



AMANDA FLAUSINO DE FARIA

**ÁCIDO 3-METILBUTANÓICO E ÁCIDO 2-
METILBUTANÓICO EMITIDOS POR *Bacillus spp.* INIBEM O
CRESCIMENTO DE (*Colletotrichum lindemuthianum*)**

**LAVRAS - MG
2018**

AMANDA FLAUSINO DE FARIA

**ÁCIDO 3-METILBUTANÓICO E ÁCIDO 2-METILBUTANÓICO EMITIDOS POR
Bacillus spp. INIBEM O CRESCIMENTO DE (*Colletotrichum lindemuthianum*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof^o Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

de Faria, Amanda Flausino.

Ácido 3-metilbutanóico e ácido 2-metilbutanóico emitidos por *Bacillus spp.* inibem o crescimento de (*Colletotrichum lindemuthianum*) : 3-methylbutanoic acid and 2-methylbutanoic acid produced by *Bacillus spp.* inhibit the growth of (*Colletotrichum lindemuthianum*) / Amanda Flausino de Faria. - 2018.

39 p. : il.

Orientador(a): Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros.

Coorientador(a): Vicente de Paulo Campos, Marcio Pozzobon Pedroso, Júlio Carlos Pereira da Silva.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

AMANDA FLAUSINO DE FARIA

**ÁCIDO 3-METILBUTANÓICO E ÁCIDO 2-METILBUTANÓICO EMITIDOS POR
Bacillus spp. INIBEM O CRESCIMENTO DE (*Colletotrichum lindemuthianum*)**

**3-METHYLBUTANOIC ACID AND 2-METHYLBUTANOIC ACID PRODUCED BY
Bacillus spp. INHIBIT THE GROWTH OF (*Colletotrichum lindemuthianum*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 12 de dezembro de 2018.

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Dr. Vicente de Paulo Campos
Dr. Marcio Pozzobon Pedroso
Dr. Júlio Carlos Pereira da Silva

UFLA
UFLA
UFLA
UFLA

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

*À DEUS primeiramente,
À minha família,
em especial, minhas amadas, mãe Sônia e irmã Rafaela.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão, primeiramente, a Deus, por estar comigo em todos os momentos, iluminando e guiando-me nas horas mais difíceis.

Aos meus pais José Mauricio e Sônia, minha irmã Rafaela e todos os familiares, agradeço, especialmente, por me apoiarem, incentivarem e acreditarem nas minhas escolhas.

Ao professor Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, que me possibilitou aprendizagens únicas, agradeço pela paciência, dedicação, ensinamentos, confiança e orientação que me foram concedidas.

Aos amigos da turma de mestrado 2017-1 do programa de pós-graduação em Fitopatologia e, também, do Laboratório de Controle Biológico da UFLA, obrigado pelos momentos de convivência, trabalhos e distrações.

A República Pira-Saia e ao amigo Fabiano, agradeço o acolhimento, a amizade, as boas conversas e momentos que se enraizaram desde o primeiro momento que cheguei em Lavras.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Fitopatologia (DFP) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Enfim, a todos que compartilharam comigo deste sonho, contribuindo e auxiliando direta ou indiretamente para que eu pudesse alcançá-lo, **muito obrigado.**

RESUMO

As medidas de manejo mais empregadas à Antracnose no feijoeiro, são relacionadas ao uso de cultivares resistentes e fungicidas. Entretanto, quando as práticas são aplicadas de maneira individual, exercem pressão de seleção e podem ocasionar a quebra de resistência de cultivares. Diante dessa problemática, torna-se necessário o desenvolvimento de medidas alternativas de controle para o manejo dessa doença. A atividade antimicrobiana dos compostos orgânicos voláteis, foi comprovada em diversos estudos *in vitro*, apresentando efeito sob diferentes patógenos. Neste contexto, o uso das moléculas produzidas por rizobactérias pode tornar-se uma técnica promissora para o controle de *Colletotrichum lindemuthianum*. Objetivou-se avaliar *in vivo* as moléculas voláteis emitidas por *Bacillus amyloлицefaciens* ALB629 e UFLA285 sob *Colletotrichum lindemuthianum*, assim como identificar as moléculas por micro extração em fase sólida (SPME) acoplada a cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa (GC-MS), como também avaliar o efeito *in vitro* das moléculas identificadas. O ensaio *in vivo* foi realizado com plantas de feijão cv. (Pérola) em vasos recobertos com sacos plásticos. As plantas foram expostas às moléculas voláteis por 72h, posteriormente, a suspensão de *Colletotrichum lindemuthianum* foi aplicada na parte aérea das plantas avaliadas semanalmente quanto à severidade da doença, de acordo com a escala de notas de Godoy. A identificação dos voláteis foi realizada a partir das bactérias por SPME-GC/MS. Os ensaios *in vitro* foram realizados em placas sobrepostas. No primeiro ensaio, o disco de micélio de *C. lindemuthianum* foi adicionado e simultaneamente 10 µL de cada molécula pura individual e em combinação dupla e tripla em disco de papel filtro, inserido ao vértice oposto da placa ao patógeno. O desenvolvimento micelial foi avaliado ao 11 dia após o plaqueamento. No segundo, *C. lindemuthianum* foi crescido em meio Batata dextrose ágar à 21°C durante 4 dias. Ao quarto dia foi medido o diâmetro do patógeno e adicionado 10 µL de cada molécula pura individual e em combinação de duas a duas e tripla. Diariamente, o crescimento micelial do patógeno foi avaliado, até o 7 (dap). Os resultados encontrados no teste *in vivo* reduziram em (79-85%) a severidade da Antracnose em respectivamente. A SPME-GC/MS identificou as moléculas, 3-hidroxi-2-butanona, ácido 3-metilbutanóico e ácido 2-metilbutanóico. Foi observada a inibição do crescimento fúngico para todos os tratamentos durante 11(DAP), exceto para a 3-hidroxi-2-butanona, quando avaliada individualmente. Entretanto, o ácido 3-metilbutanóico e ácido 2-metilbutanóico, isoladamente ou combinados, apresentaram controle de até 94% e 71%, em ambos ensaios respectivamente. Resultado também verificado no controle positivo *B. amyloлицefaciens* 629, a inibição de 93% no primeiro ensaio e 63%. As moléculas com atividade tóxica direta a *C. lindemuthianum* e com potencial capacidade para controlar a antracnose em feijoeiro representarão uma nova opção de manejo da doença, por exemplo, para erradicação do patógeno associado à semente em uma forma de expurgo.

Palavras-chave: *Rhizobacterias*; Antracnose; Biocontrole. COVs.

ABSTRACT

The management control most used to anthracnose in common bean are related to the use of resistant cultivars and fungicides. However, when the practices are applied individually, they exert selection pressure and may cause the resistance of the cultivars to be broken. In view of this problem, it is necessary to develop alternative control measures for the management of this disease. The antimicrobial activity of the COVs, has been proven in several *in vitro* studies, showing effect under different pathogens. In this context, the use of the molecules produced by rhizobacteria, may become a promising technique for the control of *Colletotrichum lindemuthianum*. The objective of this study was to evaluate *in vivo* the volatile molecules emitted by *Bacillus amyloлицefaciens* ALB629 and UFLA285 against *Colletotrichum lindemuthianum*, as well as to identify the molecules by solid phase microextraction (SPME) coupled to gas chromatography with mass spectrometry detection (GC-MS), as well as to evaluate the *in vitro* effect of the molecules identified. The *in vivo* assay was performed with cv. (*Pérola*) in pots covered with plastic bags. The plants were exposed to volatile molecules for 72 h, later *Colletotrichum lindemuthianum* suspension was applied to the aerial part of the plants, evaluated weekly for the severity of the disease, according to Godoy's scale. The identification of the volatiles was performed from the bacteria by SPME-GC / MS. *In vitro* assays were performed on overlapping plates. In the first assay, the *C. lindemuthianum* mycelial disc was added simultaneously to 10 µL of each individual pure molecule and in double and triple combination on filter paper disk, inserted at the opposite apex of the plaque to the pathogen. Mycelial development was evaluated at 11 days after plating. In the second, *C. lindemuthianum* was grown in Potato dextrose agar medium at 21 ° C for 4 days. On the fourth day the diameter of the pathogen was measured and 10 µL of each individual pure molecule was added and in combination of two and two and triple. Daily, the mycelial growth of the pathogen was evaluated until 7 (dap). The results found in the *in vivo* test reduced in (79-85%) the severity of Anthracnose in respectively. SPME-GC/MS identified the molecules, 3-hydroxy-2-butanone, 3-methylbutanoic acid and 2-methylbutanoic acid. Inhibition of fungal growth for all treatments over 11 (DAP), except for 3-hydroxy-2-butanone, when evaluated individually, was observed. However, 3-methylbutanoic acid and 2-methylbutanoic acid, alone or in combination, showed up to 94% and 71% control, respectively. Result also found in the positive control *B. amyloлицefaciens* 629, inhibition of 93% in the first assay and 63%. The molecules with direct toxic activity to *C. lindemuthianum* and with potential ability to control anthracnose in common bean will represent a new option of disease management, for example, to eradicate the pathogen associated with the seed in a purge form.

Key words: Rhizobacteria; Anthracnose; Biocontrol. COVs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo do desenvolvimento da Antracnose	14
Figura 2 - Metodologia de placas sobrepostas	22
Figura 3 - Teste in vivo do efeito dos COVs sob <i>C. lindemutianum</i>	25
Tabela 1 - Identificação das moléculas voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).....	27
Figura 4 - Boxplot para o efeito das moléculas ácido 2-metilbutanoico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o desenvolvimento inicial do patógeno, avaliado ao 11(dap).....	28
Figura 5 - Boxplot para o efeito do ácido 2-metilbutanóico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanóico patógeno estabelecido ao 7 (dap).....	30
Figura 6 - Resultado da inibição do crescimento micelial do patógeno <i>C. lindemutianum</i> ao 11 (dap).....	29
Figura 7 - Resultado da inibição do crescimento micelial do patógeno <i>C. lindemutianum</i> ao 7 (dap).....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Antracnose no feijoeiro	13
2.2 A produção e a diversidade de compostos voláteis emitidos por microorganismos	15
2.3 Moléculas voláteis como mediadoras de interações microorganismo-microorganismo e microorganismo-planta.....	16
2.4 Compostos voláteis e o potencial de exploração prática dos COVs contra patógenos	18
3. OBJETIVO	20
4. MATERIAS E MÉTODOS	21
4.1 Obtenção dos isolados <i>C. lindemutianum</i> e <i>Bacillus</i> ALB629 e UFLA285	21
4.2 Teste <i>in vivo</i>	21
4.3 Identificação de moléculas voláteis	22
4.4. Adaptação da metodologia de placas sobrepostas e utilização de moléculas puras para detecção de mecanismos de ação	22
4.5 ácido 2-metil butanóico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o desenvolvimento inicial do patógeno	23
4.6 Efeito das moléculas ácido 2-metil butanóico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o patógeno estabelecido	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 Teste <i>in vivo</i>	25
5.2 Identificação de moléculas voláteis	26
5.3 Adaptação da metodologia de placas sobrepostas e utilização de moléculas puras para detecção de mecanismos de ação	27
5.4 Bloxpot para o efeito das moléculas ácido 2-metil butanoico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o desenvolvimento inicial do patógeno ao 11(dap).....	29
5.5 Bloxpot para o efeito de ácido 2-metil butanóico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob <i>C. lindemutianum</i> ao 7 (dap).....	29
6 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro possui um papel econômico importante na agricultura mundial, principalmente no cenário nacional. Na safra 2018/2019, a área plantada no Brasil está estimada em 1.533,9 mil hectares resultando em uma produção de 791,0 mil toneladas de grãos de feijão (CONAB, 2018).

A presença de sementes infectadas pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* agente causal da Antracnose, quando utilizadas no plantio é um fator limitante à produção da cultura do feijoeiro. Sob condições favoráveis ao desenvolvimento da doença, ocasionam perdas que chegam à 90% na lavoura. Além disso, as sementes contaminadas são relatadas como a principal forma de disseminação do patógeno à longas distâncias. (GILLARD; RANATUNGA, 2013).

O *Colletotrichum lindemuthianum* possui alta variabilidade genética e capacidade de sobreviver em restos culturais, o que torna seu controle ainda mais desafiador. As medidas de manejo mais empregadas são relacionadas ao uso de cultivares resistentes e controle químico. Entretanto, quando as práticas são aplicadas de maneira individual, exercem pressão de seleção e podem ocasionar a quebra de resistência da maioria das cultivares (MELOTTO; BALARDIN; KELLY, 2000).

Diante do exposto, torna-se necessário o desenvolvimento de medidas alternativas de controle para o manejo da Antracnose. Os compostos voláteis orgânicos apresentam baixo peso molecular e possuem em sua composição derivados de ácidos graxos como terpenóides e fenilpropanóides, que podem desempenhar sinais de comunicação inter e intra-organismos em geral (GOFF et al., 2002; LI et al., 2018). A atividade antimicrobiana dessas moléculas foi comprovada em diversos estudos *in vitro*, apresentando efeito sob diferentes patógenos (LIARZI et al., 2016).

Alguns fatores influenciam diretamente na produção das moléculas voláteis, entre eles, os mais relatados na literatura são as espécies dos microorganismos, a disponibilidade nutricional do meio de cultura, pH e também a oferta de oxigênio (ROMOLI et al., 2014).

Devida a capacidade de alguns microorganismos produzirem uma diversidade de compostos orgânicos voláteis são empregados como modelos de estudo para a prospecção de compostos. Dentre os microorganismos fúngicos, *Muscodor albus* é comumente utilizado como modelo para estudo de COVs. Dentre as bactérias, o gênero *Bacillus* é estudado pela capacidade de muitas estirpes produzirem diferentes COVs. (HUTCHINGS et al., 2017; YUAN et al., 2012).

O avanço do conhecimento dos compostos orgânicos voláteis é atualmente evidenciado pelo desenvolvimento de técnicas de bioprospecção eficientes, assim como também de metodologias de avaliação do potencial de utilização desses compostos (MORATH et al., 2012). Diferentes metodologias são utilizadas para avaliar o efeito dos COVs contra diferentes fitopatógenos.

Para a análise do efeito de moléculas voláteis *in vitro* as técnicas mais empregadas são as placas bipartidas e placas sobrepostas (TAPWAL et al., 2011; MERCIER et al., 2007). Para testes *in vivo*, são relatadas a utilização dessas moléculas pelo processo de biofumigação em diferentes plantas na pós colheita (BERTOLINI et al., 2017). Desta forma, objetivou-se nesse estudo verificar o efeito dos compostos orgânicos voláteis emitidos pelos *Bacillus amyloлицefaciens* ALB 629 e UFLA 285 contra *Colletotrichum lindemuthianum in vivo*, como também, verificar o efeito das moléculas ácido 2-metilbutanoico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o desenvolvimento micelial do patógeno *in vitro*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Antracnose no feijoeiro

A cultura do feijoeiro possui um papel econômico importante na agricultura mundial e nacional. Com uma área cultivada de aproximadamente 1.533,9 hectares na safra 2018/2019, estima-se que sejam colhidas uma produção de 791,0 mil toneladas de grãos (CONAB, 2018). Dentre as doenças que afetam a cultura, a Antracnose *Colletotrichum lindemuthianum* (SACC. & MAGN.) SCRIB, destaca-se pelo seu potencial de reduzir drasticamente a qualidade e a produção dos grãos na lavoura. Sob condições favoráveis ao patógeno, pode causar perdas de até 90% (GILLARD; RANATUNGA, 2013).

Colletotrichum lindemuthianum é um fungo hemi-biotrófico. A fase biotrófica é caracterizada pela presença das estruturas haustório e apressório. Posteriormente, o patógeno assume a fase de transição caracterizada pelo desenvolvimento de hifas menos espessas que penetram nas células do tecido do hospedeiro. Por fim, o fungo estabelece sua fase necrotrófica, caracterizada pela secreção de toxinas e enzimas líticas que degradam ou causam a morte celular do tecido (MENDGEN et al., 2002).

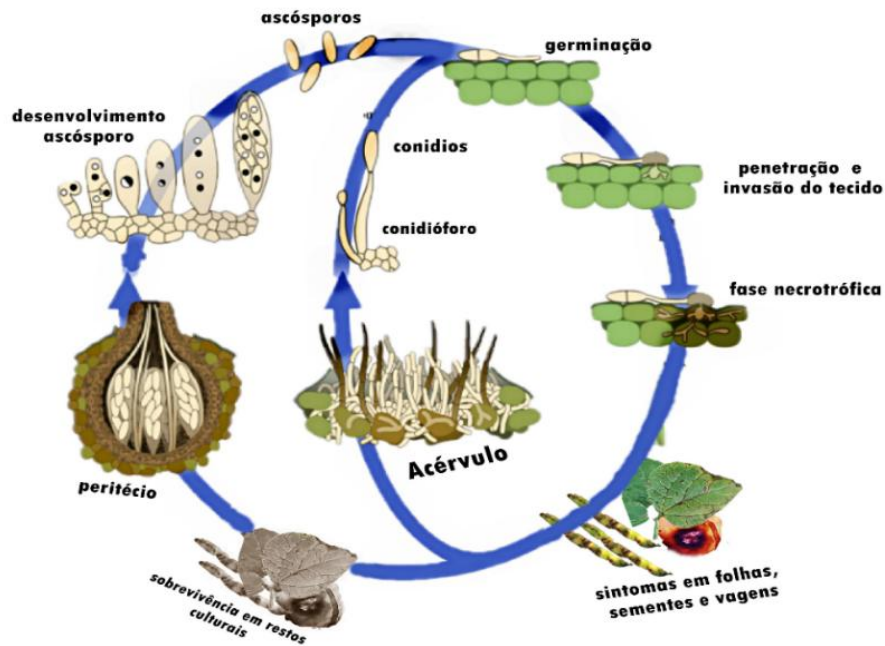
O patógeno possui duas fases reprodutivas distintas. A fase anamórfica (assexuada), é caracterizada pela presença de acérvulos que rompem a epiderme das folhas e liberam os conídios produzidos nos conidióforos. A fonte secundária de infecção se dá quando os conídios dispersos pelo vento encontram um novo tecido. Sob condições de umidade relativa e temperatura favoráveis iniciam o processo infeccioso caracterizado pela germinação do conídio, desenvolvimento e penetração do haustório no tecido (ISHIKAWA et al., 2010).

Em fase telomórfica (sexuada), o patógeno produz uma estrutura de resistência conhecida como peritécio que contém ascos capazes de produzir ascósporos. Os ascósporos são relatados como a fonte primária de infecção. Além disso, a presença de peritécios permite a permanência do patógeno nos restos culturais dos campos de cultivo do feijoeiro. A disseminação da doença ocorre à curtas e longas distâncias. A principal forma de disseminação à curtas distâncias é a dispersão de conídios pelo vento. À longas distâncias a principal forma de dispersão é por sementes infectadas com a presença de hifas dormentes do patógeno (RAVA et al., 1994).

Os sintomas característicos da Antracnose podem ser encontrados em diferentes estruturas da planta durante todo o estágio fenológico de *Phaseolus vulgaris*. Nas folhas, os

sintomas característicos são lesões amarronzadas que se desenvolvem inicialmente nas nervuras centrais e progridem, de acordo com a severidade da doença a lesões necróticas. Nas vagens, a presença de cancras deprimidos de coloração escura e parte central claras. No pecíolo, cancras de coloração marrom escura à negro. Nas sementes os sintomas são lesões deprimidas de coloração escura. (BIANCHINI et al., 1997).

Figura 1. Ciclo do desenvolvimento da Antracnose.



Fonte: retirada e modificada de De Silva et al. (2017).

O agente causal da Antracnose possui ampla distribuição geográfica. De acordo com Discovery life (2016), o *C. lindemuthianum* é encontrado em todos os continentes do mundo. Além de ampla distribuição geográfica o patógeno possui alta variabilidade genética. São conhecidas mais de 100 raças diferentes e relatadas no Brasil, a presença de mais de 40 (PADDER et al., 2017).

As medidas mais empregadas para o controle da doença são baseadas na integração de práticas de manejo. O uso de sementes livres do patógeno, aplicação de fungicidas químicos e a utilização de variedades resistentes são estratégias importantes para o manejo da doença. Entretanto, quando são aplicadas de maneira individual, podem ocasionar forte pressão de seleção. Esse fato associado a alta variabilidade genética do patógeno, ocasiona a quebra de resistência e culmina na susceptibilidade da maioria das cultivares (SHARMA et al., 2007).

Nesse contexto, compostos voláteis orgânicos possuem grande potencial para serem empregados como uma alternativa no controle da Antracnose. Estudos descrevem a ação antimicrobiana desses compostos sob diferentes fitopatógenos (BENNETT et al., 2015;

SILVA et al., 2016). Além disso eles são liberados naturalmente no ambiente, o que potencialmente possibilita uma alternativa de manejo de doenças menos nociva ao ambiente (MORATH et al., 2012).

2.2 A produção e a diversidade de compostos voláteis emitidos por microorganismos

Compostos orgânicos voláteis COVs, são combinações complexas de compostos lipofílicos de baixo peso molecular, originados de diferentes vias Biosintéticas (KANCHISWAMY et al., 2015). Quando são liberados por microorganismos, são denominados (mCOVs). Na natureza, existe expressiva diversidade de microorganismos produtores e emissores de mCOVs assim como também um número de compostos descobertos (LEMFACK et al., 2013).

A emissão de compostos voláteis emitidos por microorganismos pode ser influenciada por muitos fatores. Os mais abordados são a disponibilidade de nutrientes do meio, pH, oferta de oxigênio, assim como características dos microorganismos emissores de COVs, como também a via de biossíntese desses compostos (ROMOLI et al., 2014).

Desta forma, a disponibilidade de nutrientes é um fator determinante na produção de compostos orgânicos voláteis. O autor Wheatley et al. (1997), verificou a influência do fator nutricional do meio de cultura na emissão de COVs. As mesmas espécies de *Trichoderma* foram crescidas em meio ágar malte e meio mínimo ágar. A emissão de compostos orgânicos voláteis era superior no meio de cultura ágar malte, quando comparado ao meio ágar mínimo. Ainda sob a disponibilidade nutricional, existe o relato do pH que pode atuar modificando essa disponibilidade, resultando também na redução de produção de COVs. (ZECHMAN et al., 1995)

Outros fatores relevantes a serem considerados são a composição das colônias de microorganismos presentes no solo e a disponibilidade de oxigênio, que influenciam diretamente na produção de COVs. Em sistemas com baixas concentrações de O₂, a produção de compostos voláteis é menor pela menor efetividade do processo de respiração (INSAM et al., 2010).

Alguns compostos são produzidos por espécies de microorganismos. A molécula (s)-9-methyldecan-3-ol é produzida por espécies dos gêneros de bactérias *Myxococcus* e *Myxobacterium* (DICKSCHAT et al., 2004; SOBIK et al., 2007). No entanto, outras moléculas podem ser produzidas por diferentes gêneros e espécies. Por exemplo, o volátil ácido meitl-2-butanóico pode ser produzido por bactérias dos gêneros *Corynebacterium* e

Mycobacterium e ainda por diferentes espécies da bactéria *Staphylococcus* (MCNERNEY et al., 2012; LEMFACK et al., 2016).

Existem microrganismos que são utilizados como modelo de para o estudo de emissão de compostos voláteis, por sua capacidade de produzir uma grande diversidade de moléculas. Como um exemplo de modelo de produção de compostos voláteis por fungos, o agente *Muscador abulus* é capaz de emitir diversos compostos voláteis. Dentre eles, são comumente relatadas as misturas de compostos ácidos, ésteres, álcoois, cetonas hidrocarbonetos aromáticos com uma abundância particular de 3-metil-1-butanol e derivados do ácido isobutanóico (HUTCHINGS, et al., 2017).

Dentre as bactérias que produzem compostos orgânicos voláteis, o gênero *Bacillus* se destaca pela quantidade de espécies capazes de emitir um grande número de compostos. Nos estudos de Yuan et al. (2012), foram detectados 36 compostos orgânicos voláteis diferentes emitidos por *Bacillus amyloliquefaciens* cepa NJN-6, dos quais foram detectados grupos benzenos, alquilas, álcoois, cetonas, aldeídos, naftilos, éster e éter.

A diversidade de compostos voláteis encontrados na natureza, é relacionado também com as diferentes vias Biossintéticas em que esses compostos se originam (KANCHISWAMY et al., 2015). De acordo com Schmidt et al. (2015), as principais rotas metabólicas de moléculas voláteis foram descritas e agrupadas em (i) álcoois, (ii) aldeídos, (iii) alcanos, (iv) compostos aromáticos, (v) ésteres, (vi) ácidos graxos, (vii) isopropenos, (viii) metilcetonas, (ix) monoterpénos, (x) compostos nitrogenados, (xi) sesquiterpenos e (xii) compostos de enxofre.

De modo geral, o conhecimento da diversidade e da produção dessas moléculas pode auxiliar na maior compreensão do papel que elas exercem no ambiente, em interações simbióticas ou antagônicas entre microrganismos e, até mesmo, na ativação de respostas das plantas, através de indução de resistência e promoção de crescimento (BENNETT et al., 2015 ; LEE et al., 2016a ; LI et al., 2018b).

2.3 Compostos voláteis como mediadoras de interações microorganismo-microorganismo e microorganismo-planta

As moléculas voláteis são capazes de mediar diferentes tipos de interações entre microrganismos, antagônicas ou simbióticas, como também atuar na ativação de respostas de defesa de plantas como indução de resistência, e promoção de crescimento (LEMFACK et al., 2016).

Assim, os compostos orgânicos voláteis desempenham importante papel na comunicação inter e intraespecíficas de microrganismos (FARRÉ et al., 2017; LI et al., 2018a; JONES et al., 2017). Voláteis bacterianos do gênero *Xanthomonas* inibiram a atividade da rede de comunicação (quorum-sensing) de bactérias do gênero *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Pectobacterium* e *Pseudomonas* (CHERNIN et al., 2011).

Os COVs possuem atividade direta tóxica contra outros microrganismos. Estudos comprovam a ação de moléculas extraídas de extratos vegetais sob nematoides (JAVED et al., 2008; BARROS et al., 2014; SILVA et al., 2018). É conhecida a atividade antifúngica de moléculas voláteis orgânicas de microrganismos (BENNETT et al., 2015; QUINTANA-RODRIGUEZ et al., 2018). No estudo de Strobel et al. (2001), o gênero *Muscodor* produziu COVs com atividade antifúngica em espécies de fungos causadores de doenças de grande importância econômica, como *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, dentre outros. A atividade antibacteriana dessas moléculas também é bem abordada nos trabalhos de pesquisa de Xie et al. (2018), Houdkova et al. (2017) e Avalos et al. (2018).

A indução de resistência sistêmica induzida (SIR) ou resistência adquirida (SAR) por rizobactérias, também pode ser mediada por voláteis (NAZNIN et al., 2014; RIEDLMEIER et al., 2017; TAHIR et al., 2017b). O trabalho de Tahir et al. (2017b) demonstrou que COVs emitidos por *Bacillus spp.* inibiram o crescimento de *Ralstonia solanacearum* em tabaco. Além da ação direta antibacteriana, atuaram na regulação de expressão de genes relacionados à resistência à murcha bacteriana com provável ativação de ácido salicílico, culminando na indução de resistência sistêmica induzida (SIR).

Por fim, a promoção de crescimento mediada por COVs ocorre em diferentes gêneros de fungos, sendo o gênero *Trichoderma* o mais estudado (HUNG et al., 2013; LI et al., 2018). A promoção de crescimento mediada por voláteis produzidos por *Trichoderma atroviride* foi relatada em *Arabidopsis* (LEE et al., 2016a). Além dos fungos, bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* também são importantes produtoras de voláteis que podem atuar como promotores de crescimento (ASARI et al., 2016; RATH et al., 2018; HERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2015). A emissão de COVs por *Bacillus amyloliquefaciens* mediou a promoção de crescimento em plantas de tomate (TAHIR, et al., 2017a).

O conhecimento dos mecanismos ação que essas moléculas podem exercer sob a ampla gama de microrganismos descritos, assim como o seu papel na ativação do sistema de resposta das plantas (indução de resistência e promoção de crescimento), foi possibilitado

principalmente pelo avanço das técnicas de prospecção de moléculas e posteriores metodologias desenvolvidas para análise dos efeitos dos COVs em diferentes microorganismos (MORATH et al., 2012; RATH et al., 2018).

2.4 Compostos voláteis e o potencial de exploração prática dos COVs contra fitopatógenos

O avanço nas pesquisas sobre moléculas voláteis é evidenciado em um banco de dados, proposto por Lemfack et al. (2016), atualmente com registro de 480 microrganismos englobando bactérias e fungos que produzem aproximadamente 1000 moléculas diferentes. O conhecimento dessas moléculas voláteis e posteriores estudos sobre suas aplicações, foram viabilizados pelo refinamento de técnicas de prospecção moléculas (MORATH et al., 2012).

Atualmente, a técnica mais utilizada para prospecção de moléculas voláteis é a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC - MS), que através de processos analíticos, garante com grande precisão a detecção e identificação de moléculas em estado gasoso.

A metodologia mais utilizada para avaliação do potencial de compostos voláteis contra patógenos é a de placas bipartidas. A eficiência da técnica é relatada principalmente pela divisão central, em que restringe a interação não gasosa, mas permite pela difusão passiva, a passagem dos COVs para os dois compartimentos (RATH et al., 2018).

Também é evidenciada a utilização de placas bipartidas para o manejo de fitopatógenos de solo. A técnica de água tóxica desenvolvida por Barros et al. (2014), expõe a água aos compostos orgânicos voláteis e a mesma retém os VOCs. A atividade nematicida dessa técnica é verificada quando os nematoides entram em contato com a água tóxica ocasionando a imobilidade de J2, assim como também a redução da eclosão de ovos.

Não só a atividade antimicrobiana pode ser testada pela metodologia das placas bipartidas. Na recente abordagem de LI et al. (2018b), o potencial de promoção de crescimento de voláteis emitidos por *Verticillium sp.*, sob plantas de *Arabidopsis thaliana* desenvolvidos por essa prática.

Outra metodologia descrita para avaliar os compostos voláteis, placas de dimensões maiores que recobrem placas de dimensões menores e permitem a separação física de moléculas voláteis e o meio. Na metodologia realizada por Sharifi et al. (2016) uma placa de 90 mm de diâmetro englobando a placa de 40 mm de diâmetro foi empregada para avaliar o efeito de mCOVs produzidos por *B. subtilis* sob a germinação de esporos de *Botrytis cinerea*.

A utilização da técnica de placa inversa (DENNIS; WEBSTER, 1971), é abordada em ensaios envolvendo moléculas voláteis. No trabalho de Tapwal et al. (2011) a utilização da técnica permitiu a avaliação de voláteis produzidos por *Trichoderma atroviride* sob os patógenos *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani*, *Curvalaria luneta*, *Fusarium oxysporum*. De acordo com Da paz et al. (2016), o controle de *Rhizoctonia solani* em tabaco ocorreu pela ação de compostos orgânicos voláteis emitidos por fungos das espécies *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger*, gênero *Penicillium spp.* e pela bactéria *Bacillus subtilis*.

Uma abordagem mais atual da utilização de moléculas voláteis de maneira prática é a biofumigação ou fumigação biológica (MERCIER et al., 2005). O emprego de moléculas voláteis para o controle de patógenos de pós colheita também estão sendo abordadas. Boukaew et al. (2018) verificou o efeito de moléculas voláteis emitidas por *Streptomyces philanthi RM-1* contra o patógeno *C. goreosporioides*. A exposição do fruto do pimentão aos COVs mostrou eficiente no controle da antracnose como técnica de aplicação em pós colheita.

Várias técnicas de encapsulação de moléculas voláteis foram desenvolvidas e são empregadas em escala industrial, dentre elas, o processo de atomização denominado como “Spray Drying” é utilizado de maneira mais eficaz à princípios ativos voláteis (BANG et al., 1990). Um exemplo bem-sucedido na fitopatologia foi a utilização da técnica para encapsular *Bacillus amyloliquefaciens CPA-8* e utilização do potencial de controle sob *Monilinia spp.* em campo com baixa pressão de inóculo e efeito mais significativo quando testado em condições de Pós colheita (GOTOR-VILA et al., 2017).

A aplicação das moléculas voláteis emitidas por microorganismos pode se extrapolar à testes *in vitro*, possibilitando uma abordagem prática no manejo de doenças em que o patógeno é de difícil controle. Nesse sentido, os compostos voláteis possuem grande potencial para constituírem o sistema de manejo integrado de doenças de plantas, seja em forma de expurgo de sementes ou até mesmo como ativadoras do sistema de resposta de plantas, por indução de resistência como também por promoção de crescimento. (STROBEL et al., 2001; RIEDLMEIER et al., 2017; LEE et al., 2016a).

3. OBJETIVO

3.1 Geral

- Identificar o efeito das moléculas voláteis produzidas pelos isolados de rizobactérias: *Bacillus amyloлицefaciens* ALB629 e UFLA285 *in vitro*, detectar por SPME-GC / MS as principais moléculas emitidas por ambos *Bacillus*. Por fim, verificar o efeito *in vitro* das moléculas sintetizadas sob o desenvolvimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos isolados *C. lindemutianum* e *Bacillus* ALB629 e UFLA285

Bacillus amyloлицefaciens ALB629 foi obtido por isolamento endofítico de plantas de cacauero e *Bacillus amyloлицefaciens* UFLA 285, da rizosfera de lavouras de algodão. As bactérias foram depositadas no Centro de Ciência do Cacau em Itajuípe BA, e no Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Preservadas em peptona glicerol a -80°C. Antes de cada ensaio, cultivadas em placas de Petri contendo meio agar nutriente e incubadas à (28°C) durante 48 horas. O isolado LV175 de *Colletotrichum lindemuthianum* raça 65, foi obtido do Departamento de Biologia da UFLA, crescido em placas de Petri contendo o meio Batata Dextrose Agar e incubados em BOD à 21°C.

4.2 Teste *in vivo*

O experimento *in vivo* foi conduzido em câmara de crescimento com temperatura monitorada e irrigação mantida de acordo com a capacidade de campo. Foram utilizados vasos de vidro recobertos por papel alumínio. As sementes de feijão cv. (*Pérola*) foram desinfestadas superficialmente (álcool 70%) durante 1 min e hipoclorito (10%) por dois minutos, posteriormente realizada a tríplice lavagem com água esterilizada. Utilizadas duas plantas por vaso, com a relação de (2:1) terra e areia.

Para analisar o efeito das moléculas voláteis produzidas por *Bacillus*, células bacterianas foram transferidas para o meio de cultura nutriente ágar líquido, mantida em mesa agitadora durante 24h. A suspensão bacteriana foi ajustada à 1×10^8 UFC mL⁻¹ e posteriormente transferida para eppendorfs de 1,5 ml. Em cada vaso, foram adicionados 3 eppendorfs contendo a suspensão bacteriana de cada tratamento e água como controle negativo. Posteriormente, os vasos foram vedados com sacos de plástico e fita adesiva, evitando a dissipação e mantendo as plantas de feijão expostas aos compostos orgânicos voláteis durante 72h. Após 72 h, os sacos de plásticos foram removidos e a suspensão de *C. lindemuttianum* à concentração 1×10^5 esporos mL⁻¹, aplicada na parte aérea das plantas.

O experimento foi conduzido em delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento, definidos como: T1- *Bacillus amyloлицefaciens* ALB629 + *C. lindemuttianum*, T2- *Bacillus amyloлицefaciens* UFLA285 + *C. lindemuttianum*, T3- água + *C. lindemuttianum* e T4- água sem a inoculação de *C. lindemuttianum*. Após sete dias,

avaliou-se semanalmente a severidade da doença, conforme a escala desenvolvida por Godoy et al., (1973) e os dados foram transformados de acordo com McKinney et al., (1923) para gerar a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

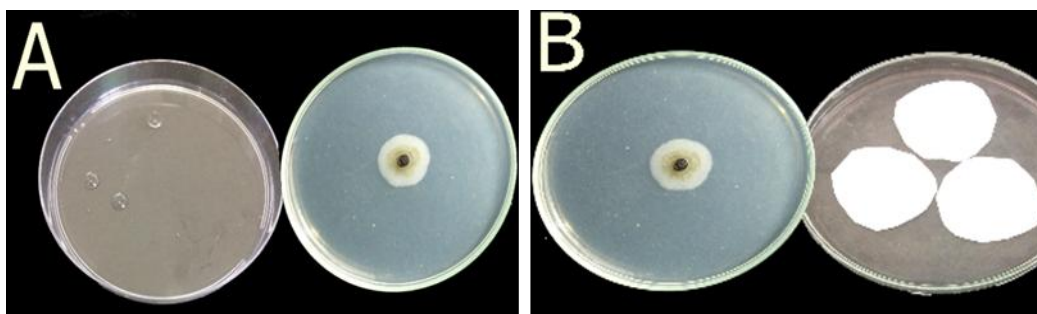
4.3 Identificação de moléculas voláteis

As suspensões bacterianas foram obtidas através da concentração 1×10^8 , posteriormente foram transferidos 100 μL de cada suspensão para tubos de 20 ml SPME incubados no período de 11 dias sob a temperatura de 21°C para a análise das moléculas voláteis. Como controle positivo, tubos contendo o meio NA foram utilizados. Os picos captados nas amostras bacterianas não presentes na amostra controle foram detectados pela comparação do espectro obtido com os espectros presentes na biblioteca de espectros de massa e comprovados pela comparação dos índices de retenção experimentais (RI Exp.) Com os da literatura (RI Lit.).

4.4. Adaptação da metodologia de placas sobrepostas e utilização de moléculas puras para detecção de mecanismos de ação

A metodologia foi desenvolvida em duas etapas. A primeira, a utilização das moléculas sob a placa de Petri, sem o papel filtro. A segunda, com a adição de papel filtro autoclavado (Figura 2).

Figura 2 – Metodologia de placas sobrepostas.



Legenda: A – moléculas voláteis aplicadas diretamente à placa; B – moléculas voláteis aplicadas em papel filtro.

Fonte: Da autora (2018).

As moléculas foram testadas em um único disco de papel, e de maneira separada em discos de papel. A primeira metodologia foi realizada com o teste das moléculas na relação à diluição, foram avaliados de 10 a 400 ppm das moléculas dissolvidas em água esterilizada.

Com o objetivo de apenas verificar o provável efeito antimicrobiano das três moléculas, a metodologia utilizada foi baseada na metodologia de Yuan et al., (2012), em que a ação fungicida das moléculas produzidas por *Bacillus*, sintetizadas pela empresa Sigma-Aldrich e testadas de maneira pura na quantidade de 100 µL.

Como adaptação da concentração para este estudo, foram aplicadas 10 µL das moléculas puras ácido 2-metilbutanoico (102.3 g mol^{-1} à 98%) e 3-hidroxi-2-butanona (88.8 g mol^{-1} à 95%) e ácido 3-metilbutanoico (102.3 g mol^{-1} à 95%) sob *Coletrochicum lindemutianum*, sintetizadas pela empresa Sigma-Aldrich.

4.5 ácido 2-metil butanóico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o desenvolvimento inicial do patógeno

Para a avaliação das moléculas voláteis sob o desenvolvimento inicial do patógeno, discos de micélio foram colocados no centro da placa contendo meio Batata Dextrose Ágar. O diâmetro de cada disco foi medido e simultaneamente adicionadas as moléculas. A quantidade de 10 µl de cada molécula individual e também em combinação de duas e três moléculas em discos de papel de filtro colocados no vértice oposto da placa de Petri ao patógeno.

Para o controle positivo utilizou-se a bactéria *Bacillus amylolicefaciens* ALB629 cultivada em meio MB1. As células foram transferidas para meio líquido MB1 mantido sob agitação a 120 rpm e temperatura de 28c durante 24 horas. 100 µl da suspensão bacteriana ajustada à 1×10^8 , foram transferidos para o ápice oposto da placa de Petri ao patógeno, contendo meio MB1. Como controle negativo, aplicados 100 µl de água.

Foram utilizados sete tratamentos e quatro repetições, dispostos em delineamento de blocos ao acaso: T1. 3-hidroxi-2-butanona T2. ácido 3-metilbutanoico T3. ácido 2-metilbutanóico T4. 3-hidroxi-2-butanona + ácido 3-metilbutanoico T5. ácido 3-metilbutanoico + ácido 2-metilbutanóico T6. 3-hidroxi-2-butanona + ácido 3-metilbutanóico T7. 3-hidroxi-2-butanona + ácido 3-metilbutanoico + ácido 2-metilbutanóico. O crescimento micelial foi avaliado em 1, 3, 6, 9 e 11 dias após o plaqueamento (DAP) e os dados expressos em mm.

4.6 Efeito das moléculas ácido 2-metil butanóico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o patógeno estabelecido

No experimento *in vitro*, o patógeno foi previamente cultivado por 4 dias. No quarto dia, o diâmetro foi medido e 10 µl de cada molécula foram adicionados individualmente e em combinações, em discos de papel de filtro colocados no ápice oposto da placa de Petri ao patógeno. Para o controle positivo, utilizou-se a bactéria *Bacillus amyloлицefaciens* ALB629 cultivada em meio MB1. As células foram transferidas para meio líquido MB1 mantido sob agitação a 120 rpm e temperatura de 28 durante 24 horas. 100 µl da suspensão bacteriana na concentração 1×10^8 , foram transferidos para o ápice oposto da placa de Petri para o patógeno, contendo meio MB1.

Como controle negativo, aplicados 100 µl de água. Foram utilizados sete tratamentos e quatro repetições, dispostos em delineamento de blocos ao acaso: T1. 3-hidroxi-2-butanona T2. ácido 3-metilbutanoico T3. ácido 2-metilbutanóico T4. 3-hidroxi-2-butanona + ácido 3-metilbutanoico T5. ácido 3-metilbutanoico + ácido 2-metilbutanóico T6. 3-hidroxi-2-butanona + ácido 3-metilbutanóico T7. 3-hidroxi-2-butanona + ácido 3-metilbutanoico + ácido 2-metilbutanóico. O crescimento micelial foi avaliado em 0, 1, 3, 5, 7 dias após o quarto (DAP) e os dados expressos em mm.

4.7 Análises estatísticas

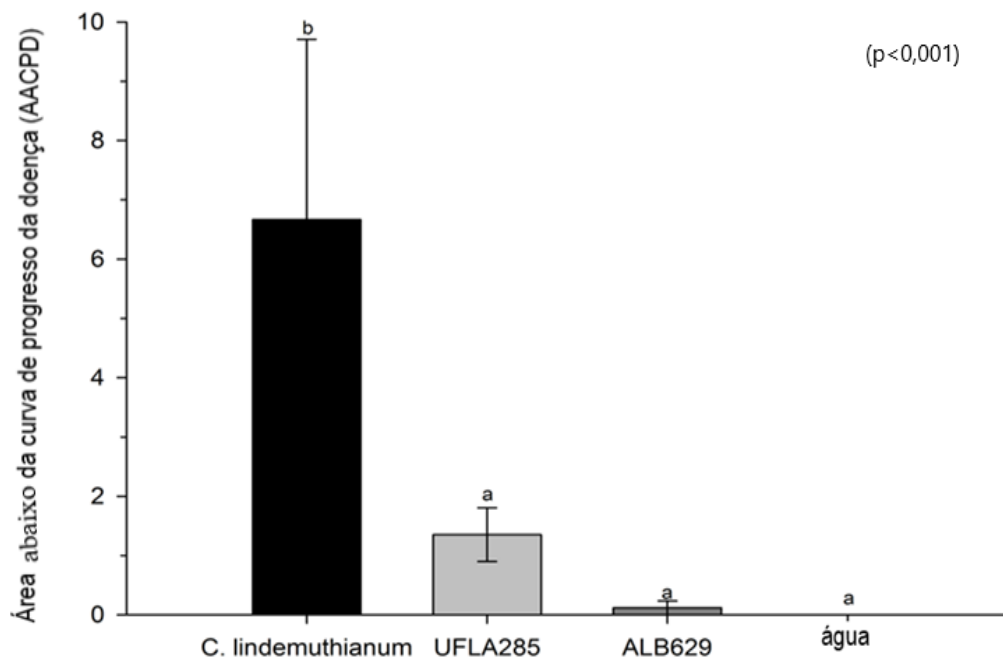
Os experimentos foram realizados na Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, Minas Gerais, Brasil. O delineamento experimental em blocos ao acaso, foi utilizado com 5 e 4 repetições para os testes *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Os dados foram submetidos à análise de variância bidirecional e unidirecional (ANOVA) para testes *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Os testes de Duncan ($P = 0,05$) foram aplicados para meios significativos quando necessário. Para todas as análises, os pressupostos de normalidade de variância foram verificados pelo teste de Shapiro-Wilk e nenhuma transformação foi realizada. Os programas Sisvar e RStudio foram utilizados para análises estatísticas (Sisvar Versão 5.6, Build 86; RStudio versão 3.0.1).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teste *in vivo*

Os compostos orgânicos voláteis emitidos por ambas rizobactérias controlaram a antracnose *in vivo*, reduzindo a AACPD em 79-85% para *Bacillus amyloliquefaciens* ALB629 e *Bacillus amyloliquefaciens* UFLA285, respectivamente ($P < 0,001$) (Figura 3).

Figura 3 - Teste *in vivo* do efeito dos COVs sob *C. lindemutianum*. *** Significativo no nível de probabilidade de 0,001 de acordo com o teste de Tukey. (Meios de dois experimentos de quatro repetições de dez mudas cada). A linha em cada ponto representa \pm SE



Martins et al., (2016).

A redução do progresso da doença em relação ao tempo nesse estudo, sugere que os compostos voláteis emitidos por *Bacillus amyloliquefaciens* que foram posteriormente identificados como 3-hidroxi-2-butanona e os ácidos 3-metilbutanóico e 2-metilbutanóico podem ter relação com a indução de resistência sistêmica do feijoeiro à *Colletrochicum lindemutianum*.

De acordo com Shafi et al. (2017), a indução de resistência desencadeada por compostos voláteis produzidos por *Bacillus spp.* pode atuar na ativação do sistema de defesa de diferentes espécies de plantas, contra patógenos fúngicos e bacterianos. As moléculas derivadas da via de cetonas, são capazes de promover a indução de resistência. A ação de 2-

butanona para a indução de resistência em plantas de pepino à *Pseudomonas syringae* pv. *lacrimonios* foi relatada por Song et al. (2013), como também a aplicação da molécula 3-hidroxi-2-butanona emitida por *B. subtilis* desencadeou em plantas de *Arabidopsis* spp. resistência sistêmica induzida para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (RUDRAPPA et al., 2010).

A resistência promovida em plantas de feijão por moléculas voláteis contra *Coletrochicum lindemutianum* foi relatada. O autor Quintana-Rodriguez et al. (2015), descreveu que moléculas provindas da cultivar resistente à *Coletrochicum* e introduzidas na cultivar susceptível, ativaram o sistema de defesa da planta de feijão. A indução de resistência adquirida foi verificada pelo aumento da expressão dos genes PR-1, PR-2 e PR-4 relacionados à resistência das plantas na cultivar suscetível.

Além disso, as moléculas podem ter contribuído com a indução de crescimento do feijoeiro, desempenhando um ganho adicional na supressão da doença. Choudhary et al. (2009), constataram que as moléculas 2,3-butanodiol e 3-hidroxi-2-butanona, emitidas por *B. subtilis* GB03 e *B. amyloliquefaciens* IN937a, promoveram crescimento em *Arabidopsis*.

Outro fato a ser considerado, é *Colletotrichum lindemuthianum* é um fungo hemibiotrófico e utiliza as estruturas haustório e apressório para a penetração e infecção do tecido do hospedeiro (MENDGEN et al., 2002). As moléculas 3-metilbutanóico e 2-metilbutanóico podem ter atuado sob as estruturas de penetração do patógeno, de acordo com a utilização de ácido 12-metiltetradecanóico inibiu a formação do apressório do patógeno do arroz, *Magnaporthe oryzae* (JEON et al., 2010).

5.2 Identificação de moléculas voláteis

Nesse estudo, foram detectadas pela técnica de cromatografia gasosa os ácidos 2-metilbutanóico, 3-metilbutanóico e 3-hidroxi-2-butanona. A molécula 3-hidroxi-2-butanona, apresentou maior pico em relação à ácido 3-metilbutanóico e 2-metilbutanóico, conforme (Tabela 1).

Tabela 1 - Identificação das moléculas voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de

moléculas	RI Exp.	RI Lit. ^a	Match. (%)	amostra ^b	
				ALB629	UFLA285
3-hidroxi-2-butanona	713	710	92	√√	√√
ácido 3-metilbutanóico	867	876	90	√	√
ácido 2-metilbutanóico	878	884	92	√	√

massa (GC-MS).

Legenda: ^a Índices de retenção experimentais e ^b amostras; Pico de intensidade das moléculas voláteis; _v alta intensidade; _v baixa intensidade.

Fonte: retirada de Martins et al., (2016).

De acordo com o autor Farré et al. (2016) os grupos de compostos comumente encontrados em emissões de rizobactérias estão classificados em alcenos, cetonas e álcoois. Assim como, as moléculas 2-metilbutanóico e ácido-3-metilbutanóico, são relatadas como parte do arsenal das 37 moléculas voláteis produzidas por diferentes isolados de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. cereus* e *B. subtilis* quando realizada a detecção de compostos voláteis *in vitro* no trabalho realizado por (CHAVES-LÓPEZ et al., 2015). Como também, a produção da molécula volátil ácido-3-metilbutanóico foi relatada na emissão da estirpe *Bacillus pumilus* L1 (LEE et al., 2016b).

Como nos resultados encontrados nesse estudo em que 3-hidroxi-2-butanona foi detectada em maior quantidade entre as moléculas emitidas pelas estirpes de *B. amyloliquefaciens*, Chaves-López et al. (2015), relata a produção em maior abundância de voláteis do grupo cetona pelos diferentes isolados de *Bacillus*.

5.3 Adaptação da metodologia de placas sobrepostas e utilização de moléculas puras para detecção de mecanismos de ação

As moléculas, à 500 ppm por ambas metodologias não tiveram efeito sob o desenvolvimento micelial do patógeno. Ao passo que, quando utilizada a técnica do papel filtro autoclavado, a dosagem selecionada de 10 µL para o teste da ação das moléculas sob o patógeno *Colletrochicum lindemutianum*, em relação à metodologia das placas sem a utilização do papel filtro, se mostrou mais eficiente, observando os resultados de inibição, determinados ao 11 DAP.

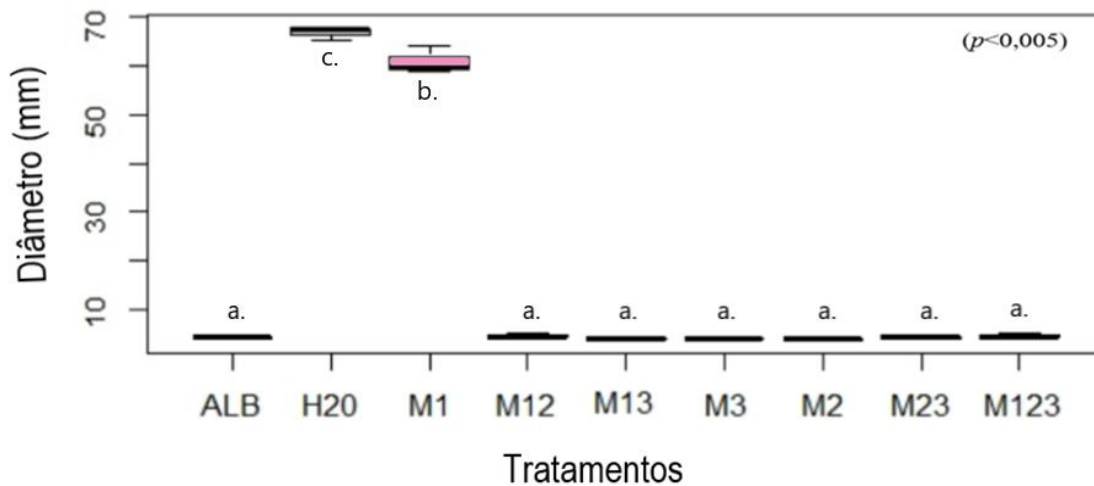
5.4 Efeito das moléculas ácido 2-metil butanoico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o desenvolvimento inicial do patógeno

Para as moléculas testadas, quando aplicadas individualmente ou em combinação, apresentaram inibição para o patógeno *C. lindemutianum* a partir do primeiro DAP. Para as moléculas 2-metilbutanóico e 3-metilbutanóico a inibição do crescimento, quando testados individualmente ou em combinação, reduziram o crescimento micelial do patógeno a partir da

primeira avaliação. Ao 11 DAP a redução foi de 94%. Esse resultado se assemelha com o resultado encontrado no controle positivo *B. amyloлицefaciens* ALB629.

Entretanto, a molécula 3-hidroxi-2-butanona, não foi efetiva na inibição do crescimento do patógeno quando avaliada individualmente, a redução apenas foi encontrada quando a molécula foi plicada em combinação com as moléculas 2-metilbutanoico e 3-metilbutanoico, que reduziram o crescimento micelial, quando testadas individualmente (Figura 4 e 6).

Figura 4 - Boxplot para o efeito das moléculas ácido 2-metilbutanoico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob o desenvolvimento inicial do patógeno avaliado aos 11(dap). *** Significativo no nível de probabilidade de 0,005 de acordo com o teste de Tukey. (Meios de dois experimentos de quatro repetições de cinco placas cada). A linha em cada ponto representa \pm SE



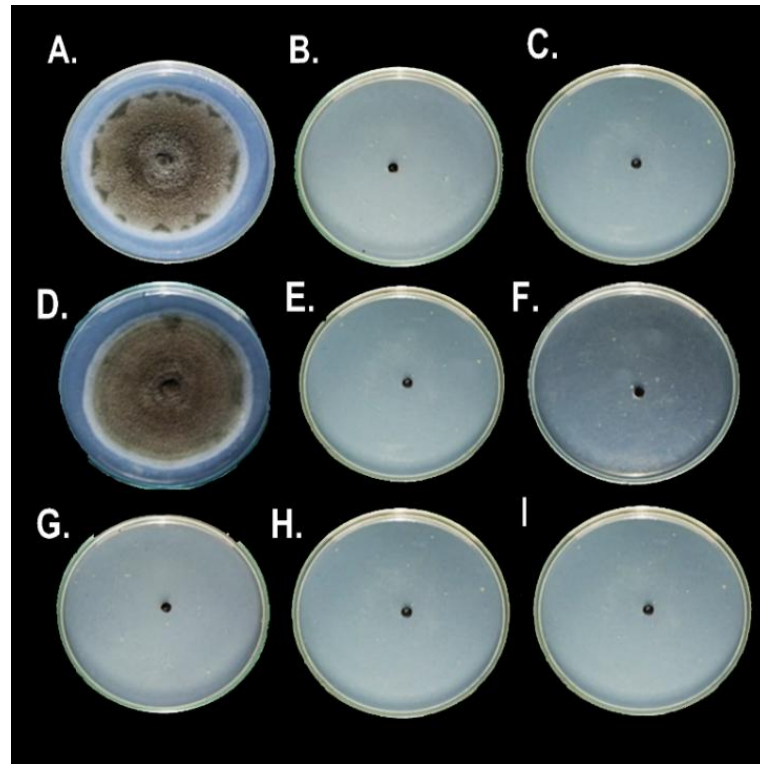
Legenda: M1. 3-hidroxi-2-butanona; M2. 3-metilbutanoico; M3. 2-metilbutanoico; H20. água; M12. 3-hidroxi-2-butanona + 3-metilbutanoico; M23. 3-metilbutanoico + 2-metilbutanoico; M13. 3-hidroxi-2-butanona + 3-metilbutanoico; ALB. *Bacillus* ALB629; M123. 3-metilbutanoico + 2-metilbutanoico + 3-hidroxi-2-butanona.

Fonte: Da autora (2018).

Huang et al. (2015) evidenciou o efeito da molécula ácido 2-metilbutanoico (ácido 3-metilbutanoico), na inibição do crescimento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Em relação a 3-hidroxi-2-metilbutanona, a não inibição do crescimento micelial do patógeno, Yuan et al. (2012) utilizou as moléculas 2-tetradecanona e a 2-pentadecanona não mostraram efeitos antifúngicos contra *F. oxysporum*, mesmo quando utilizadas não diluídas em água e em altas concentrações. Entretanto, a utilização dessa molécula para promoção de crescimento, foi encontrada nos estudos de Ping et al. (2004).

Figura 6 - Resultado da inibição do crescimento micelial do patógeno *C. lindemutianum* ao 11 (dap).



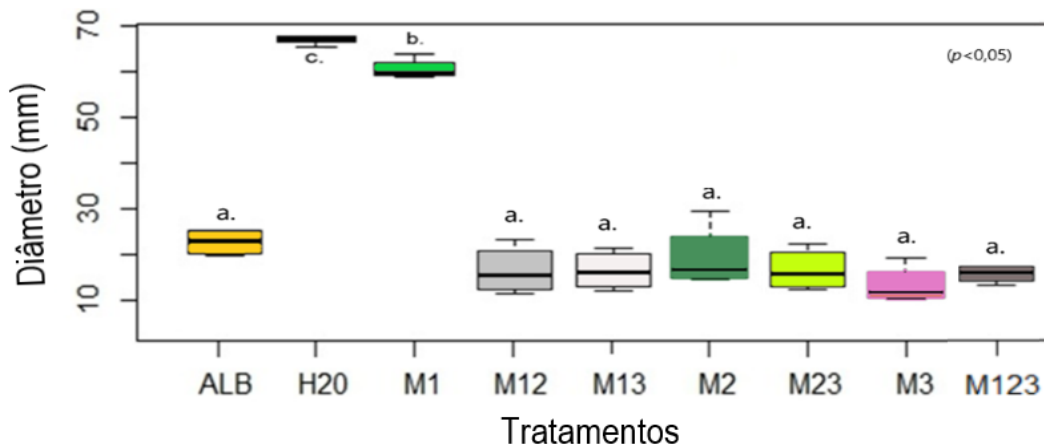
Legenda: A. 3-hidroxi-2-butanona; B. 3-metilbutanóico; C. 2-metilbutanóico; D. água; E. 3-hidroxi-2-butanona + 3-metilbutanóico; F. 3-metilbutanóico + 2-metilbutanóico; G. 3-metilbutanóico; H. *Bacillus* ALB629; I. 3-Metilbutanóico + 2-metilbutanóico + 3-hidroxi-2-butanona.

Fonte: Da autora (2018).

5.5 Efeito de ácido 2-metil butanóico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico sob *C. lindemutianum* ao 4 (dap)

Quando as moléculas foram aplicadas individualmente ou de maneira combinada, a inibição do patógeno *C. lindemutianum*, foi constatada a partir de 1 DAP. As moléculas 2-metilbutanóico e 3-metilbutanóico, diminuíram o crescimento do patógeno em 71 e 69 % respectivamente. Entretanto, a molécula 3-hidroxi-2-butanona, não foi efetiva na redução do crescimento micelial do patógeno (Figuras 5 e 7).

Figura 5 - Boxplot para o efeito do ácido 2-metil butanóico, 3-hidroxi-2-butanona e ácido 3-metilbutanoico patógeno estabelecido ao 7 (dap). ***Significativo no nível de probabilidade de 0,005 de acordo com o teste de Tukey. (Meios de dois experimentos de quatro repetições de cinco placas cada). A linha em cada ponto representa \pm SE.



Legenda: M1. 3-hidroxi-2-butanona; M2. 3-metilbutanóico; M3. 2-metilbutanóico; H20. água; M12. 3-hidroxi-2-butanona + 3-metilbutanóico; M23. 3-metilbutanóico + 2-metilbutanóico; M13. 3-hidroxi-2-butanona + 3-metilbutanóico; ALB. *Bacillus* ALB629; M123. 3-metilbutanóico + 2-metilbutanóico + 3-hidroxi-2-butanona.

Fonte: Da autora (2018).

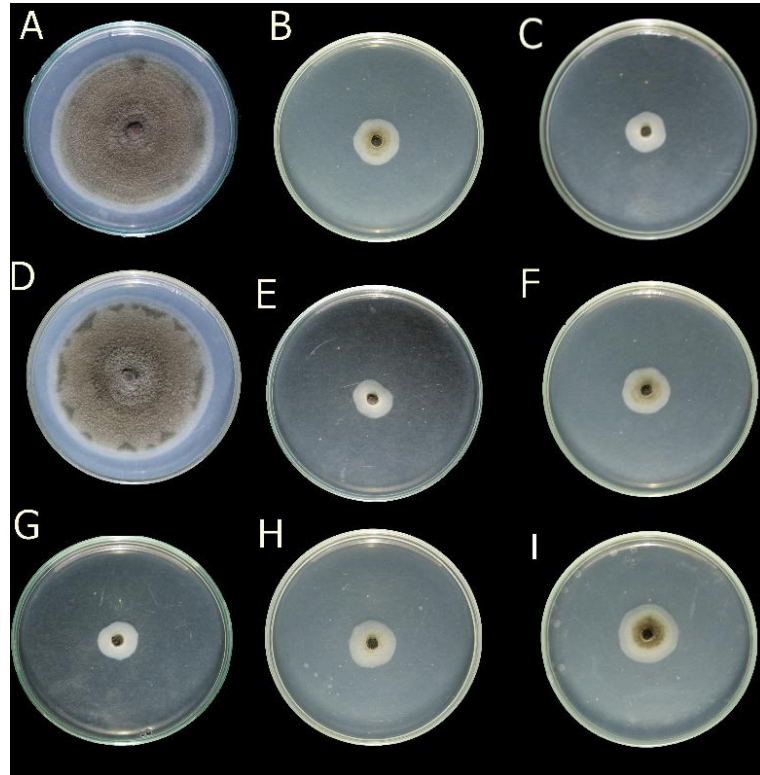
A inibição na germinação de esporos foi encontrada para volátil ácido nonanóico produzido por *Trichoderma harzianum*, que reduziu em 70% para *M. roreri*, 75% para *C. pernicioso* e 84% para *T. harzianum* (ANEJA et al., 2005). Além disso, o mesmo autor relata a

inibição micelial para os três patógenos com a utilização da mesma molécula.

A inibição do crescimento de *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia fragariae*, *R. solani*, *Phytophthora fragariae* e *Pythium sp.*, quando expostas à vapores de ácido butírico foi encontrada por (BROWNING et al., 2006).

Em relação a 3-hidroxi-2-metilbutanona, a não inibição do crescimento micelial do patógeno, Yuan et al., (2012) utilizou as moléculas 2-tetradecanona e a 2-pentadecanona não mostraram efeitos antifúngicos contra *F. oxysporum*, mesmo quando utilizadas não diluídas em água e em altas concentrações. Entretanto, a utilização dessa molécula para promoção de crescimento, foi encontrada nos estudos de Ping et al. (2004).

Figura 7 - Resultado da inibição do crescimento micelial do patógeno *C. lindemutianum* ao 7 (dap).



Legenda: A. 3-hidroxi-2-butanona; B. 3-metilbutanóico; C. 2-metilbutanóico; D. água; E. 3-hidroxi-2-butanona + 3metilbutanóico; F. 3-metilbutanóico + 2-metilbutanóico; G. 3-metilbutanóico; H. *Bacillus* ALB629; I. 3-Metilbutanóico + 2-metilbutanóico + 3-hidroxi-2-butanona.

Fonte: Da autora (2018).

6. CONCLUSÃO

A redução da Antracnose *in vivo* pelos voláteis produzidos por *Bacillus spp.* pode estar relacionada com a ativação do sistema de defesa da planta tanto por indução de resistência como por promoção de crescimento pela exposição aos compostos orgânicos voláteis.

As moléculas identificadas por micro extração em fase sólida (SPME) acoplada a cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa, foram ácidos 2-metilbutanóico, 3-metilbutanóico e 3-hidroxi-2-butanona.

A molécula 3-hidroxi-2-butanona, não reduziu o crescimento micelial do patógeno *in vitro*, entretanto ácido 2-metil-butanóico e ácido 3-metil-butanóico sintetizados, reduziram o crescimento *Colletotricum lindemuthianum* em até 93%.

7. REFERÊNCIAS

- ANEJA M, GIANFAGNA TJ, HEBBAR PK. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of pore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 67 p. 304-307, 2005.
- ASARI, S.; MATZÉN, S.; PETERSEN, M. A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. **FEMS microbiology ecology**, v. 92, n. 6, p. 1-11, 2016.
- ATKINSON, R; AREY, J. Gas-phase tropospheric chemistry of biogenic volatile organic compounds: a review. **Atmospheric Environment**, v. 37, p. 197-219, 2003.
- AVALOS, M.; VAN WEZEL, G. P.; RAAIJMAKERS, J. M.; GARBEVA, P. Healthy scents: microbial volatiles as new frontier in antibiotic. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 84-91, 2018.
- BANG, W. E.; REINECCIUS, G. A. Characterization of selected materials for lemon oil encapsulation by spray drying. **J. Food Science**, v. 55, n. 5, p. 1356-1358, 1990.
- BARROS, A. et al. Nematicidal activity of volatile organic compounds emitted by *Brassica juncea*, *Azadirachta indica*, *Canavalia ensiformis*, *Mucuna pruriens* and *Cajanus cajan* against *Meloidogyne incognita*. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 34-43, 2014.
- BENNETT, J. W.; INAMDAR, A. A. Are some fungal volatile organic compounds COVs mycotoxins **Toxins (Basel)**, v. 7, n. 9, p. 3785-804, 2015.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, AC & CARNEIRO, BSMTG. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA & Rezende JAM (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. Doenças das plantas cultivadas. 3ª ed. São Paulo, Agronômica Ceres. p.376-399, 1997.
- BOUKAEW, S. et al. Fumigant activity of volatile compounds of *Streptomyces philanthi* RM-1-138 and pure chemicals (acetophenone and phenylethyl alcohol) against anthracnose pathogen in postharvest chili fruit. **Crop Protection**, v. 103, p. 1-8, 2018.
- BROWNING, M.; WALLACE, D. B.; DAWSON, C.; ALM, S. R., & AMADOR, J. A. Potential of butyric acid for control of soil-borne fungal pathogens and nematodes affecting strawberries. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38(2), p. 401-404, 2006.
- CHAVES-LÓPEZ, C. et al. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 2, p. 487-499, 2015.
- CHERNIN, L.; TOKLIKISHVILI, N.; OVADIS, M.; KIM, S.; BEN-ARI, J.; KHMEL, I.; VAINSTEIN, A. Quorum-sensing quenching by rhizobacterial volatiles. **Environmental Microbiology Reports**, v. 3, n. 6, p. 698-704, 2011.
- CHOUDHARY, D.; K. & JOHRI, B. N. Interactions of *Bacillus* spp. and plants—with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological research**, v. 164(5), p. 493-513, 2009.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2018/19. **Observatório Agrícola**, v. 6, n. 2, p. 60-76, 2018

CORCUFF, R. MERCIER, J.; TWEDDELL, R.; ARUL, J. Effect of water activity on the production of volatile organic compounds by *Muscodor albus* and their effect on three pathogens in stored potato. **Fungal Biology**, v. 115, n. 3, p. 220-227, 2011.

DA PAZ LIMA, M. L.; VAZ, M. C. A.; DA SILVA, A.; DE ALMEIDA; SOUZA, K. & TUÑÓN, G. I. L. In vitro confrontation of *Trichoderma* spp. isolates with phytopathogenic and non-phytopathogenic fungi. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3(2), p. 1-8, 2016.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic Properties of Species Groups of *Trichoderma*. I. Production of Nonvolatile Antibiotics. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57 p. 25-39, 1971.

DE SILVA, D. D.; CROUS, P. W.; ADES, P. K.; HYDE, K. D. & TAYLOR, P. W. Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. **Fungal Biology Reviews**, v. 31(3), p. 155-168, 2017.

DICKSCHAT, J. S.; WENZEL, S. C.; BODE, H. B.; MÜLLER, R. & SCHULZ, S. Biosynthesis of volatiles by the myxobacterium *Myxococcus xanthus*. **ChemBioChem**, v. 5(6) p. 778-787, 2004.

DISCOVER LIFE. **Global mapper**. Disponível em: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?act=make_map>. Acesso em: 19 jan 2016.

FARRÉ-ARMENGOL, G.; FILELLA, I.; LUSIÀ, J.; PEÑUELAS, J. β -Ocimene, a key floral and foliar volatile involved in multiple interactions between plants and other organisms. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1148-1157, 2017.

FARRÉ-ARMENGOL, G., FILELLA, I., LLUSIA, J., & PEÑUELAS, J. Bidirectional interaction between phyllospheric microbiotas and plant volatile emissions. **Trends in plant science**, v. 21(10), p. 854-860, 2016.

FIALHO, M. B. et al., Potential of antimicrobial volatile organic compounds to control *Sclerotinia sclerotiorum* in bean seeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 2, p. 137-142, 2011.

GILLARD, C. L.; RANATUNGA, N. K. Interaction between seed treatments, surfactants and foliar fungicides on controlling dry bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). **Crop Protection**, v. 45, p. 22-28, 2013.

GODOY, C. V. et al., Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, Berne, v. 104, p. 336-345, 1997.

GOFF, S. A., & KLEE, H. J. Plant volatile compounds: sensory cues for health and nutritional value. **Science**, v. 311(5762), p. 815-819, 2006.

GOTOR-VILA, A.; TEIXIDÓ, N.; CASALS, C.; TORRES, R.; DE CAL, A.; GUIJARRO, B. & USALL, J.). Biological control of brown rot in stone fruit using *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 under field conditions. **Crop Protection**, v. 102, p. 72-80, 2017.

HERNÁNDEZ-LEÓN, R. et al., Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**, v. 81, p. 83-92, 2015.

HOUDKOVA, M.; RONDEVALDOVA, J.; DOSKOCIL, I.; KOKOSKA, L. Evaluation of antibacterial potential and toxicity of plant volatile compounds using new broth microdilution volatilization method and modified MTT assay. **Fitoterapia**, v. 118, p. 56-62, 2017.

HUANG, X. WEN, T.; ZHANG, J.; MENG, L.; ZHU, T.; CAI, Z. Toxic organic acids produced in biological soil disinfestation mainly caused the suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **BioControl**, v. 60, n. 1, p. 113-124, 2015.

HUNG, R.; LEE, S.; & BENNETT, J. W. Arabidopsis thaliana as a model system for testing the effect of Trichoderma volatile organic compounds. **Fungal ecology**, v. 6(1), p. 19-26, 2013.

HUTCHINGS, M. L.; HILLER, D. A.; BERRO, J.; STROBEL, S. A. Mycofumigation through production of the volatile DNA Methylating Agent N-methyl-N-nitrosoisobutyramide by Fungi in the Genus *Muscodor*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 18, p. 7358-7371, 2017.

INSAM, H.; SEEWALD, M. S. A. Volatile organic compounds COVs in soils. **Biology and fertility of soils**, v. 46, n. 3, p. 199-213, 2010.

ISHIKAWA, F. H.; BARCELOS, Q. L.; ALVES, E.; CAMARGO JR, O. A.; & DE SOUZA, E. A. Symptoms and prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Journal of phytopathology**, v. 158(4), p. 270-277, 2010.

JAVED, N. et al., Efficacy of neem (*Azadirachta indica*) formulations on biology of root-knot nematodes (*Meloidogyne javanica*) on tomato. **Crop Protection**, v. 27, n. 1, p. 36-43, 2008.

JEON, Y. T.; JUN, E. M.; OH, K. B.; THU, P. Q.; & KIM, S. U. Identification of 12-methyltetradecanoic acid from endophytic *Senotrophomonas maltophilia* as inhibitor of appressorium formation of *Magnaporthe oryzae*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 53(5) p. 578-583, 2010.

JONES, S. E.; HO, L.; REES, C. A.; HILL, J. E.; NODWELL, J. R.; ELLIOT, M. A. Streptomyces exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. **eLife**, v. 6, p. 1-21, 2017.

KANCHISWAMY, C. N.; MALNOY, M.; MAFFEI, M. E. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 1-23, 2015.

LEE, S.; YAP, M.; BEHRINGER, G.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. **Fungal biology and biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2016a.

LEE, Y. S et al., Identification of 2-methylbutyric acid as a nematocidal metabolite, and biocontrol and biofertilization potentials of *Bacillus pumilus* L1. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 49, n. 4, p. 401-408, 2016b.

LEMFACK, M. C.; NICKEL, J.; DUNKEL, M.; PREISSNER, R., & PIECHULLA, B. mVOC: a database of microbial volatiles. **Nucleic acids research** 42(D1), D744-D748. 2013.

LEMFACK, M. C.; RAVELLA, S. R.; LORENZ, N.; KAI, M.; JUNG, K.; SCHULZ, S.; PIECHULLA, B. Novel volatiles of skin-borne bacteria inhibit the growth of Gram-positive bacteria and affect quorum-sensing controlled phenotypes of Gram-negative bacteria. **Systematic and applied microbiology**, v. 39, n. 8, p. 503-515, 2016.

LI, H. P.; YANG, W. J.; QU, S. X.; PEI, F.; LUO, X.; MARIGA, A. M.; MA, L. Variation of volatile terpenes in the edible fungi mycelia *Flammulina velutipes* and communications in fungus-mite interactions. **Food Research International**, v. 103, p. 150-155, 2018a.

LI, N., WANG, W., BITAS, V., SUBBARAO, K., LIU, X., & KANG, S. Volatile compounds emitted by diverse *Verticillium* species enhance plant growth by manipulating auxin signaling. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 31(10), v. 1021-1031, 2018b.

LIARZI, O.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; EZRA, D. Use of the endophytic fungus *Daldinia cf. concentrica* and its volatiles as bio-control agents. **PLoS One**, v. 11, n. 12, p. 1-18, 2016.

MARTINS, S. J. Protection against biotic and abiotic stresses in common bean by rhizobacteria. 2016. 86 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

MERCIER, J., & SMILANICK, J. L. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biological Control*, 32(3), 401-407, 2005.

MCNERNEY, R.; MALLARD, K.; OKOLO, P. I.; TURNER, C. Production of volatile organic compounds by mycobacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 328, n. 2, p. 150-156, 2012.

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

MELOTTO, M.; BALARDIN, R. S.; KELLY, J. D. Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. *Colletotrichum: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. St.Paul-Minnesota, **APS Press**. p. 346-361, 2000.

MENDGEN, K.; & HAHN, M. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in plant science**, v. 7(8), p. 352-356, 2002.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, n. 2-3, p. 73-83, 2012.

NAZNIN, H. A.; KIYOHARA, D.; KIMURA, M.; MIYAZAWA, M.; SHIMIZU, M.; HYAKUMACHI, M. Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2014.

PADDER, B. A., SHARMA, P. N., AWALE, H. E., & KELLY, J. D. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99(2), p. 317-330, 2017.

PING, L.; BOLAND, W. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. **Trends in plant science**, v. 9, n. 6, p. 263-266, 2004.

QUINTANA-RODRIGUEZ, E.; MORALES-VARGAS, A.T.; MOLINA-TORRES, J.; ÁDAME-ALVAREZ, R.M.; ACOSTA-GALLEGOS, J.A. & HEIL, M. Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Ecology**, v. 103 p. 250-260, 2015.

QUINTANA-RODRIGUEZ, E.; RIVERA-MACIAS, L. E.; ADAME-ALVAREZ, R. M.; TORRES, J. M.; HEIL, M. Volatile organic compounds of plant or fungal origin exert direct antifungal activity in vitro. **Fungal Ecology**, v. 33, p. 115-121, 2018.

RATH, M.; MITCHELL, T. R.; GOLD, S. E. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent. **Microbiological research**, v. 208, p. 76-84, 2018.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; & SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19(2), p. 167-172, 1994.

RIEDLMEIER, M.; GHIRARDO, A.; WENIG, M.; KNAPPE, C.; KOCH, K.; GEORGII, E.; DEY, S.; PARKER, J. E.; SCHNITZLER, J. P.; VLOT, A. C. Monoterpenes support systemic acquired resistance within and between plants. **The Plant Cell**, v. 29, n. 6, p. 1440-1459, 2017.

ROMOLI, R.; PAPALEO, M. C.; DE PASCALE, D.; TUTINO, M. L.; MICHAUD, L.; LOGIUDICE, A. BARTOLUCCI, G. GC-MS volatolomic approach to study the antimicrobial activity of the antarctic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. TB41. **Metabolomics**, v. 10(1), p. 42-51, 2014.

RUDRAPPA, T.; BIEDRZYCKI, M. L.; KUNJETI, S. G.; DONOFRIO, N. M.; CZYMMEK, K. J.; PAUL, W. P.; BAIS, H. P. The rhizobacterial elicitor acetoin induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Communicative & Integrative Biology**, v. 3, n. 2, p. 130-138, 2010.

SCHMIDT, R. et al. Volatile affairs in microbial interactions. **The ISME journal**, v. 9, n. 11, p. 2329, 2015.

SILVA, J. C. P. Compostos orgânicos voláteis de plantas e o etanol no controle de *Meloidogyne incognita.*, 81 p. Tese, (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SILVA, J. C. P. et al. Compostos orgânicos voláteis no controle de fitonematoides. **Editora UFLA ISBN 978-85-8127-082-1**, 2018.

SHAFI, J.; TIAN, H.; MINGSHAN, J.I. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology e Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 3, p. 446-459, 2017.

SHARIFI, R.; RYU, C. M. Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 196, 2016.

SHARMA P.N.; PADDER B.A.; SHARMA O.P.; PATHANIA A.; SHARMA P. Pathological and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* (bean anthracnose) across Himachal Pradesh, a north-western Himalayan state of India. **Australasian Plant Pathology**, v. 36, p. 191-197, 2007.

SOBIK, P.; GRUNENBERG, J.; BÖRÖCZKY, K.; LAATSCH, H.; WAGNER-DÖBLER, I.; & SCHULZ, S. Identification, synthesis, and conformation of tri-and tetrathiacycloalkanes from marine bacteria. **The Journal of organic chemistry**, v. 72(10), p. 3776-3782, 2007.

SONG, G. C.; RYU, C. M. Two volatile organic compounds trigger plant self-defense against a bacterial pathogen and a sucking insect in cucumber under open field conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 9803-9819, 2013.

STROBEL, G. A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; & MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147(11), p. 2943-2950 2001.

TAHIR, H. A. et al. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1-11, 2017a.

TAHIR, H. A. S.; GU, Q., WU, H.; NIU, Y.; HUO, R.; & GAO, X. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. **Scientific reports**, v. 7, p. 1-15, 2017b.

TAPWAL, A. et al. In vitro antagonism of *Trichoderma viride* against five phytopathogens. **Pest Technology**, v. 5, n. 1, p. 59-62, 2011.

VRIEZE, M. et al. Volatile organic compounds from native potato-associated *Pseudomonas* as potential anti-oomycete agents. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1295, 2015.

WHEATLEY, R.; HACKETT, C.; BRUCE, A.; & KUNDZEWICZ, A. Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma spp.* inhibitory to wood decay fungi. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 39(2-3), p. 199-205, 1997.

XIE, S.; ZANG, H.; WU, H.; UDDIN, R. F.; GAO, X. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus strain* D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Molecular plant pathology**, v. 19, n. 1, p. 49-58, 2018.

YUAN, J. et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. *sp. cubense*. **Applied and environmental microbiology**, v. 01357, p. 12, 2012.

ZECHMAN, J. M., & LABOWS JR, J. N. Volatiles of *Pseudomonas aeruginosa* and related species by automated headspace concentration–gas chromatography. **Canadian journal of microbiology**, v. 31(3), p. 232-237, 1985.