mg/mL- Miligramas por mililitros

Nm- Nanômetro

µl- Microlitro

pH- Potencial Hidrogeniônico

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycinemax* (L.) Merrill) tem grande importância no agronegócio brasileiro e em âmbito mundial, pois é uma das atividades que mais tem se expandido economicamente, na medida em que é um dos grãos mais utilizados e processados para a alimentação de animais, por se tratar de uma leguminosa muito rica em proteínas (HIRAKURI; LAZAROTTO, 2011).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América – USDA – estimou uma produção mundial de soja de mais de 347 milhões de toneladas no ciclo 2017/18 (SEAB, 2018). Segundo a última estimativa do USDA o consumo de soja para o ciclo 2017/18 deverá ser de 344 milhões de toneladas em média. Esse volume se confirmado será cerca de 4% superior ao volume da safra 2016/17. Em que os maiores consumidores mundial são a China e os Estados Unidos que juntos consomem cerca de 50% da produção global.

No cenário Brasileiro segundo o primeiro levantamento da produção brasileira 2017/18, divulgado pela CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento – os produtores brasileiros colheram cerca de 107 milhões de toneladas (SEAB, 2018). Estima-se que no cenário paranaense a área cultivada na safra de 2018/2019 foi 5% maior do que no ano passado (SEAB, 2019).

No entanto, na produção da soja as doenças são um dos principais fatores limitantes na exploração máxima do potencial de produtividade da cultura. No Brasil há mais de 57 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já identificados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2018).

Contudo, essas informações notabilizam a importância da cultura da soja a nível mundialmente. O aumento gradativo da produção a cada ano, vem causando preocupações em relação aos fatores ambientais. O aumento da produtividade vem exigindo um aumento nos percentuais de produtos químicos para o controle de pragas e doenças da cultura. Doenças fungicas como Oídio e Ferrugem Asiática, também avaliadas nesse trabalho, causam grande impacto na produtividade da soja. Na maioria das vezes ocorre o uso indiscriminado de químicos para o controle dessas doenças, vem acarretando no desequilíbrio de ecossistemas naturais.

Desta maneira, tencionando reduzir o uso intenso de produtos químicos para controlar estas doenças, procura-se associar e fazer uso de novas metodologias, como o uso do controle alternativo, na busca por mecanismos que possam reduzir os impactos ambientais e na saúde ocasionados pelo uso indiscriminado dos químicos, dentre eles pode-se citar o controle biológico e a indução de resistência.

Ao realizar tratamento em planta sendo ele com microrganismos ou compostos químicos, permite a ativação sistêmica dos mecanismos de defesa os quais as plantas possuem. O controle de doenças torna-se mais efetivo, econômico e ecológico, quando se utilizam diversas táticas de forma integrada (CARVALHO, 2012). Sendo assim, busca-se um método o qual diminuía a utilização de compostos que tragam impactos irreversíveis ao meio ambiente.

A indução a resistência é descrita como uma defesa induzida, podendo ser por fatores bióticos ou fatores abióticos “na efetividade contra, bactérias, vírus, nematóides e fungos, com caráter sistêmico. A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de resistência nas plantas em resposta ao tratamento prévio com agentes bióticos” (CARVALHO, 2012).

A utilização de agentes de controle biológico como a *Beauveria bassiana* já são amplamente utilizados, e de modo abrangente em todos os países, sendo frequentemente seu uso sobre os insetos, no sistema de cultivo agrícola da cultura da soja, com alvos biológicos inerente. Em condições laboratoriais, este fungo pode colonizar a maioria dos insetos, no entanto, em campo ocorre de forma enzoótica sobre alguns insetos como coleópteros, lepidópteros, hemípteros e em ocorrências enzoóticas sobre dípteros, ortópteros e himenópteros. (ALVES, pg. 312, 1998).

O entomopatógeno é aplicado em combinações com produtos químicos no controle dessas pragas, tendo como objetivo a redução das doses desses produtos, num efeito de sinergismo. (ALVES, pg. 314, 1998)

No entanto, informações que associem o uso de *Beauveria bassiana* e seus metabólitos ao processo de indução de resistência no controle de doenças não foram ainda estudados, e descritos na literatura, razão dessa pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de *B.bassiana* e metabólitos de *B.bassiana* na ativação de defesa vegetal e de doenças foliares da cultura da soja.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar as respostas de indução de resistência, quantificando fitoalexinas, compostos fenólicos, proteínas e atividade da enzima fenilalanina amônia-liase, em cotilédones de soja por *B.bassiana* e metabólitos de *B. bassiana*, e comparando com indutor a base de Acibenzolar-S-Metil.
- b) Avaliar o potencial do fungo *B.bassiana* e metabólitos de *B. bassiana* no controle de ferrugem asiática de soja, considerando a metodologia de folhas destacadas (FRAC).
- c) Avaliar o potencial de *B.bassiana* e metabólitos de *B. bassiana* no controle de oídio a campo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Histórico e utilização de biocidas organo-sintéticos

Os biocidas organo-sintéticos, como também conhecidos agrotóxicos, surgiram na Segunda Guerra Mundial, com a finalidade de ser utilizados como arma para dizimar inimigos. Com o término da Segunda Guerra, os avanços científicos e com os conhecimentos nas manipulações dessas substâncias químicas letais, estes compostos foram elaborados na tentativa de favorecer as práticas agrícolas. Estes princípios ativos, devido a sua eficiência, foram então utilizados para o combate de pragas (MORAGAS & SCHNEIDER, 2003, p.26).

Conforme a Lei 7.802/89 os agrotóxicos são definidos como:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. (PELAEZ, V. & TERRA, F. H. B & SILVA, L.R, 2010, p. 30)

Diante este avanço científico e tecnológico é possível observar novos impactos ambientais surgindo, devido ao uso excessivo destes compostos.

A utilização intensiva de agrotóxico no controle de pragas, doenças e plantas na agricultura tem ocasionado perda na biodiversidade e alterações antrópicas dos ciclos biológicos, ocasionando problemas de ordem ambiental.

Com o processo de aumento populacional mundial e a maior demanda por alimentos, tornou a agricultura dependente de técnicas que venham contribuir com a expansão da produtividade. (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003, p.28).

Estes insumos químicos têm causado impactos negativos nos diferentes compartimentos dos ecossistemas, contaminação de águas superficiais e subterrâneas, resíduos químicos nos solos, efeitos nos organismos edáficos e aquáticos e danos à saúde humana, entre outros. (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003). Somente a cultura da soja é responsável por um terço do consumo de agrotóxico do Brasil (CAMPANHOLA & BETTIOL, 2003, p. 17).

Em 1989 foi aprovada no Congresso Nacional a Lei 7.802, conhecida como a Lei dos Agrotóxicos, que substituiu o Decreto 24.114 de 1934, posteriormente regulamentada pelo decreto n. 98.816 de 11 de janeiro de 1990 e substituído no ano de 2002, pelo Decreto 4074, de 04 de janeiro de 2002. (PELAEZ, V. & TERRA, F. H. B & SILVA, L.R, 2010, p. 30)

O avanço dessa Lei realizou-se com a formação de regras mais rigorosas para a concessão de registros aos agrotóxicos. (PELAEZ, V. & TERRA, F. H. B & SILVA, L.R, 2010, p. 30). No entanto, a preocupação da sociedade e pesquisadores com os impactos ocasionados pela agricultura moderna no ambiente e a contaminação alimentar com agrotóxicos, está alterando o cenário agrícola, resultando em mercados de alimentos produzidos sem o uso dessas substâncias químicas ou aqueles com selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente (BETTIOL & MORANDI, 2009). Dentre as formas para a redução do uso de agrotóxicos o controle alternativo apresenta destaque, visto que ocorre de forma natural no ecossistema, ou ainda pode ser adicionado a ele dentro de um manejo integrado para a cultura.(BETTIOL & MORANDI, 2009).

Com isso há uma predisposição de se buscar métodos alternativos de controle de doenças e pragas em plantas. Desse modo, diversos trabalhos têm sido realizados com o uso do controle alternativo de fitopatógenos, para a produção de alimentos mais saudáveis, livre de resíduos de agrotóxicos. (MAZARO, 2008, p.1824).

2.2 Doenças de impacto na cultura: Oídio e Ferrugem Asiática

O Oídio doença causada pelo fungo *Microsphaera diffusa* (Cooke e Peck) na cultura da soja (*Glycine Max.* Merrill), apresenta sérios riscos a cultura, resultando em baixo rendimento produtivo (BLUM, et.al, 2002).

O desenvolvimento de Oídio na soja é favorecido por temperaturas entre 20 °C, com umidade relativa do ar em torno de 50 a 90%, quando as plantas de soja encontram-se entre os estágios R1 e R2 (florescimento) e R6 (formação da semente) (BLUM, et.al, 2002).

A infecção causada pela doença apresenta desenvolvimento generalizado em toda parte aérea da planta, como hastes, pecíolos, vagens e folhas, manifestando sintomas pulverulentos, ou seja, produzindo massa seca de esporos, com pontos brancos que evoluem sob toda parte área da planta (PEREIRA, et.al

2008). Atualmente a forma preventiva mais utilizada para controlar esta doença é o uso de fungicidas (BLUM, et.al, 2002).

A ferrugem asiática da soja é uma doença causada pelo fungo do gênero *Phakopsora*, a espécie *Phakopsora pachyrhizi* (Sydow & Sydow). A ferrugem asiática é considerada uma das principais doenças da cultura da soja, a qual acarreta perdas significativas anualmente, sendo um dos principais empecilhos no agronegócio brasileiro (YORINORI; LAZZAROTTO, 2004).

A ferrugem asiática é a doença caracterizada de incidência mais severa na cultura da soja. A primeira ocorrência relatada no Brasil datou a safra do ano de 2001, se disseminando aceleradamente por todas as regiões produtoras do país, até os dias de hoje é prevalente sobre a cultura, sendo controlada por fungicidas (GODOY, et.al., 2017).

2.3 Contaminação

Na atualidade encontra-se uma busca crescente na produção de alimentos em grande escala no mundo, na busca de sanar a demanda e necessidade da população. No entanto, para o sucesso da produtividade há um crescente demanda na utilização de produtos químicos. Estes viabilizam uma produção efetiva, com baixas perdas, de modo geral por pragas e doenças da cultura.

Em contrapartida, observam-se enormes danos sendo causados aos ecossistemas naturais pertinente a contaminação por esses produtos, no solo, nas águas, perda da biota e riscos gravíssimos à saúde humana (CAMATTI-SARTORI et.al. , 2011; GOMES et.al., 2009).

Grande parte dos agrotóxicos aplicados se desloca no ambiente, contaminando águas superficiais, solos, águas subterrâneas, e além disso, muitos desses produtos tem potencial de bioacumulação nos organismos vivos, ou seja, a acumulação desses químicos na biomassa das espécies ao longo da sua vida, e também de biomagnificação, em que esses resíduos tóxicos acumulam-se ao longo dos níveis tróficos, acarretando no desequilíbrio das cadeias e ecossistemas naturais, além dos riscos à saúde humana, a qual se encontra exposta diretamente.

Esses químicos relatados são largamente utilizados no Brasil, sendo eles inseticidas, fungicidas, herbicidas, como os organoglorados e organofosforados (GOMES, M. A. F; BARIZON, R. R.M, 2014).

2.4 Controles Alternativos e a utilização do Controle Biológico

Existem algumas alternativas que asseguram a integridade do meio ambiente, de modo a favorecer o controle em perdas por pragas e doenças presentes nas lavouras, como a indução de resistência e o controle Biológico, sendo eles exemplos de controle alternativo (SILVA, 2013).

No Brasil, devido às variações climáticas favoráveis, é crescente o número de doenças causadas por patógeno, nas mais diversas culturas de fins econômicos. (ALQUINO, 2008, p. 132). Entretanto, o principal método de manejo utilizado ainda nos dias de hoje é o controle químico, apresentado como alternativa para garantir o desenvolvimento da cultura. No entanto, esse método apresenta altos custos de produção e acarreta fortes impactos ao meio ambiente. (ALQUINO, 2008, p. 132).

A proteção de plantas nos métodos convencionais, por meio do uso de controle químico predispõe de características, como simplicidade e previsibilidade, que necessitam de pouco entendimento sobre a ecologia e a fisiologia da espécie. (BETTIOL & GUINI, 2001, p.01). Entretanto, em contraste com a utilização da agricultura convencional, os métodos alternativos buscam obter vantagens das interações de ocorrência natural. (BETTIOL & GUINI, 2001, p.02).

Os autores Venzon et. al. (2006) são incisivos neste aspecto de sistemas alternativos, pois, de acordo com eles, o controle de pragas em sistemas orgânicos de produção é uma das maiores dificuldade encontradas pelos produtores. A maioria das práticas utilizadas atualmente nas formas alternativas, em sistemas orgânicos, não tem sua eficiência comprovada, sendo muitas vezes necessário o produtor agir por tentativa e erro (VENZON, p. 224, 2006).

O controle biológico busca realizar o controle de microrganismos causadores de danos, ou seja, microrganismos entomopatogênicos, a partir de antagonicos. Esses microrganismos têm capacidade de ativar a resposta de defesa

a seu hospedeiro, como exemplo, a resistência sistêmica induzida, na prevenção de doenças (BERNARDES, 2006).

2.5 Indução de resistência

De acordo com Moraes (1992) “A denominação genérica de Controle Alternativo, estão incluídos o Controle Biológico e o Controle induzido, os quais também são conhecidos como Indução de Resistência, Resistência Induzida e Imunização”.

A utilização do Controle Biológico e da Indução a Resistência, busca fazer o controle de pragas e doenças sem impactar ambientalmente e reduzir os custos em relação uso de métodos químicos tradicionais. (MORAES, p.176, 1992)

Moraes (p. 176, 1992) ressalta que:

Uma diferença fundamental entre o Controle Biológico e o Controle Induzido é que, no primeiro, a ação controladora se faz direta e primeiramente sobre a praga ou o patógeno, enquanto que, no Controle Induzido, a ação se dá sobre a planta hospedeira modificando a sua relação com a praga ou patógeno.

O emprego da Indução de Resistência pode ser utilizado para designar uma proteção local, ou seja, induzir a resistência apenas nos tecidos onde foi feito o tratamento com o agente indutor, ou em uma resistência sistêmica que se manifesta distante do local, no qual foi aplicado o agente indutor (MORAES, p.176, 1992).

De acordo com Taiz et. al. (p. 715, 2017) “embora os vegetais não apresentem um sistema imunológico comparável aos animais, eles são excepcionalmente resistentes a doenças provocadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides que estão presentes no ambiente”.

“Isso se deve ao fato dos mecanismos de defesa das plantas existirem em complexidade e serem extremamente eficientes. A resistência natural de plantas a patógeno baseia-se em barreiras e mecanismos de defesa já existentes, independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção.” (BARROS et al, p. 231, 2010).

Segundo Taiz et al (p. 716, 2017) “ As estratégias de invasão e infecção sejam bem realizadas, epidemias de doenças vegetais são raras em ecossistemas

naturais. Isso se deve ao fato de que plantas desenvolvem estratégias eficazes contra conjuntos diversos de patógenos”.

Os fitopatógenos podem produzir uma ampla série de efeitos que sustentam sua capacidade de colonizar com sucesso seu hospedeiro e obter benefícios nutricionais. Os efeitos são moléculas que alteram a estrutura, o metabolismo ou a regulação hormonal da planta conferindo vantagem ao patógeno. Podem ser divididos em enzimas, toxinas e reguladores de crescimento. (TAIZ et al, p. 716, 2017).

2.6 *Beauveria bassiana*

A *Beauveria bassiana* foi um dos primeiros agentes entomopatogênicos utilizado no controle microbiano. Segundo Alves (1998), aproximadamente 80% das doenças tem como agentes etiológicos os fungos, os quais são pertencentes entorno de 90 gêneros e mais de 700 espécies. A grande maioria dos fungos entomopatogênicos já relatados no Brasil, mais de 20 incidem sobre pragas de importância econômica, como a *B.bassiana*, que é amplamente utilizada no controle biológico de insetos (ALVES, 1998).

A *B.bassiana* apresenta uma gama de hospedeiros, particularmente permitindo que ela seja usada contra vetores de doenças humanas e uma ampla gama de praga de insetos. A *B. bassiana* também é um biocatalizador bem conhecido em aplicações químicas e industriais (XIÃO, G. et.al, 2012).

Segundo Xião (2012), a *B. bassiana* é bem conhecido por produzir uma grandiosa variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos e metabólitos secretados envolvidos na patogenicidade e virulência. Análises de sequências expressas, estudos funcionais gênicos e sequencias expressas de *B.bassiana* já identificaram alguns genes envolvidos no desenvolvimento de fungos, virulência, resposta ao estresse do inseto e desintoxicação.

Seu potencial de uso no Manejo Integrado de Pragas vem aumentando gradativamente, devido ao seu largo espectro de ação na colonização de várias espécies de insetos. Este micro-organismo entomopatogênico age sobre seus inimigos naturais, apresentando eficácia e persistência nas práticas agrícolas contra insetos (REIS, 2018). No entanto, os mecanismos de ação no processo de

indução de resistência em plantas e no controle de doenças não foram ainda estudados e descritos na literatura.

4 METODOLOGIA DE PESQUISA

4.1 Local

O experimento foi conduzido no laboratório de Bioquímica e Indução de Resistência, no laboratório de Fitossanidade e na área experimental de Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), campus Dois Vizinhos, entre os meses de Fevereiro e Maio de 2019.

4.2 Tratamentos e Delineamento experimental

Foram desenvolvidos três experimentos sendo o primeiro *in vitro* com cotilédones de soja, para avaliar o potencial de *B.bassiana* e os metabólitos, na ativação de defesa vegetal. O segundo experimento buscou avaliar o potencial no controle de doenças foliares sobre ferrugem asiática e empregou-se a metodologia de folha destacada (FRAC - Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas). O terceiro experimento foi a campo e buscou avaliar os tratamentos no controle de oídio.

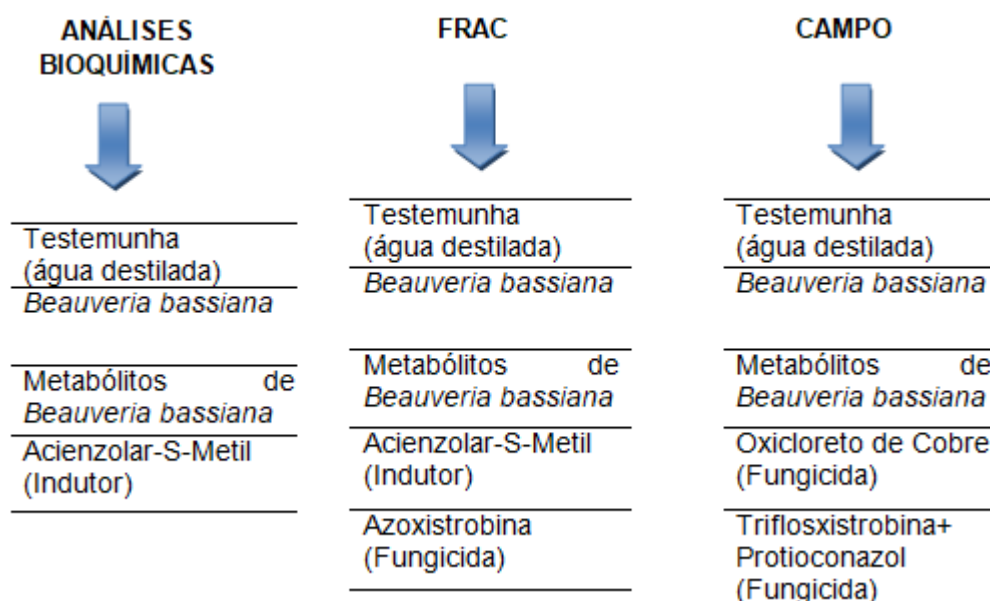
O delineamento experimental de todos os tratamentos foi inteiramente casualizado. Utilizaram-se indutores de resistência e fungicidas para o comparativo com a *B.bassiana*. Na avaliação do potencial de *B.bassiana* e os metabólitos na ativação de defesa vegetal, utilizou-se Acienzolar-S-Metil, na metodologia FRAC usou-se Azoxistrobina e a campo foi utilizado Oxicloreto de Cobre e Trifloxistrobina+Protiocanazol (Fungicidas), como controles positivos. Para o controle negativo utilizou-se a água destilada em todas as metodologias (Figura 1).

O primeiro experimento foi constituído de quatro tratamentos, com cinco repetições para avaliação de fitoalexinas. Os tratamentos foram constituídos por: T1: Testemunha (água) T2: *B.bassiana* T3: metabólitos de *B.bassiana* T4: Acienzolar-S-Metil.

Para o segundo o experimento em folhas destacadas pela metodologia FRAC utilizou-se cinco tratamentos com 8 repetições: T1:Testemunha (água) T2: Acienzolar-S-Metil; T3: *B.bassiana* T4: Metabólitos de *B.bassiana* T5:Azoxistrobina (Fungicida).

O terceiro experimento a campo foi composto por cinco tratamentos, contendo 20 unidades experimentais: T1: Testemunha (água); T2: Metabólitos de *B.bassiana*; T3: *B.Bassiana*; T4: Oxicloreto de Cobre; T5: Trifloxistrobina+Protioconazol (Fungicida).

Figura 1 – Avaliações experimentais realizadas e seus respectivos tratamentos.



Fonte: O autor, (2019).

As concentrações utilizadas para cada tratamento foi padronizada em todas as metodologias. Desta maneira, as concentrações para os fungicidas foram de acordo com as concentrações prescritas para os produtos comercialmente. Para a *B. bassiana* e os metabólitos utilizou-se a concentração de 10 mL de meio líquido em 100 mL de água e a mesma concentração para o tratamento com filtrado de *B.bassiana*. O indutor Acienzolar-S-Metil utilizou-se a concentração 0,005g em 100 mL de água, concentração esta, que é prescrita comercialmente para uso do produto.

4.3 Obtenções dos produtos com potencial de indução

O agente de controle biológico *B. bassiana* foi obtido de produto comercial, sendo verificada a viabilidade, e então repicado em meio de cultura adequado .

Os metabólitos foram obtidos com a técnica de cultivo em meio líquido (Batata e dextrose) e posteriormente tal meio foi filtrado em membrana Millipore (45 micras), sendo utilizado somente o metabólito, e descartando os microrganismos.

Figura 2 – Produto utilizado para o preparo do meio de cultura de *B.bassiana*.



(A) Produto comercial utilizado para obtenção dos tratamentos (*Beauveria bassiana*), **(B)** Obtenção dos metabólitos de *B. bassiana* em meio líquido com membrana milipore. Fonte: O autor, (2019).

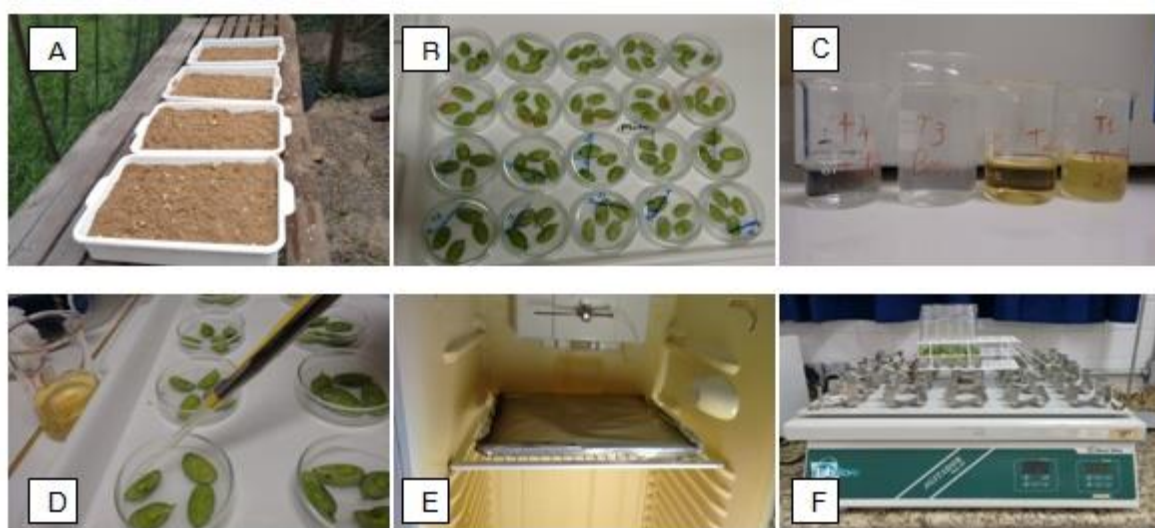
4.4 Primeiro experimento – *In vitro*

As sementes da cultivar BRS282, foram semeadas em bandejas de polipropileno, tendo como substrato areia autoclavada. Após 7 dias, os cotilédones das plântulas foram removidos e lavados em água destilada, pesados e distribuídos em placas de Petri®, contendo papel filtro umedecido com água destilada. Na face abaxial dos cotilédones, foram feitos cortes superficial e sobre esse corte, foram pipetados 40 microlitros da solução dos tratamentos. Após as placas devidamente tampadas e não vedadas, foram mantidas em câmara BOD na temperatura de 26°C, na ausência de luz por 20 horas.

Após 20 horas retiraram-se os cotilédones das placas e foram colocados em tubos contendo 10 mL de água destilada e então estes tubos foram agitados em mesa agitadora por uma hora para a extração de gliceolina, fitoalexina presente na soja.

A solução preparada foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 41 e a absorbância determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 285nm de acordo com a metodologia descrita por Labanca (2002).

Figura 3 – Procedimentos realizados com cotilédones para a determinação de fitoalexinas.



(A) Soja semeada para obtenção dos cotilédones, **(B)** Cotilédones nas placas de Petri **(C)**, Produtos utilizados nos tratamentos, **(D)** Aplicação dos produtos nos cotilédones, **(E)** Experimento reservado em BOD, **(F)** Tubos contendo cotilédones em mesa agitadora. Fonte: O autor, (2019).

4.4.1 Análises bioquímicas

Após determinação de fitoalexinas, utilizou-se os cotilédones para as demais análises bioquímicas. Foi determinado o teor de proteínas totais, compostos fenólicos e atividade da enzima fenilalanina amônia-ase.

4.4.2 Teor de proteínas

Os teores de proteína foram determinados usando o teste proposto por Bradford (1976), com tampão fosfato 0,2 molar (0,2 M), pH 7,5 e reagente Bio-Rad®. Para tal, adicionaram-se 40 µl do sobrenadante do extrato vegetal em tubos de ensaio, 460 µl de água destilada e 1 ml de reagente concentrado de Bradford. A

mistura foi agitada em vórtex, e após 10 minutos realizou-se a leitura de absorbância a 595 nm. A concentração de proteínas de cada amostra foi expressa em μg equivalentes de albumina de soro bovino (ASB), utilizando-se de curva-padrão de concentrações de ASB variando de 0 a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A atividade das enzimas relacionadas à patogênese foi expressa em relação ao conteúdo total de proteínas das amostras.

4.4.3 Atividade de Fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina segundo Kuhn (2007), com algumas adaptações. A mistura da reação, 100 μL do extrato protéico, 400 μL do tampão Tris HCl 25 mM (pH 8,8) e 500 μL de L-fenilalanina (49,6 mg/mL), foi incubada a 40°C por 1h. A reação foi interrompida pela adição de 200 μL de HCl e banho de gelo por 5 minutos.

A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm, as leituras de absorbância foram interpretadas em relação a uma curva padrão elaborada com o ácido *trans*-cinâmico e a atividade enzimática foi expressa em mg de ácido *trans*-cinâmico $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína (RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E. & COELHO, R. S. B, 2006)

4.4.4 Quantificação de Compostos Fenólicos

A quantificação dos fenóis totais deu-se pelo método o qual foi adaptado de Bieleski e Turner (1966) e Jennings (1981). A quantificação foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu-se em pesar 1g de material vegetal (cotilédones), com a trituração em almofariz, adicionando 4mL de solução de metanol, clorofórmio e água (MCA). Posteriormente, adicionado o material em eppendorf para a centrifugação a 20°C por 20 minutos A 6.000 rpm. Logo em seguida, coletado o sobrenadante total. Em seguida, foi realizado uma nova extração do resíduo restante, adionando 4 mL de (MCA), e centrifugado novamente por 20 minutos a 6.000 rpm, adicionado o sobrenadante resultante ao primeiro, obtendo-se o extrato MCA. Nesse extrato foram adicionados 1,5 mL de água

destilada e 1mL de clorofórmio, realizando uma nova centrifugação por 15 minutos à 6.000 rpm para a separação das fases

. As amostras foram preparadas a partir da retirada de uma alíquota de 0,5 mL da parte superior do tubo de extrato MCA, em seguida sendo adicionados 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, mais 0,5 mL de água destilada. Após 15 minutos, adicionou-se 5 mL do reagente alcalino (preparado com carbonato de sódio a 2 % em uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N), aguardando durante 50 minutos para leitura em espectrofotômetro em absorvância de 760 nm. No tratamento controle, foi utilizada água destilada no mesmo volume do extrato vegetal. O resultado obtido foi expresso em mg.g^{-1} de tecido fresco.

4.5 Segundo Experimento - *In vivo*

4.5.1 Eficiência no controle em folhas destacadas

O experimento foi realizado no laboratório de Bioquímica e de Indução, durante o mês de março de 2019, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Dois Vizinhos. Foram coletadas folhas de plantas de soja da cultivar BRS284, cultivadas na área experimental da Universidade, folhas que não apresentavam sintomas aparentes de ataque de patógenos. Neste ensaio avaliaram-se os seguintes tratamentos: testemunha (água destilada), Acinzolar-S-Metil (indutor de resistência) e Azoxytrobium (fungicida), mais o produto alternativo, *B. bassiana* e metabólitos de *B.bassiana*.

Os respectivos tratamentos foram aplicados por imersão das folhas destacadas em água destilada mais os produtos na concentração de 40 μL (Figura 4). Após os tratamentos, os folíolos foram posicionados em placas de petri com a face abaxial voltada para cima, sobre papel filtro umedecido com água destilada. Após 24 horas adicionou-se sobre cada placa de petri com folha sadia, uma folha com presença de ferrugem asiática com a face abaxial para baixo, deixando-a por 24 horas, mantendo sempre a umidade nas placas (Figura 4).

As placas permaneceram fechadas, com manutenção da umidade no papel filtro, até o período das avaliações, as quais foram realizadas com 15 e 20 dias

após a implantação do experimento. Avaliou-se a incidência e a severidade de ferrugem asiática, com o uso de escala diagramática.

Figura 4 – Procedimentos realizados na metodologia (FRAC - Comitê de Ação à Resistência de Fungicidas).



(A) Folhas de soja embebidas nos tratamentos, (B) Folhas distribuídas nas placas de petri para verificação de doença, (C) Aplicação de folhas doentes sobre folhas saudáveis. Fonte: O autor, (2019).

4.5.2 Eficiência no controle em Oídio a campo

O experimento foi realizado entre os meses de março e abril de 2019, em condições de campo, na área experimental de Fitopatologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos-PR, área em que a cultura da soja apresentava alta severidade de Oídio (Figura 5).

O desenvolvimento de Oídio na soja é favorecido por temperaturas entre 20 °C, com umidade relativa do ar em torno de 50 a 90%, quando as plantas de soja encontram-se entre os estágios R1 e R2 (florescimento) e R6 (formação da semente) (BLUM, et.al, p. 206, 2002).

Figura 5 - Área experimental da cultura da soja utilizada para análises a campo.



(A) Área de implantação do experimento, (B) Plantas com severidade de doença. Fonte: o autor, (2019).

Para avaliação de eficiência sob Oídio a campo, selecionaram-se folhas de plantas de soja ao acaso no estágio R6, com alta severidade da doença, aplicando

os respectivos tratamentos sobre a face adaxial das folhas, utilizando um molde foliar (Figura 6).

Os tratamentos constituíram-se em testemunha (água), *B. bassiana* (100 ml/L), metabólitos de *B.bassiana* (100 ml/L), Oxicloreto de Cobre (1L há⁻¹) e Trifloxistrobina+Protioconazol (1L há⁻¹), os quais foram diluídos em água destilada nas suas respectivas concentrações. A aplicação foi realizada manualmente por pulverização durante o período da manhã.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com 20 repetições, sendo cada repetição constituída por uma folha (Figura 6).

Figura 6 – Demarcações de folhas de soja para a aplicação dos tratamentos.



(A) Folhas com severidade de doença, **(B)** Marcação das folhas para aplicação **(C)** Molde para aplicação dos produtos em teste. Fonte: O autor, (2019).

As avaliações de severidade da doença ocorreram após quinze dias da aplicação, onde as folhas identificadas foram coletadas e levadas ao laboratório para serem analisadas, quanto à severidade da doença na área aplicada e demarcada pelo molde foliar.

5. RESULTADOS

Os resultados foram tabulados, avaliados quanto à normalidade e realizado a análise de variância (ANOVA). Se significativo aplicado o teste de comparação de médias (Duncan a 5% de probabilidade) com o software Rbio.

5.1 Indução de resistência

5.1.1 Ativação de Fitoalexinas em soja

Os resultados observados do bioensaio a base de *Beauveria bassiana* e filtrados de *B. bassiana* obteve resultados significativos na ativação de fitoalexinas em cotilédones de soja (Tabela 1). Os tratamentos do controle negativo a base de água e Acienzolar-S-Metil, não apresentaram resultados relevantes na atividade de fitoalexinas em relação ao fungo.

Observou-se uma relação maior de concentração de gliceolinas nos tratamentos a base de *B.bassiana*, apresentando capacidade de defesa e indução de resistência, ativando a rota metabólica, sendo que o próprio indutor de resistência e a testemunha não elevaram a expressão na defesa das plantas.

A atividade de fitoalexinas foi avaliada com base na diferença de absorvância e sua relação com a massa dos cotilédones.

Tabela 1. Ativação de fitoalexinas gliceolinas em cotilédones de soja por *B.bassiana* e metabólitos, Dois Vizinhos, 2019.

TRATAMENTOS	Fitoalexinas (Abs 285 nm/massa)
<i>B.bassiana</i>	0,77 a
Filtrados de <i>B.bassiana</i>	0,56 b
Testemunha	0,11 c
Acienzolar-S-Metil	0,08 c
CV =	20,79%

**Medidas com letras iguais não diferem consideravelmente entre sipelo teste de Duncan a 5% probabilidade do erro. Fonte: O autor (2019).

As fitoalexinas são produzidas e sintetizadas pela planta, ativando a rota de defesa. Com o acúmulo de metabólitos secundários, devido à atividade antimicrobiana ocorre a chamada “barreira química de defesa” das plantas em resposta as interações com patógenos, relacionada ao estresse ocasionado, sendo ele biológico, químico ou físico, que permitem a ativação de moléculas elicitoras (SMITH, 1996).

Os microorganismos possuem mecanismos patogênicos potentes. Muitos patógenos mostram um fenótipo virulento. Nesse sentido, o acúmulo de fitoalexinas pode ser considerado um sistema estímulo-resposta da planta (SMITH, 1996),

como componente de resistência em resposta ao fungo entomopatogênico, *B. bassiana*.

Os indutores de resistência atuam de diferentes maneiras, no entanto, levando sempre à ativação do sistema de defesa da planta. Dentre os principais indutores utilizados no mercado atualmente, destaca-se o Acibenzolar-S-Metil. (RODRIGUES et.al., 2006), o qual não diferiu da testemunha em relação ao potencial de ativação de fitoalexinas. Tal indutor não é utilizado comercialmente na cultura da soja, mas vem sendo utilizado como indutor de referencia em diversos estudos.

A quantidade de fitoalexinas sintetizadas em uma interação são determinadas pelo genótipo da planta, quanto à virulência do patógeno. Condições experimentais e ambientais também são fatores que podem intervir nas concentrações de gliceolinas que foram sintetizadas pela planta (SMITH, 1996).

5.1.2 Atividade Fenilalanina amônia-liase

Ao realizar a avaliação da atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL), enzima chave do metabolismo secundário das plantas, foi possível notar que *B.bassiana* apresentou maior potencial de ativação da enzima, mas não diferiu da testemunha e do uso de metabólitos, apresentando diferença significativa somente do ASM. (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da enzima Fenilalanina amônia-liase em cotilédones de soja tratados com *B.bassiana* Dois Vizinhos, 2019.

TRATAMENTOS	Fenilalaniana Amônia-liase (FAL) (290 nm)(mg.g.proteína)
<i>B.bassiana</i>	0,014 a
Metabólitos de <i>B.bassiana</i>	0,012 ab
Testemunha	0,013 ab
Acienzolar-S-Metil	0,011 b
CV=	12,97%

**Medidas com letras iguais não diferem consideravelmente entre si pelo teste de Duncan a 5% probabilidade do erro. Fonte: O autor (2019).

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL), está associada com a defesa das plantas, ou seja, com a resistência das plantas, especificamente, por estar

incluída na primeira etapa da biossíntese dos fenilpropanóides, compostos orgânicos que estabelecem a conversão da L-Fenilalanina em ácido-transcinâmico (RODRIGUES, A.A.C; BEZERRA, N. E & COELHO, R.S.B, 2006).

O ácido trans-cinâmico pode incorporar-se em diferentes compostos fenólicos, em que estão presentes nas formações de flavonóides, ésteres e ligninas. Estes compostos fenólicos são sinalizadores na respostas de defesa das plantas contra estresses ocasionados. (STANGARLIN et al., 2011). De acordo com Fernandes et. al, bactérias, vírus e fungos são capazes de ativar a Resistência adquirida (SAR) das plantas, possibilitando a ativação dessas enzimas chaves de defesa.

5.1.3 Quantificação de Compostos Fenólicos

Conforme a tabela 3 pode-se observar que os teores de compostos fenólicos nos tratamentos com *B.bassiana* apresentaram valores mais elevados e diferiram em relação à testemunha e o indutor. A maioria dos compostos fenólicos é dependente da biossíntese da enzima Fenilalanina amônia-liase (FAL) que é sintetizada a partir do fosfoenolpiruvato e da eritrose 4-fosfato, mediante uma série de reações que constituem a via do ShiKimato/Arogenato (FERNANDES et. al., 2009)

Tabela 3 - Avaliação de compostos fenólicos no processo de indução de resistência em plantas de soja. Dois Vizinhos, 2019.

TRATAMENTOS	Compostos Fenólicos (Abs 760 nm/massa)
<i>B.bassiana</i>	2,12 a
Metabólitos de <i>B.bassiana</i>	1,93 ab
Testemunha	1,80 b
Acienzolar-S-Metil	1,75 b
CV=	10,24%

**Medidas com letras iguais não diferem consideravelmente entre si pelo teste de Duncan 5% probabilidade erro. Fonte: O autor (2019).

O acúmulo dos compostos fenólicos envolve a polimerização e oxidação do local da infecção causada pelo patógeno na planta, bloqueando seu

desenvolvimento. Essa limitação induz a formação de lignina a partir dos fenóis que sofrem ação do peróxido de hidrogênio e a polimerização (STRACK, 1997). A lignina formada e acumulada reforça a parede celular, o que permite formar uma barreira que impede a ação de toxinas do patógeno. Esse processo possibilita o aumento da resistência na planta (STRACK, 1997).

5.1.4 Proteínas Totais

No ensaio conduzido para a avaliação de proteínas verificou-se que a testemunha apresentou os menores valores, não diferindo de *B.bassiana*. Entretanto, pode ser observado que os metabólitos de *B.bassiana* apresentaram diferença significativa da testemunha, equiparando-se ao indutor comercial, resposta positiva do ponto de vista do controle biológico.

Tabela 4 - Avaliação do teor de proteínas no processo de defesa das plantas sobre efeitos de *B.bassiana*. Dois Vizinhos, 2019.

TRATAMENTOS	Proteínas (Abs 595 nm/massa)
<i>B.bassiana</i>	9,47 ab
Metabólitos de <i>B.bassiana</i>	10,12 a
Testemunha	8,33 b
Acienzolar-S-Metil	10,32 a
CV=	12,52%

**Medidas com letras iguais não diferem consideravelmente entre si pelo teste de Duncan a 5% probabilidade do erro. Fonte: O autor (2019).

Entre as proteínas que podem ser ativadas pelos indutores encontram-se as hidrolases β -1,3 Glucanase e Quitinase, estas, propiciam a desorganização da parede celular dos patógenos envolvidos. A enzima fenilalanina e amônia-liase (FAL) e as peroxidases que estão ligadas diretamente com a lignificação da parede celular (RODRIGUES, 2003).

Na defesa pré-formada, as plantas sintetizam proteínas, peptídeos e metabolitos secundários que impedem a infecção por patógenos (RIZZARDI, 2003). As proteínas são aminoácidos precursores relacionados à defesa, no entanto a atividade de proteínas não foi significativa da testemunha, ou seja, a

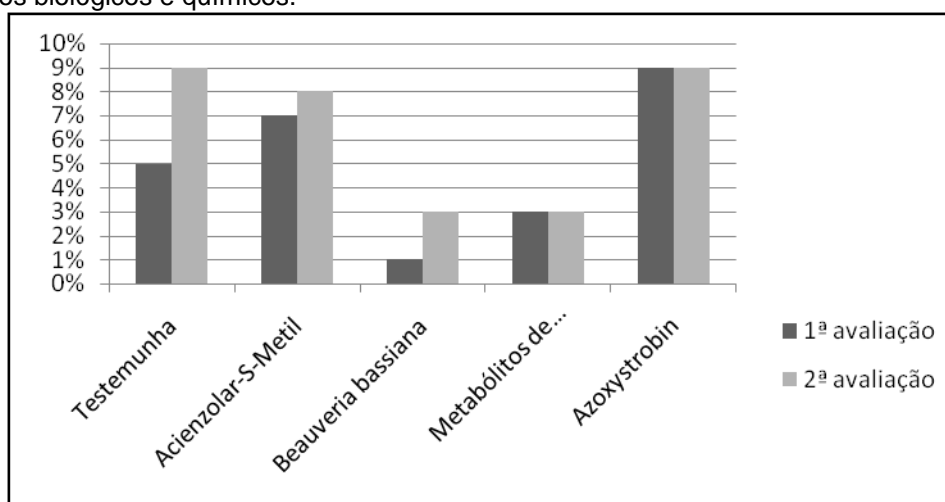
ativação de mecanismos de defesas da plantas não foram eficientes em relação a patogenicidade dos tratamentos utilizados.

5.2 Efeitos sobre folhas destacadas

Os tratamentos que foram utilizados a base *B.bassiana* e metabólitos foram inferiores quando comparados com a testemunha e o fungicida, e também não apresentaram resultados significativos na efetividade do controle de ferrugem asiática, sendo que ambos os tratamentos não inibiram o desenvolvimento da doença inoculada.

Os dados considerados nas avaliações (Figura 7) foram obtidos a partir da escala diagramática, realizando as médias de severidade em seguida, verificando a severidade da doença sobre os produtos aplicados, em que testemunha apresentou entre 5 e 9%, a *B. bassiana* e metabólitos variou 1 e 3% enquanto o fungicida foi de 9%, Observando que a doença se desenvolveu sobre os cinco tratamentos, inclusive no tratamento com fungicida Azoxystrobin.

Figura 7 – Severidade de Ferrugem Asiática (%) em folhas destacadas de soja, submetidas a tratamentos biológicos e químicos.



Fonte: o autor, (2019).

5.3 Avaliações do efeito sobre Oídio a Campo

No ensaio a campo não foi possível observar diferença entre os tratamentos químicos e biológicos utilizados, sendo que ambos não apresentaram redução significativa na severidade de Oídio. Os resultados obtidos demonstram que a *B. bassiana*, e os metabolitos de *B. bassiana* não apresentam potencial de controle de doenças foliares na cultura da soja, apresentando severidade média de 20%.

De acordo com Pereira, et.al (2008), o Oídio, doença esta, causada pelo fungo (*Microsphaera diffusa* (Cook & Peck) U. Braun & S. Takamatsu), apresenta capacidade de desenvolvimento em toda parte aérea da planta de soja, desde as hastes, vagens, pecíolos, até as folhas, manifestando-se sintomas pulverulentos, ou seja, produzindo massa seca de esporos, com pontos brancos que evoluem sob toda parte área da planta. Nesse sentido, os resultados observados, tendo em vista que, para avaliação de eficiência sob Oídio, selecionaram-se folhas de plantas de soja ao acaso com alta severidade da doença, podem ter apresentado efeitos insignificantes, dado que a doença encontrava-se sobre toda a planta, não permitindo a ação das doses submetidas no local.

6 CONCLUSÕES

Os resultados observados indicaram que a *B.bassiana* e metabólitos induzem a resistência em plantas de soja, ativando a enzima FAL, a síntese de fitoalexinas e compostos fenólicos. No entanto, não tem potencial de controlar as doenças foliares ferrugem e oídio.

Pesquisas como essas podem auxiliar em novos trabalhos, na busca da redução de impactos ambientais causados por produtos químicos, considerando os métodos de controle alternativos.

REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. **Controle microbiano de insetos**. 2. Ed. Piracicaba: FEALQ, p. 312-314, 1998.

AQUINO L.A et al. Controle alternativo da mancha de *Ramularia* do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, 2008, v.34, n.2, p.131-136. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/250049037_Control_e_alternativo_da_mancha_de_Ramularia_do_algodoeiro>. Acesso em: 18 set. 2018.

BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra Fitopatógenos. Uberlândia: **Review Article**. 2010, v.26. n. 2, p. 231. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7071/4684>>. Acesso em: 21 set. 2018.

BERNARDES, F. S. et. al. **Rizobactérias na Indução de Resistência Sistêmica em Cultivos Hidropônicos**. 58 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico, Campinas, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052010000200002&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 27 fev. 2019.

BETTIOL, W, MORANDI, M, A, B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: Bettiol, W & Ghini, 2003) Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna. **Embrapa Meio Ambiente**: 2009. p. 7-14. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/144180/1/2009CL-07.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

BETTIOL, W; GUINI, R. **Proteção de plantas na agricultura sustentável** / eds. Sami Jorge Michereff, Reginaldo Barros. – Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 2001. p.01-02. Disponível em: <<http://hm-jbb.ibict.br/bitstream/1/597/1/2001%20Prote%C3%A7%C3%A3o%20de%20plantas.pdf#page=10>>. Acesso em: 18 set. 2018.

BIELESKI, R.L; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, Orlando:1966. v.17, p.278-293.

BLUM, L.E.B., REIS, E.F., PRADE, A.G; TAVELA, V.J. Fungicidas e mistura de fungicidas no controle do oídio da soja. **Fitopatologia Brasileira** 216 - 218, mar-abr, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v27n2/9148.pdf>> Acesso em: 15 mai. 2019

CAMATTI-SARTORI, V.; MAGRINI, F. E.; CRIPPA, L. B.; MARCHETT, C.; VENTURIN, L.; SILVA-RIBEIRO, R. T. Avaliação in vitro de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos em flores. *Rev. Bras. de Agroecologia*, v. 6, n. 2, p. 117-122, 2011. Disponível em: <http://orgprints.org/23077/1/Camatti-Sartori_Avalia%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em 25 fev. 2019.

CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. **Embrapa Meio Ambiente**. 2003. p. 17-28. Disponível em:
<<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/11706/1/CampanholaMetodos.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2018.

CARVALHO, N.L. **Resistência genética induzida em plantas cultivadas**. Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET), v. 7, n. 7, p. 1379-1390, 2012. Disponível em:
<<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/5930/3603>>. Acesso em: 14 out. 2018.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agência Embrapa de informação tecnológica. **Doenças da soja**. Disponível em:
<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_97_271020069133.html>. Acesso em: 02 nov. 2018.

FERNANDES et. al., Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos: Resistência sistêmica adquirida (SAR). Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, 2009. Disponível em:
<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/710939/1/133fitopatogenos.pdf;Mecanismos>>. Acesso em 27 abr. 2019.

GOMES, M. A. F; BARIZON, R. R. M. Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, SP. P. 10-11, 2014. Disponível em:
<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/987245/1/Doc98.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

GOMES, E. C. de S.; PEREZ, J. O.; BARBOSA, J. Resistência induzida como componente de manejo de doenças da videira. Engenharia Ambiental, v. 6, n. 2, p. 114-120, 2009.

GARCIA, R.A.; JULIATTI, F.C.; BARBOSA, K.A.G.; CASSEMIRO, T.A. **Atividade antifúngica de óleo e extratos vegetais sobre Sclerotiniasclerotiorum**. BioscienceJournal, v. 28, n. 1, p. 48-57, 2012. Disponível em:
<<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/viewFile/8174/8232>>. Acesso em : 02 nov. 2018.

GODOY, C.V. et.al. **Boas práticas para o enfrentamento da ferrugem-asiática da soja**. Londrina, PR: EMBRAPA Soja, 2017. p. 6, Embrapa Soja. Disponível em:
<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1074899>> Acesso em 15 mai. 2019.

GUIMARÃES, S.S; MAZARO, S. M; FREDDO, A. R; WAGNER JUNIOR, A. **Potencial de preparos de cavalinha (Equisetum SP.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (Glycine Max L.) e o efeito sobre o crescimento de Rhizoctoniasolani Kuhn, in vitro**. Revista Brás. Plantas med: Botucatu. Jan/Mar. 2015 v. 17. n 1 Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722015000100143>. Acesso em 8 nov. 2018.

HIRAKURI, M.H.; LAZAROTTO, J.J. **Evolução e perspectiva de desempenho econômico associados com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 11-12. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/887037/1/Doc3192ED1.pdf>> . Acesso em: 02 nov. 2018.

JENNINGS, A.C. The determination al dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analitycal Biochemistry**, Orlando, v.118, p.396-398, 1991.

MAZARO, S. M. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja em resposta a derivados de folhas de pitangueira **Ciência Rural**, vol. 38, n. 7, 2008, p. 1824-1829, Universidade Federal de Santa Maria Santa Maria, Brasil. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/html/331/33115801004/>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

MORAES, J. C; FERREIRA, R. S; COSTA, R. R. **Indutores de resistência à mosca-brancabemisiatabaci biótipo b (genn., 1889) (Hemiptera: aleyrodidae) em soja**. Ciênc. Agrotec: Lavras, set./out., 2009 v. 33, n. 5, p. 1260-1264. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v33n5/v33n5a09>>. Acesso em: 03 out. 2018.

MORAES, W. B. C. **Controle Alternativo de Fitopatógeno**. Brasília: EMBRAPA.S/N, p. abril. p. 1992. p. 175-176. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/AI-SEDE/20654/1/pab16_abresp_92.pdf>. Acesso em: 19 set. 2018.

MORAGAS, W.M; SCHNEIDER, M.O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico. **Caminhos da geografia**, 2003, p.26-27, Instituto de Geografia UFU. Disponível em: <http://www.ig.ufu.br/caminhos_de_geografia.html> Acesso em: 20 ago. 2018.

PELAEZ, V. & TERRA, F. H. B & SILVA, L.R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder do mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, v. 36, n. 1 (ano 34), p. 27-48, jan./abr. 2010. Editora UFPR. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/economia/article/view/20523>> Acesso em: 07 ago. 2018.

PEREIRA, D. G, et.al. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de soja avaliados para a resistência ao Oídio. **Ciência Rural**, Santa Maria. V.38, n.7, p. 1836 -1842, out., 2008. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/html/331/33115801006/>> Acesso em: 05 mai. 2019.

REIS, T.C. **Controle biológico com os fungos entomopatogênicos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* e suas interações com *Palmistichus elaeisis* e glifosato**. Tese (Doutorado) Diamantina, 2018. Disponível em: <<http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/1897>> Acesso em: 18 jun 2019

RIZZARDI, M. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; BALBINOT JR, A. A. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 957- 965, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v33n5/17146.pdf>>. Acesso em: 30 abr. 2019.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E. & COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fuzariumoxysporum* f. SP. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, 492-499. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/fb/v31n5/09.pdf>> Acesso em: 01 mai. 2019.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABRASTECIMENTO. DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL (SEAB). **Soja – Análise da conjuntura agropecuária**, Perspectivas da cultura da Soja para 2018.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABRASTECIMENTO. DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL (SEAB). **Soja – Análise da conjuntura agropecuária**, Perspectivas da cultura da Soja para 2019.

SILVA, P.J.T. **Indução de Fitoalexinas Gliceolinas em cotilédones de soja por Filtrados de *Phytophthora* spp.** Tecnologia em Biotecnologia, Palotina, p. 7, 2013. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/35142/INDUCAO_DE_FITOALEXINA_GLICEOLINA_EM_COTILEDONES_DE_SOJA_POR_FILTRADOS_DE_Phytophthora_spp..pdf?sequence=1&isAllowed=y> Acesso em: 23 fev. 2019.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **New phytologist**, v. 132, n. 1, p. 1-45, 1996. DOI: <<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04506.x>> Disponível em: <<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1469-8137.1996.tb04506.x>> Acesso em: 28 abr. 2019.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWANESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46, 2011.

STRACK, D. Phenolic metabolism. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Plant biochemistry**. London: Academic Press, 1997. cap.10, p.387-416.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal: Interações Bióticas**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p.715-716.

VENZON, M; ROSADO, M. C; PINTO, C.M.F; DUARTE, V.S, EUZÉBIO, D. E; PALLINI, A. Potencial de defensivos alternativos para o controle do ácaro branco em pimenta “Malagueta”. **Horticultura Brasileira**, v. 24, n. 2, abr/jun. 2006, p. 224.

XIÃO, G. et.al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, 2012. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep00483>> Acesso em 17 jun 2019.

YORINORI, J. T.; LAZZAROTTO, J. J. **Situação da ferrugem asiática da soja no Brasil e na América do Sul**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/soja/busca-de-publicacoes/-/publicacao/467964/situacao-da-ferrugem-asiatica-da-soja-no-brasil-e-na-america-do-sul>> Acesso em: 15 mai. 2019.