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

**Efeito da inoculação de plantas de trigo com a rizobactéria
Azospirillum brasilense sobre o vírus do nanismo amarelo da cevada
(BYDV) e seu vetor *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae)**

Franciele dos Santos

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2019**

Franciele dos Santos
Licenciada em Ciências Biológicas

Efeito da inoculação de plantas de trigo com a rizobactéria *Azospirillum brasilense* sobre o vírus do nanismo amarelo da cevada (BYDV) e seu vetor *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURICIO SIMÕES BENTO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutora em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Santos, Franciele dos

Efeito da inoculação de plantas de trigo com a rizobactéria *Azospirillum brasilense* sobre o vírus do nanismo amarelo da cevada (BYDV) e seu vetor *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae) / Franciele dos Santos. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

73 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. PGPR 2. Biocontrole 3. Comportamento do vetor 4. Virose de plantas 5. Agentes de biocontrole I. Título

Aos meus pais Izaura e Moacir, minha tia Noemia e ao meu marido Walter por estarem sempre ao meu lado

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Moacir e Izaura e tias Noemia e Eliza por todo apoio, amor e confiança todos esses anos

Ao meu marido Walter por todo apoio amor e companheirismo.

Ao Prof. Dr. José Mauricio Simões Bento agradeço imensamente por todas as oportunidades, pela orientação, compreensão, apoio e paciência em todos esses anos.

À Prof^a Dra. Consuelo M. DeMoraes e ao Dr. Mark C. Mescher por todas as oportunidades, atenção, apoio e orientação.

A Prof^a. Dra. e grande amiga M. Fernanda G.V. Peñaflor, por toda ajuda, paciência, carinho, amizade e companheirismo acadêmico principalmente nas horas de desespero. Obrigada por sempre me lembrar que nossos princípios são muito mais importantes do que qualquer coisa. Sem o seu suporte nada disso estaria sendo concluído.

Ao Prof. Dr. Paul Paré por toda ajuda, risadas e ensinamentos.

À Prof^a. Dra. Maria Carolina Quecine Verdi, por sempre estar de portas abertas quando precisei, por todas as conversas e ajuda em todos esses anos.

Ao Dr. Douglas Lau da Embrapa trigo por toda ajuda e atenção em todos esses anos.

Aos amigos Alexandre Diniz, Ana Cristina Pelegrino, Fernando e Amanda Sujimoto pela amizade, carinho e atenção em todos esses anos, independente da distância e ausência.

À Rafaela e Patricia pela amizade nascida do trabalho que será levada pela vida afora, por todo apoio, risadas, choros e cafés.

Aos colegas de Laboratório e departamento: Mateus, Arodi, Felipe G., Felipe C., Fernando M., Amanda, Denise, Weliton, Talita, Diego, Flávia, Camilinha, Camila Costa, Natália, Fernando C., Fernando S., Mariana, Gustavo, Vitor e Mayara agradeço pela companhia, aprendizado e momentos juntos.

Aos colegas do laboratório de bioecologia e entomologia da ETH, Rupesh, Claude, James Sims, Nina, Foteini, JZ, Harriet, Corinne, Hannier, Lisa, Tobias and James Buckley, por toda ajuda, atenção, paciência e gentileza.

Ao Fernando (Luis Fernando Baldesin), técnico do departamento de solos da ESALQ, por me ajudar sempre que precisei.

E por fim, mas não menos importante, à toda a minha família, por todo apoio, compreensão e amor.

Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo.
Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.
Não viva de fotografias amareladas...
Continue, quando todos esperam que desistas.
Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.
Faça com que em vez de pena, tenham respeito por você.
Quando não conseguir correr através dos anos, trote.
Quando não conseguir trotar, caminhe.
Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.
Mas nunca se detenha.

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
REFERÊNCIAS	13
2. <i>Azospirillum brasilense</i> INTERROMPEM AS INTERAÇÕES TRIPARTIDAS ENTRE O VÍRUS DO NANISMO AMARELO DA CEVADA (BARLEY YELLOW DWARF VÍRUS - BYDV), <i>Rhopalosiphum padi</i> E PLANTAS DE TRIGO	17
RESUMO	17
ABSTRACT	17
2.1 Introdução	18
2.2 Materiais e métodos	20
2.2.1 Criação dos Insetos	20
2.2.2 Preparo das soluções bacterianas e inoculação das sementes	21
2.2.3 Obtenção e multiplicação do isolado viral BYDV-PAV	22
2.2.4 Infecção das plantas	23
2.2.5 Teste Elisa para confirmação da infectividade das plantas	24
2.2.6 Performance e produção de alados	25
2.2.7 Análise dos Fitohormônios	28
2.2.8 Análise estatística	29
2.3 Resultados	29
2.3.1 Performance e produção de alados	29
2.3.2 Performance das plantas	30
2.3.3 Análise dos fitohormônios	32
2.4 Discussão	36
2.5 Considerações finais	42
REFERÊNCIAS	42
3. INOCULAÇÃO COM A RIZOBACATÉRIA <i>Azospirillum brasilense</i> E SEUS EFEITOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE SELEÇÃO HOSPEDEIRA DO VETOR DO VÍRUS DO NANISMO AMARELO DA CEVADA (BARLEY YELLOW DWARF VIRUS - BYDV) <i>Rhopalosiphum padi</i> (L.) (Hemiptera: Aphididae) EM PLANTAS DE TRIGO	51
RESUMO	51

ABSTRACT	52
3.1 Introdução	52
3.2 Materiais e métodos	54
3.2.1 Criação dos Insetos	54
3.2.2 Bacterização das sementes	55
3.2.3 Infecção das plantas com o isolado viral BYDV-PAV	56
3.2.4 Preferência olfativa de ápteros de <i>Rhopalosiphum padi</i>	57
3.2.5 Preferência hospedeira e colonização por alados de <i>R. padi</i>	58
3.2.6 Análise estatística	59
3.3 Resultados	59
3.3.1 Preferência olfativa por ápteros de <i>Rhopalosiphum padi</i>	59
3.3.2 Preferência hospedeira e colonização por alados de <i>Rhopalosiphum padi</i>	62
3.4 Discussão	64
2.5 Considerações finais	68
REFERÊNCIAS	68

RESUMO

Efeito da inoculação de plantas de trigo com a rizobactéria *Azospirillum brasilense* sobre o vírus do nanismo amarelo da cevada (BYDV) e seu vetor *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae)

Com a crescente preocupação por práticas agrícolas mais sustentáveis, o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) tem recebido cada vez mais atenção por sua capacidade em melhorar a performance das plantas assim como aumentar sua resistência contra insetos e patógenos. Neste trabalho foi demonstrado que a inoculação de plantas de trigo com a rizobactéria *Azospirillum brasilense* reduziu alguns sintomas característicos de plantas infectadas pelo vírus do nanismo amarelo da cevada (BYDV), bem como a população do afídeo vetor, *Rhopalosiphum padi*, nessas plantas. A redução de alguns sintomas relacionados a doença foi associada à resistência sistêmica induzida, desencadeada pelo aumento nos níveis de ácido jasmônico, fitohormônio amplamente conhecido na indução de resistência por bactérias benéficas contra patógenos. Entretanto, não foi possível elucidar as vias de defesa que auxiliaram na diminuição da população do vetor. Adicionalmente, verificou-se que a inoculação bacteriana alterou os padrões de preferência hospedeira por ápteros não-virulíferos e virulíferos e alados de *R. padi*. Os dados apresentados nessa tese sugerem o grande potencial que a inoculação com *A. brasilense* pode ter no manejo do BYDV, influenciando não apenas o vírus, mas todo seu patossistema, uma vez que o crescimento populacional e o comportamento de seu vetor, *R. padi*, foram afetados pela interação BYDV-trigo-PGPR.

Palavras-chave: PGPR, Comportamento do vetor, Viroses de plantas, Agentes de biocontrole

ABSTRACT

Effect of wheat inoculation with the rhizobacterium *Azospirillum brasilense* on yellow dwarf barley virus (BYDV) and its vector *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae)

With the increasing concern for agricultural practices more sustainable, the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) has been received increasing attention for its ability to improve plant performance and increase plant resistance against insects and pathogens. In this work, it was demonstrated that the inoculation of wheat plants with the rhizobacteria *Azospirillum brasilense*, reduced some characteristic symptoms of plants infected by the barley yellow dwarf virus (BYDV), as well as the performance of its aphid vector, *Rhopalosiphum padi*. The reduction in disease severity was related to induced systemic resistance, triggered by the increase in the levels of jasmonic acid, phytohormone widely known to induce resistance by beneficial bacteria against pathogens. However, it was not possible to elucidate the pathways of defense involved in decrease the vector population. In addition, bacterial inoculation was found to affect the host preference of *R. padi* aptera non-viruliferous and viruliferous and alates. The data presented here suggest the great potential that the inoculation with *A. brasilense* can be in the management of BYDV, influencing not only the virus but all its pathosystem, considering that the population growth and the behaviour of its vector, *R. padi*, were affected by BYDV-wheat-PGPR interaction.

Keywords: PGPR, Vector behaviour, Plant viruses, Bio-control agents

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que até 2050 a população mundial será de aproximadamente 9 bilhões de pessoas, sendo necessário o aumento de até 100% na produção de alimentos. Entretanto, com a crescente urbanização, a área disponível para agricultura será reduzida e, neste cenário, a produtividade dos cultivos deverá ser otimizada (Godfray *et al.*, 2010; Godfray, 2014). Dessa maneira, há uma premente necessidade na intensificação de uma agricultura mais sustentável, com maiores rendimentos e, ao mesmo tempo, menos impacto ambiental (Garnett *et al.*, 2013).

O uso de plantas geneticamente modificadas (Azadi e Ho, 2010) e mudanças nos programas de melhoramento convencionais (Tester e Langridge, 2010) são sugeridas como as principais táticas para aumentar a produtividade agrícola (Godfray *et al.*, 2010), sem a dependência exclusiva de agroquímicos para controle de fitopatógenos e insetos praga. No entanto, o uso complementar e harmonioso de outras práticas, compondo o Manejo Integrado de Pragas (MIP) é necessário para manter as populações de pragas sob controle.

Uma estratégia promissora, principalmente em gramíneas, é o tratamento de sementes com microrganismos benéficos, especialmente rizobactérias promotoras de crescimento (ou PGPR, *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*), que colonizam as raízes e estabelecem interações mutualísticas com as plantas. Nas últimas décadas, o tratamento com PGPR têm se tornado um importante componente nas práticas agrícolas em muitos países (Bashan e Holguin, 1998; Perrig *et al.*, 2007). A colonização das raízes pelas PGPR promove um efeito positivo no crescimento e produtividade de muitas gramíneas (Vessey, 2003), não apenas pela fixação de N₂, mas também pela indução da resistência sistêmica, que resulta no aumento das defesas naturais das plantas contra patógenos (Perez-de-Luque *et al.* 2017), nematoides e insetos (Ramamoorthy *et al.*, 2001; Pineda *et al.*, 2015; Harun-Or-Rashid e Chung 2017).

A indução sistêmica da resistência induzida por PGPR é caracterizada, principalmente, por desencadear um estado de alerta nas plantas, dada pela expressão de genes associados à resistência induzida anteriormente ao ataque. Como resultado, as respostas relacionadas à defesa vegetal ocorrem de modo mais rápido e vigoroso após o ataque de patógenos ou insetos, otimizando assim as respostas de defesa das plantas (Van hulten *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2008), podendo assim, retardar o progresso de doenças virais em plantas (Ryu, Murphy, *et al.*, 2004; Shankar *et al.*, 2009), influenciar diretamente no desenvolvimento e comportamento de insetos praga (Zehnder *et al.*, 1997; Humberto Valenzuela-Soto *et al.*, 2010; Pineda *et al.*, 2012), ou indiretamente, por meio da atratividade de inimigos naturais (Pineda *et al.*, 2013). Entretanto,

tais benefícios podem variar de acordo com o grau de especialização do herbívoro (Van Oosten *et al.*, 2008) e especificidade da interação planta-PGPR (Gange *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2009).

Dentre os insetos, os afídeos são responsáveis pela transmissão de aproximadamente 50% dos vírus de plantas, sendo considerados os mais importantes vetores destes patógenos (Ng e Perry, 2004). No Brasil, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae) é uma das principais pragas na cultura do trigo, não só pelo dano direto, mas também por transmitir o ‘vírus do nanismo amarelo da cevada’ (ou BYDV - *Barley Yellow Dwarf Virus*), patógeno que causa uma das doenças de maior impacto econômico desta cultura (Miller e Rasochova, 1997) e em outros cereais de inverno no mundo (D’arcy e Burnett, 1995). O BYDV, assim como a maioria dos vírus pertencentes ao gênero Luteovirus (Luteiviridae), apresenta partículas virais isométricas com aproximadamente 25 nanômetros de diâmetro. O genoma viral é composto por fita de RNA simples e de sentido positivo (ssRNA+), apresentando cerca de 5600 nucleotídeos (Burnett, 1983). Considerando que não há medidas curativas após a infecção viral, são recomendados para o controle da doença, a utilização de cultivares resistentes (Miller e Rasochova, 1997), ou controle de seu agente vetor por meio da aplicação de inseticidas (Silva *et al.*, 2004).

Bactérias do gênero *Azospirillum* (Rhodospirillaceae) estão entre as PGPR mais estudadas e extensivamente comercializada no mundo (Hartmann e Bashan, 2009). O gênero *Azospirillum* compreende bactérias gram-negativas, microaerofílicas, não-fermentativas e quimio-organotróficas, pertencentes a subclasse alfa das proteobactérias (Mehnaz, 2015). Desde sua descoberta, há mais de 40 anos (Tarrand; Krieg e Dobereiner, 1978), estas têm sido isoladas da rizosfera de muitas gramíneas em todo mundo (Dobereiner e Day, 1975), sendo uma das mais estudadas bactérias associadas às plantas (Bashan e Holguin, 1997). São endofíticas facultativas (Baldani *et al.*, 1997), e apresentam um versátil metabolismo de carbono e nitrogênio, tornando-as adaptadas para se estabelecer no ambiente competitivo da rizosfera (Steenhoudt e Vanderleyden, 2000) e, por isso, importantes no fornecimento destes nutrientes para as plantas. Das 15 espécies já descritas (Reis; Dos Santos Teixeira; Pedroza, 2011), *Azospirillum lipoferum*, *A. amazonenses* e *A. brasilense* são as mais estudadas (Cardoso *et al.*, 2010). No Brasil, *A. brasilense* vem sendo amplamente utilizada na forma de inoculante comercial, nas culturas de milho e trigo (Hungria *et al.*, 2010).

Nesta última década a inoculação de gramíneas com bactérias do gênero *Azospirillum*, tem sido relacionada a redução da severidade dos sintomas característicos da infecção pelo BYDV em plantas de trigo (Al-Ani *et al.*, 2011). Entretanto, ainda não é conhecido se a colonização das raízes do trigo com PGPR tem influência direta sobre o comportamento dos

afídeos vetores do BYDV, uma vez que isto, pode determinar a incidência da doença na cultura. Ao mesmo tempo em que as defesas da planta contra herbívoros, podem ser incrementadas pela colonização das PGPR, afetando negativamente os afídeos.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar como a colonização pela PGPR (*A. brasilense*) em plantas de trigo pode afetar a performance e comportamento do afídeo vetor do BYDV, *R. padi*, assim como alguns sintomas da doença. Foram também investigados os possíveis mecanismos envolvidos nas interações planta-rizobactéria-insetos e planta-rizobactéria-BYDV por meio dos níveis de fitohormônios relacionados à resistência sistêmica induzida. Adicionalmente, avaliou-se o efeito da inoculação com *A. brasilense* sobre a atratividade de afídeos ápteros e alados de *R. padi* infectados ou não pelo BYDV, a fim de verificar os possíveis efeitos da bactéria na aquisição e transmissão neste patossistema.

REFERÊNCIAS

- Al-Ani RA, Adhab MA, El-Muadhidi MA, Al-Fahad MA (2011) Induced systemic resistance and promotion of wheat and barley plants growth by biotic and non-biotic agents against Barley yellow dwarf virus. **African Journal of Biotechnology** 10:12079-12084
- Azadi H, Ho P (2010) Genetically modified and organic crops in developing countries: A review of options for food security. **Biotechnology Advances** 28:160-168. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.11.003
- Backer R, Rokem JS, Ilangumaran G, Lamont J, Praslickova D, Ricci E, Subramanian S, Smith DL (2018) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in Plant Science* 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01473
- Baldani JJ, Caruso L, Baldani VLD, Goi SR, Dobereiner J (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry** 29:911-922. doi: 10.1016/s0038-0717(96)00218-0
- Bashan Y, Holguin G (1998) Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: Biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. **Soil Biology & Biochemistry** 30:1225-1228. doi: 10.1016/s0038-0717(97)00187-9
- Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 28:1327-1350. doi: 10.1007/s11274-011-0979-9
- Cassan F, Diaz-Zorita M (2016) *Azospirillum* sp in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology & Biochemistry** 103:117-130. doi: 10.1016/j.soilbio.2016.08.020
- Dal Cortivo C, Barion G, Visioli G, Mattarozzi M, Mosca G, Vamerali T (2017) Increased root growth and nitrogen accumulation in common wheat following PGPR inoculation: Assessment of plant-microbe interactions by ESEM. **Agriculture Ecosystems & Environment** 247:396-408. doi: 10.1016/j.agee.2017.07.006

D'Arcy CJ, Burnett PA (1995) **Barley yellow dwarf: 40 years of progress**. APS Press, St. Paul, MN (USA). 374 p. ISBN 0-89054-167-1

Dean JM, Mescher MC, De Moraes CM (2009) Plant-rhizobia mutualism influences aphid abundance on soybean. **Plant and Soil** 323:187-196. doi: 10.1007/s11104-009-9924-1

Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM (2008) Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle. **Plant Physiology** 146:818-824. doi: 10.1104/pp.107.113027

Fukami J, de la Osa C, Ollero FJ, Megias M, Hungria M (2018) Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology** 45:328-339. doi: 10.1071/fp17167

Gange AC, Brown VK, Aplin DM (2003) Multitrophic links between arbuscular mycorrhizal fungi and insect parasitoids. **Ecology Letters** 6:1051-1055. doi: 10.1046/j.1461-0248.2003.00540.x

Garnett T, Appleby MC, Balmford A, Bateman IJ, Benton TG, Bloomer P, Burlingame B, Dawkins D, Dolan L, Fraser D, Herrero M, Hoffmann I, Smith P, Thornton PK, Toulmin C, Vermeulen SJ, Godfray HCJ (2013) Sustainable Intensification in Agriculture: Premises and Policies. **Science** 341:33-34. doi: 10.1126/science.1234485

Godfray HCJ (2014) The challenge of feeding 9-10 billion people equitably and sustainably. **Journal of Agricultural Science** 152:S2-S8. doi: 10.1017/s0021859613000774

Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C (2010) Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science** 327:812-818. doi: 10.1126/science.1185383

Hartmann A, Bashan Y (2009) Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) - Special Issue. **European Journal of Soil Biology** 45:1-2. doi: 10.1016/j.ejsobi.2008.11.004

Harun-Or-Rashid M, Chung YR (2017) Induction of Systemic Resistance against Insect Herbivores in Plants by Beneficial Soil Microbes. **Frontiers in Plant Science** 8. doi: 10.3389/fpls.2017.01816

Humberto Valenzuela-Soto J, Gloria Estrada-Hernandez M, Ibarra-Laclette E, Paul Delano-Frier J (2010) Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development. **Planta** 231:397-410. doi: 10.1007/s00425-009-1061-9

Hungria M (2011) Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. Circular Técnica 325. **Embrapa Soja**, Londrina, p. 36. ISSN 1516-781X

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil** 331:413-425. doi: 10.1007/s11104-009-0262-0

Lee GH, Ryu CM (2016) Spraying of leaf-colonizing *Bacillus amyloliquefaciens* protects Pepper from Cucumber mosaic virus. **Plant Disease** 100:2099-2105. doi: 10.1094/pdis-03-16-0314-re

- Mehnaz S (2015) *Azospirillum*: A Biofertilizer for Every Crop. In: Arora NK (ed) **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. Springer India, New Delhi, pp 297-314. ISBN 978-81-322-2068-8
- Miller WA, Rasochova L (1997) Barley yellow dwarf viruses. **Annual Review of Phytopathology** 35:167-190. doi: 10.1146/annurev.phyto.35.1.167
- Okon Y, Labandera-Gonzales C, Lage M, Lage P (2015) Agronomic applications of *Azospirillum* and other PGPR. In: de Bruijn FJ (ed) **Biological nitrogen fixation**. Wiley, Hoboken. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch90>
- Orrelland P, Bennett AE (2013) How can we exploit above-belowground interactions to assist in addressing the challenges of food security? **Frontiers in Plant Science** 4. doi: 10.3389/fpls.2013.00432
- Perez-de-Luque A, Tille S, Johnson I, Pascual-Pardo D, Ton J, Cameron DD (2017) The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens. **Scientific Reports** 7. doi: 10.1038/s41598-017-16697-4
- Perrig D, Boiero ML, Masciarelli OA, Penna C, Ruiz OA, Cassán FD, Luna MV (2007) Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 75:1143-1150. doi: 10.1007/s00253-007-0909-9
- Pineda A, Soler R, Pozo MJ, Rasmann S, Turlings TCJ (2015) Editorial: Above-belowground interactions involving plants, microbes and insects. **Frontiers in Plant Science** 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00318
- Pineda A, Soler R, Weldegergis BT, Shimwela MM, Van Loon JJA, Dicke M (2013) Non-pathogenic rhizobacteria interfere with the attraction of parasitoids to aphid-induced plant volatiles via jasmonic acid signalling. **Plant Cell and Environment** 36:393-404. doi: 10.1111/j.1365-3040.2012.02581.x
- Pineda A, Zheng SJ, van Loon JJA, Dicke M (2012) Rhizobacteria modify plant-aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility. **Plant Biology** 14:83-90. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00549.x
- Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection** 20:1-11. doi: 10.1016/s0261-2194(00)00056-9
- Rockstrom J, Williams J, Daily G, Noble A, Matthews N, Gordon L, Wetterstrand H, DeClerck F, Shah M, Steduto P, de Fraiture C, Hatibu N, Unver O, Bird J, Sibanda L, Smith J (2017) Sustainable intensification of agriculture for human prosperity and global sustainability. **Ambio** 46:4-17. doi: 10.1007/s13280-016-0793-6
- Ryu CM, Murphy JF, Mysore KS, Kloepper JW (2004b) Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. **Plant Journal** 39:381-392. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02142.x

Shankar ACU, Nayaka SC, Niranjana-Raj S, Kumar HB, Reddy MS, Niranjana SR, Prakash HS (2009) Rhizobacteria-mediated resistance against the blackeye cowpea mosaic strain of Bean common mosaic virus in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Pest Management Science** 65:1059-1064. doi: 10.1002/ps.1791

Silva MTB, Costa EC, Balardin RS (2004) Cultivars reaction and efficiency of chemical control of aphids vectors of Barley yellow dwarf virus in wheat. **Ciência Rural** 34:1333-1340 (in Portuguese, with abstract in English). doi: 10.1590/S0103-84782004000500003

Smyrnioudis IN, Harrington R, Clark SJ, Katis N (2001) The effect of natural enemies on the spread of barley yellow dwarf virus (BYDV) by *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera : Aphididae). **Bulletin of Entomological Research** 91:301-306. doi: 10.1079/ber2001110

Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **Fems Microbiology Reviews** 24:487-506. doi: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x

Tarrand JJ, Krieg NR, Dobereiner J (1978) Taxonomic study of *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of anew genus, *Azospirillum* gen-nov and 2 species, *Azospirillum lipoferum* (beijerinck) comb nov and *Azospirillum brasilense* sp-nov. **Canadian Journal of Microbiology** 24:967-980. doi: NA

Tester M, Langridge P (2010) Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. **Science** 327:818-822. doi: 10.1126/science.1183700

van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103:5602-5607. doi: 10.1073/pnas.0510213103

Van Oosten VR, Bodenhausen N, Reymond P, Van Pelt JA, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CM (2008) Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 21:919-930. doi: 10.1094/mpmi-21-7-0919

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil** 255:571-586. doi: 10.1023/a:1026037216893

Zehnder G, Kloepper J, Yao CB, Wei G (1997) Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Economic Entomology** 90:391-396

2. *Azospirillum brasilense* PERTURBA AS INTERAÇÕES TRIPARTIDAS ENTRE O VÍRUS DO NANISMO AMARELO DA CEVADA (BARLEY YELLOW DWARF VIRUS - BYDV), *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae) E PLANTAS DE TRIGO

Franciele Santos¹; M. Fernanda G. V. Peñaflores²; Consuelo De Moraes³; Mark C. Mescher³; José Mauricio Simões Bento^{1*}

¹ Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, CP 09, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil

² Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CP 3037, Lavras, MG, 37200-000, Brasil

³ Department of Environmental Systems Science, ETH Zurich, Zurich 8092, Suíça

* José Mauricio Simões Bento, E-mail: jmsbento@usp.br; Telefone: +55 19 3429-4199; Fax: +55 19 3433-0562

RESUMO

A utilização de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPR) vem ganhando atenção nas últimas décadas, não apenas por melhorar a qualidade das plantas, mas também por sua promissora capacidade de controle de pragas e doenças. Este trabalho mostrou que a inoculação de plantas de trigo com diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense*, isoladas ou combinadas, reduziu a população de *Rhopalosiphum padi* (formas ápteras e aladas) em plantas infectadas pelo vírus do nanismo amarelo da cevada (*Barley Yellow Dwarf Virus*- BYDV-PAV). Foi demonstrado ainda, que a inoculação das plantas com a formulação comercial (FC) desenvolvida a partir das estirpes Ab-v5 e Ab-v6 de *A. brasilense* reduziu significativamente alguns sintomas característicos da infecção por BYDV. O aumento na concentração de JA indicaram que a redução nos sintomas da doença pode estar relacionada à resistência sistêmica induzida em resposta à inoculação das plantas com o tratamento bacteriano FC. Os resultados observados também sugerem que outros mecanismos podem estar envolvidos na redução da população de afídeos, uma vez que os fitohormônios analisados neste trabalho não explicaram a relação entre a inoculação com *A. brasilense* e a performance do vetor *R. padi*.

Palavra-chave: Biocontrole; Fitohormônios; Rizobactérias; Doenças virais

ABSTRACT

The use of plant growth promoting rhizobacteria has gained attention in the last decades not only for improving the quality of plants but also for their promising ability to control pests and diseases. Here we show that inoculation of wheat plants with different strains of *Azospirillum brasilense*, isolated or combined, indirectly reduced the population of *Rhopalosiphum padi* (aptera and winged forms) in plants infected with Barley yellow dwarf virus (BYDV-PAV). We also showed that inoculation of the plants with the commercial formulation (CF), developed with the bacteria *A. brasilense* (strains Ab-v5 and Ab-v6) significantly reduced the

characteristic symptoms evaluated here related to the BYDV infection. The increasing JA concentration indicates that the reduction in disease symptoms may be related to the induction induced systemic resistance (ISR) on plants in response to inoculation with the CF treatment. Our results also suggest that other mechanisms may be involved in the reduction of aphid population since the phytohormones analysed in this study do not explain the relationship between inoculation with *A. brasilense* and the performance of the BYDV vector *R. padi*.

Keywords: Biocontrol; Phytohormones; Rhizobacteria; Viral disease

2.1 Introdução

Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (*Plant growth-promoting rhizobacteria* - PGPR), são um grupo de bactérias que colonizam a rizosfera em associação simbiótica com diversas espécies de plantas, as quais tem gerado amplo interesse nas últimas décadas devido a sua capacidade de melhorar não apenas o crescimento das plantas, mas também seus níveis de defesa. A colonização por esse grupo de bactérias aumenta o crescimento das plantas via modulação de alguns hormônios vegetais como 3-indole ácido acético, citoquininas, auxinas e giberelinas (Nezarat e Gholami, 2009; Mia e Shamsuddin, 2010), assim como pela melhora em seu status nutricional via fixação associativa de nitrogênio, solubilização e absorção de fosfato e produção de fotossideróforos (Adesemoye *et al.*, 2009; Badri *et al.*, 2009; Richardson *et al.*, 2009). A associação com essas rizobactérias pode ainda promover um aumento da resistência contra microrganismos patogênicos que inibem o crescimento das plantas (Liu *et al.*, 1995; Haas e Defago, 2005), devido a síntese de antibióticos, enzimas ou compostos antifúngicos (Kurek e Jaroszuk-Scisel, 2003; Rais *et al.*, 2017). Além disso, a colonização por PGPR desencadeia a resistência sistêmica induzida (*Induced Systemic Resistance* – ISR), caracterizada por um estado de alerta das plantas dada pela expressão de genes associados à resistência induzida. Como resultado, a resposta de defesa das plantas são induzidas de forma mais rápida e intensa após a infecção por patógenos ou ataque de insetos, otimizando assim sua resposta defensiva (Van Hulten *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2008).

Apesar do aumento da resistência aos patógenos e herbívoros em plantas colonizadas por PGPR, ser extensivamente reportada na literatura (Raupach *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2000; Ryu, Murphy, *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2016), pouco se sabe sobre o efeito da colonização por PGPR sobre a resistência de plantas contra patógenos de plantas transmitidos por insetos, os quais estão entre os mais importantes, com infecções que se espalham rapidamente pelos agroecossistemas, promovendo redução no rendimento (Raupach *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2000; Zehnder *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2003; Ryu, Farag, *et al.*, 2004). Alguns estudos têm reportado que plantas colonizadas por essas bactérias são menos propensas

a serem infectadas por doenças transmitidas por vetores, e quando infectadas, exibem sintomas mais leves. Por exemplo, a colonização por *Bacillus pumilus* ou *B. subtilis* em plantas de feijão caupi conferiu maior proteção contra o vírus do mosaico do feijoeiro (*Bean Common Mosaic Virus* - BCMV), e quando combinadas as duas espécies conferiram maior proteção ao vírus do que quando inoculadas isoladamente (Shankar *et al.*, 2009). Da mesma forma, plantas de tomate colonizadas por duas estirpes de *Bacillus* também apresentaram maior resistência ao vírus do mosaico do pepino (*Cucumber Mosaic Virus* - CMV) (Murphy *et al.*, 2003). Embora esses estudos tenham mostrado que plantas colonizadas por PGPR sejam mais resistentes ao vírus dependentes de vetores para sua transmissão, os métodos de transmissão estudados se deram de maneira artificial, ou seja, a inoculação viral ocorreu de forma mecânica, não abordando desta forma o efeito das PGPR sobre as interações vetor-planta hospedeira e vírus.

Ao contrário das doenças que não necessitam de um vetor para sua transmissão, a dinâmica dos patossistemas envolvendo insetos vetores são dependentes de interações complexas entre a planta hospedeira, o vírus envolvido e seus vetores. Como a propagação desse grupo de vírus é dependente do comportamento de seus vetores, a infecção induz várias mudanças no metabolismo secundário da planta, as quais afetam as interações planta hospedeira-vetor (Mauck *et al.*, 2010; Mauck *et al.*, 2012; Mauck *et al.*, 2014). Em geral, mudanças na planta hospedeira induzidas pela infecção viral resultam no aumento de sua atratividade assim como aumento ou redução no tempo de adequação à planta e melhora na palatabilidade aos vetores, dependendo do modo de transmissão do vírus (Bosque-Perez e Eigenbrode, 2011; Mauck *et al.*, 2012). Assim, as alterações do hospedeiro induzidas pela infecção parecem estar envolvidas nos mecanismos pelos quais os vírus manipulam o comportamento e a biologia de seus vetores.

O vírus da nanismo amarelo da cevada (*Barley Yellow Dwarf Virus* - BYDV) causa uma das doenças mais amplamente distribuída e economicamente importante transmitida por pulgões em culturas de cereais do mundo (D'arcy e Burnett, 1995; Miller e Rasochova, 1997). Entre os vetores do BYDV-PAV, afídeos da espécie *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae) são os mais importantes nas culturas de trigo e cevada devido à sua eficiência de transmissão (Parizoto *et al.*, 2013). Considerando que não há medidas eficazes de tratamento após a infecção viral, as principais medidas de controle da doença são a utilização de cultivares resistentes (Miller e Rasochova, 1997), ou o controle químico de seu agente vetor (Perring *et al.*, 1999). Dado que a microbiota do solo é usualmente pobre nos agrossistemas (Hartmann *et al.*, 2015), o uso de PGPR como inoculante em cereais pode ser uma estratégia interessante a

ser incorporada no manejo do BYDV, podendo ainda incrementar a produtividade das culturas (Okon e Labanderagonzalez, 1994; Hungria *et al.*, 2010; Piccinin *et al.*, 2013).

O gênero *Azospirillum* (Rhodospirillaceae) é um grupo de PGPR com grande potencial para ser utilizado em culturas de cereais, sendo um dos grupos mais estudados e comercializados como inoculantes na América, Europa e Ásia (Hartmann e Bashan, 2009). No Brasil, a combinação de duas estirpes de *Azospirillum brasilense* (Ab-v5 and Ab-v6) tem sido amplamente usada em inoculantes comerciais como indutores de crescimento nas culturas do milho e trigo (Hungria *et al.*, 2010). Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito de sua colonização sobre as interações inseto-planta-patógeno.

Desta forma, no presente trabalho avaliou-se como a colonização pela PGPR *A. brasilense* afeta o patossistema envolvendo plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), o vírus BYDV-PAV e seu vetor, o pulgão *R. padi*. Neste caso, foram comparados o efeito da colonização de duas estirpes mais utilizadas (Ab-v5 e Ab-v6), isoladas ou co-inoculadas, sobre alguns sintomas característicos do BYDV assim como seu efeito sobre o vetor *R. padi*. Foram avaliados ainda a modulação dos níveis de ácido jasmônico e ácido salicílico, importantes fitohormônios envolvidos na regulação das respostas de defesa induzidas da planta em resposta a infecção pelo BYDV e herbivoria por *R. padi*.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Criação dos insetos

Afídeos não virulíferos de *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae) foram originalmente obtidos a partir de criações mantidas pelo Instituto Julius Kuehn (JKI- Qued limburgo, Germany) (utilizados para os ensaios de performance dos ápteros e caracteres agronômicos das plantas) e Embrapa Trigo (Passo Fundo, RS, Brasil) (utilizados para os ensaios de produção de alados e fitohormônios). As colônias de afídeos foram criadas em plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) com aproximadamente 35 dias de idade, livres de vírus, acondicionadas em gaiolas de polietileno as quais foram mantidas em sala com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ RH), fotoperíodo 12L:12E, e intensidade de luz de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ no período diurno. As plantas foram trocadas a cada duas semanas e regularmente examinadas usando teste sorológico DAS-ELISA para garantir que as colônias se mantinham livres do vírus.

2.2.2 Preparo das soluções bacterianas e inoculação das sementes

As estirpes Ab-v5 e Ab-v6 da bactéria *Azospirillum brasilense* foram originalmente obtidas no Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" (ESALQ/USP, Piracicaba, Brasil). Para o preparo das suspensões bacteriana inicialmente as estirpes foram multiplicadas em tubos de ensaio previamente autoclavados contendo 5 mL de meio de cultura líquido DYGS (*Dextrose Yeast Glucose Sucrose*) (Döbereiner *et al.*, 1995), incubados à 28°C e mantidos em agitação à 150 RPM por 24h. Ao termino deste período o conteúdo foi então vertido em Erlenmeyer (50 mL) contendo 25 mL do mesmo meio e incubado novamente nas mesmas condições anteriores. O crescimento bacteriano foi monitorado a partir da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm, e a densidade de células ajustada para 1×10^8 UFC/mL⁻¹ (OD₆₀₀=0.6).

Para a inoculação das sementes, a cultivar de trigo Quartzo® (*Triticum aestivum* L.) foi utilizada por já ter apresentado interação positiva com *A. brasilense* (Bazzanezi *et al.*, 2011) assim como ser moderadamente suscetível ao vírus BYDV-PAV (Lau *et al.*, 2011) facilitando assim a observação dos sintomas da doença. Antes do plantio, as sementes foram desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos (Fig. 1A), seguido por dupla lavagem com água destilada. Para a bacterização, as sementes foram mantidas nas soluções bacterianas contendo as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 isoladas ou co-inoculadas (Ab-v5+Ab-v6), ou inoculadas com formulação comercial líquida (FC) (formulação protegida por acordo industrial) (Nitro 1000 Inoculantes Biológicos, Cascavel, PR, Brasil) contendo ambas as estirpes (Ab-v5+Ab-v6 – 50/50%) por 30 minutos (Fig. 1C). Meio de cultura DYGS foi usado para os tratamentos sem bactéria (Controle). As sementes foram então semeadas (1 semente/ vaso) em vasos de 1L contendo substrato Basaplant (Base Agro, Artur Nogueira, SP, Brasil) previamente esterilizado. As plantas foram diariamente regadas com água esterilizada e suplementadas com solução de micronutrientes (NPK 20:20:20) uma semana após o plantio.

Figura 1. Processo de desinfestação superficial e inoculação das sementes de trigo. A: Desinfestação das sementes em solução de hipoclorito de sódio 5%; B: Soluções bacterianas das estirpes isoladas ou combinadas de *Azospirillum brasilense* (1×10^8 CFU/mL¹); C: Bacterização das sementes.

2.2.3 Obtenção e multiplicação do isolado viral BYDV-PAV

O inóculo viral foi originalmente obtido por meio de afídeos virulíferos oriundos de banco de plantas infectadas mantidas pelo Laboratório de Entomologia e Virologia da Embrapa Trigo (Passo Fundo, RS, Brasil). Para a multiplicação viral e obtenção de plantas fonte, os insetos virulíferos foram mantidos em plantas de cevada e trigo (7 dias de idade) para alimentação e inoculação viral. Após 72 horas os insetos foram removidos com auxílio sugador entomológico e as plantas transferidas para sala climatizada ($20 \pm 1^\circ\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ RH), fotoperíodo 12L:12D, e intensidade de luz de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Trinta e cinco dias após a

inoculação as plantas foram submetidas ao teste sorológico DAS-ELISA (*Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) utilizando-se de anticorpo policlonal específico para BYDV-PAV (Agdia Inc, Elkhart, IN, USA) para confirmação da infecção. As plantas com resultado positivo para BYDV-PAV foram então mantidas como plantas fonte. A cada duas semanas novas plantas foram infectadas garantindo a assim manutenção do inóculo viral.

2.2.4 Infecção das plantas

Sete dias após o tratamento das sementes, plântulas de trigo foram inoculadas com o isolado viral BYDV-PAV. Para tanto, dez afídeos virulíferos (insetos mantidos previamente se alimentando em plantas fonte por 72h) foram mantidos em contato com as plantas por 72 horas, permitindo assim a alimentação dos insetos e a inoculação do vírus (Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger, Zemetra, *et al.*, 2004). A fim de evitar a fuga dos insetos, as plantas foram cobertas com gaiolas de acrílico com abertura superior coberta por tecido de “voile” permitindo a circulação do ar (Fig. 2A, B). Simultaneamente, o mesmo procedimento de inoculação viral foi realizado com as plantas do tratamento de pré-indução (PI) (ou falsa inoculação), porém utilizando afídeos não-virulíferos.

Figura 2. Período de acesso a inoculação viral (BYDV-PAV) via alimentação pelo afídeo vetor *Rhopalosiphum padi*. A, B: Gaiolas de acrílico mantidas sobre as plantas de trigo a fim de evitar a fuga dos insetos.

Após 72 horas os insetos foram removidos e as plantas mantidas em sala climatizada (temperatura $18^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR; fotoperíodo 12L: 12D; intensidade de luz de 200

$\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) (Fig. 3). Quinze dias após o período de inoculação as plantas foram utilizadas para a condução dos experimentos.

Figura 3. Sala climatizada utilizada para cultivo e manutenção das plantas de trigo. Temperatura $18^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR; fotoperíodo 12L: 12D. Intensidade de luz de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ provida por lâmpadas próprias para cultivo de plantas (Philips - Green Power Led DR/W 18W 220-240V 50/60HZ).

2.2.5 Teste Elisa para confirmação da infectividade das plantas

Após o término de cada experimento todas as plantas foram submetidas ao teste duplo sanduiche DAS-ELISA (*Double-Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Agdia Inc, Elkhart, IN, USA) a fim de verificar a presença ou ausência da infecção por BYDV-PAV. Para tanto, 100mg de material vegetal (Fig. 4A) foi coletado e armazenado em freezer -20°C até o momento das análises.

Para início da reação as amostras foram maceradas e diluídas na razão 1:10 (peso da amostra/volume) em 1mL de solução tampão de extração (Fig. 4B). A solução resultante de cada amostra ($100\mu\text{L}/\text{poço}$) foi então transferida para os poços na placa de microtitulação (Fig. 4C) previamente revestida com $100\mu\text{L}/\text{poço}$ de anti-soro diluído em tampão de cobertura na concentração de $0.5\mu\text{L}/\text{mL}$. Para cada etapa descrita, as placas foram incubadas a 4°C durante 24h, e posteriormente lavadas com solução de lavagem de 4 a 5 vezes. Posteriormente, os poços foram preenchidos com $100\mu\text{L}$ de solução contendo enzima conjugada alcalina fosfatase e anticorpos de detecção (Anticorpo-BYDV-PAV; Anti-rato para BYDV-PAV). Após 2h de

incubação a 37°C a placa foi novamente lavada com solução geral de lavagem e completamente seca. A seguir, 100µL/poço de antígeno foi adicionado a placa que foi posteriormente incubada em temperatura ambiente.

As reações foram avaliadas mensurando-se a absorbância em espectrofotômetro ajustado com absorbância de 405nm (Fig. 4D). Amostras com absorbância de 3 vezes a média dos controles negativos foram consideradas positivas para BYDV-PAV.

Figura 4. Processo de análise DAS-ELISA, a fim de verificar a presença ou ausência da infecção por BYDV-PAV em plantas de trigo. A: material vegetal coletado para análise; B: amostras após serem trituradas e diluídas com solução geral de extração; C: placa de microtitulação após ser preenchida com as amostras vegetais; D: início da reação alcalina fosfatase.

2.2.6 Performance e produção de alados

A fim de garantir que todas as plantas fossem inicialmente infestadas com insetos da mesma idade, três dias antes do início dos bioensaios, adultos de *R. padi* foram individualizados em caixas de acrílico contendo papel absorvente umedecido e segmentos foliares de cevada (Fig. 5A). Após 12 horas as ninfas nascidas neste período (Fig. 5B) foram transferidas para plantas de cevada livres de vírus, onde permaneceram até o início dos ensaios.

Figura 5. Processo de aquisição de ninfas de *Rhopalosiphum padi* com mesma idade para infestação das plantas de cevada para os ensaios de performance. A: Gaiolas de acrílico contendo segmentos foliares de cevada; B: Ninfas nascidas durante as 12 horas de confinamento dos adultos.

A performance dos afídeos foi avaliada em ensaios sem chance de escolha com base no crescimento populacional em plantas infectadas (PI+BYDV, AbV5+PI+BYDV, AbV6+PI+BYDV, AbV5/6+PI+BYDV e FC+PI+BYDV), e não infectadas (Controle, PI, AbV5, AbV6, AbV5/6, FC, AbV5+PI, AbV6+PI, AbV5/6+PI e FC+PI). As plantas foram inicialmente infestadas com 10 afídeos de segundo instar por planta, cobertas com sacos de ‘voile’ a fim de evitar a fuga dos insetos (Fig. 6A), e mantidas em câmara de crescimento (temperatura $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR; fotoperíodo 12L: 12E; intensidade de luz de $200 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$). Doze dias após a infestação inicial o número de afídeos em cada planta foi avaliado. Considerando o grande número de plantas e a dificuldade em quantificar os insetos devido a tamanho das colônias formadas (Fig. 6B), e a fim de evitar erros de contagem, os afídeos foram totalmente removidos das plantas com o auxílio de um sugador entomológico e transferidos para tubos de vidro (5mL) devidamente etiquetados e contendo álcool 70%. Os afídeos foram então quantificados com o auxílio de microscópio estereoscópico (Bel Photonics, modelo SZT). Após o fim do experimento, as seguintes características agronômicas foram avaliadas: número de perfilhos por planta, peso seco das folhas e raízes, os quais foram mensurados após o material ser seco em estufa microprocessadora de secagem (Quimis 0317M-22) por 72h à 48°C .

Figura 6. Ensaio de performance de *Rhopalosiphum padi* e produção de alados: A: Plantas de trigo utilizadas no ensaio de performance dos afídeos; B: Colônia de afídeos com doze dias após a infestação inicial; C: Plantas de cevada utilizadas nos ensaios de produção de alados. Todas as plantas foram cobertas com tecido de 'voile' para evitar a fuga dos insetos.

Em um segundo experimento, usando os mesmos procedimentos experimentais descritos para o ensaio de performance (Fig. 6C), o número de afídeos alados foi avaliado 18 dias após a infestação inicial. Para este bioensaio apenas o número de alados foi registrado.

Para ambos os experimentos (performance e produção de alados) foram realizadas 20 repetições por tratamento. Ao final do bioensaio, todas as plantas foram analisadas para confirmação da infecção viral por meio do teste DAS-ELISA. Plantas dos tratamentos sem vírus que foram confirmadas como vírus-positivas, assim como plantas dos tratamentos com vírus que foram confirmadas como vírus-negativas, foram eliminadas das análises. A colonização bacteriana das raízes também foi avaliada pela remoção de toda sessão radicular que, após lavagem em água corrente, foi mantida em meio de cultura seletivo, submetido a diluição seriada e plaqueamento em meio de cultura DYGS sólido. Plantas dos tratamentos sem bactéria

que foram confirmadas como colonizadas pela bactéria, assim como plantas dos tratamentos bacterianos que não apresentaram colonização, foram eliminadas das análises.

2.2.7 Análise dos Fitohormônios

Para a análise dos fitohormônios em plantas submetidas aos tratamentos previamente mencionados no tópico 2.2.6, cerca de 100 gramas de tecido vegetal foram coletados 2,5 cm acima da base da planta (região do colmo) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e triturados com auxílio de seis esferas de metal em moinho automático de moagem (Bead Ruptor12, Omni International). Uma alíquota de 100 ng de cada padrão isotópico, dH-JAe 2H6-SA foram adicionados a cada amostra, assim como 400 µL de solução de extração (1-propanol/dH₂O/HCl; 2:1:0,05, vol/vol). As amostras foram então mantidas por 30 segundos em agitador vortex, adicionando posteriormente 1 mL de diclorometano em cada amostra, que foram então agitadas novamente e centrifugadas por 1 min a 13.000 rpm. Após a centrifugação, a fase orgânica (diclorometano/1-propanol) foi então transferida para um novo vial (4 mL), seca em fluxo de ar contínuo (0.5 mL/min) e derivatizada, adicionando 100 µL de solução dietil éter e metanol (1:9) e 2.3 µL de Trimethylsilyldizomethane (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Após 25 min o processo de derivatização foi interrompido pela adição de 2,3 µL de solução hexano/ácido acético (88:12). Após um segundo período de encubação (25 min), a extração da fase de vapor (vapor phase extraction) foi conduzida usando colunas de polímero absorvente Haysep® (30 mg, Supelco, PA, USA) como descrito em (Schmelz *et al.*, 2003) e adaptado por (Penaflor *et al.*, 2016). Os filtros foram então eluídos com 150 µL de diclorometano.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso (GC-MS- Shimadzu Quadrupolo QP2010 Ultra) usando hélio como gás de arraste (fluxo: 1,30 mL/min) e coluna capilar apolar HP1 (0,25 mm diâmetro interno; 0,25 µm espessura do filme; 30 m comprimento). Um microlitro de cada amostra foi injetado em modo de ionização química (Chemical Ionization Mode-CI) com monitoramento de íons selecionados (Select Ion Monitoring -SIM). A coluna capilar (HP1) foi mantida por 1 min à 40°C, aumentando 15°C/min até 250 °C, mantendo-se a essa temperatura por 15 min. Os picos foram identificados por meio do monitoramento da intensidade dos íons assim como pelo tempo de retenção dos ésteres metílicos $[M + H]^+$ dos hormônios naturais (SA: íons 153 – 7,5 min, $[M + H]^+$ + íons 157 – 7,6 min; JA: 225 – 11,7 min, $[M + H]^+$ + íon 227 – 11,9 min). A quantificação foi calculada em relação aos padrões isotópicos relativos e corrigida com base no peso original de cada amostra.

2.2.8 Análise estatística

Inicialmente os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett foram usados a fim de determinar a normalidade e homogeneidade dos dados. Os dados de todos os experimentos foram então comparados usando o teste one-way ANOVA seguido pelo *post hoc* LSD de Fisher (*Fisher's Least significant Difference*). Os dados que não atenderam ao pressuposto de normalidade e homogeneidade paramétrico foram analisados pelo teste não-paramétrico de comparação de médias Kruskal-Wallis one-way ANOVA. Os testes t de Student ou a versão não-paramétrica, o teste Wilcoxon *rank sum test*, foram usados para comparar os níveis de fitohormônio entre plantas não danificadas e danificadas pela alimentação dos afídeos.

2.3 Resultados

2.3.1 Performance e produção de alados

O número de ápteros (Fig. 7A; ANOVA seguida pelo teste LSD post-hoc; $F_{162-14}=3,431$, $P<0,001$) e alados (Fig. 7B; ANOVA seguida pelo teste LSD post-hoc; $F_{153-14}=1,796$, $P=0,043$) de *R. padi* foi significativamente maior em plantas de trigo BYDV-infectadas em relação a plantas controle e pré-induzidas (PI). A inoculação com os tratamentos bacteriano Ab-v5 (Ab-v5+PI+BYDV), Ab-v6 (Ab-v6+PI+BYDV) e CF (CF+PI+BYDV) reduziram os efeitos da infecção viral sobre o crescimento das colônias de afídeos uma vez que o número de ápteros e alados foi maior em plantas que foram infectadas apenas pelo vírus (Fig. 7A, B).

Adicionalmente, a interação planta-vírus-bactéria (para todas as estirpes bacterianas isoladas ou combinadas) apresentaram redução na produção de alados quando comparadas às plantas apenas vírus-infectadas (PI+BYDV), não diferindo, entretanto, de plantas controle e PI (Fig. 7B). Curiosamente, plantas inoculadas com a estirpe Ab-v6 (Ab-v6 e Ab-v6+PI) apresentaram maior número de afídeos alados que plantas controle e PI (Fig. 7B).

Figura 7. Performance de *Rhopalosiphum padi* em plantas de trigo submetidas a inoculação com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 da bactéria *Azospirillum brasilense* isoladas ou combinadas ou com a formulação comercial (FC), seguidas ou não pela pré-indução por afídeos não-virulíferos (PI) ou inoculação do vírus BYDV-PAV por meio da alimentação de afídeos virulíferos (PI+BYDV). A: número médio de formas ápteros de *R. padi*; B: número médio de formas aladas de *R. padi*. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo *post hoc* LSD de Fisher, $P < 0,05$.

2.3.2 Performance das plantas

Apesar da infecção viral ter afetado negativamente o número de perfilhos produzidos pelas plantas, assim como reduzido o peso seco de folhas e raízes, não foram observadas diferenças estatísticas entre plantas infectadas (PI+BYDV), plantas controle e PI (Fig. 8A, B, C).

Para o número de perfilhos, o mesmo padrão foi observado para todos os tratamentos bacterianos, com exceção dos tratamentos FC, FC+PI e FC+PI+BYDV, que apresentaram

significativamente maior quantidade de perfilhos comparados a PI+BYDV (Fig. 9A; Kruskal-Wallis *on ranks*; $df=14$, $H=64,246$, $P<0,001$).

O peso seco das folhas também foi negativamente afetado pela infecção viral (PI+BYDV), entretanto, apenas plantas dos tratamentos Ab-v5, Ab-v5+PI, Ab-v5/6, FC, FC+PI e FC+PI+BYDV apresentaram significativo maior peso seco de folhas em relação a PI+BYDV e aos demais tratamentos (Fig. 9B; Kruskal-Wallis *on ranks*; $df=14$, $H=60,379$, $P<0,001$). O mesmo padrão foi observado para o peso seco das raízes, o qual apresentou significante redução em plantas dos tratamentos PI+BYDV, Ab-v6+PI+BYDV e Ab-v5/6+PI+BYDV (Fig. 9C; ANOVA seguida pelo teste LSD post-hoc; $F_{162-14}=14,86$, $P<0,001$).

Figura 8. Raízes de plantas de trigo submetidas aos tratamentos controle e aos tratamentos com diferentes estirpes bacterianas: A: Abv5; B: Abv6; C: Abv5/6; D: formulação comercial (FC).

Figura 9. Performance de plantas de trigo submetidas a inoculação com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 da bactéria *Azospirillum brasilense* isoladas ou combinadas ou com a formulação comercial (FC), seguidas ou não pela pré-indução por afídeos *Rhopalosiphum padi* não-virulíferos (PI) ou inoculação do vírus BYDV-PAV por meio da alimentação de afídeos virulíferos (PI+BYDV). A: número médio de perfilhos; B: peso seco médio ($\pm$ EP) das folhas; C: Peso seco médio ($\pm$ EP) das raízes. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo *post hoc* LSD de Fisher, $P < 0,05$.

2.3.3 Análise dos fitohormônios

A infecção viral em plantas de trigo (PI+BYDV) induziu o aumento dos níveis dos fitohormônios ácido salicílico e jasmônico (Salicylic Acid - SA e Jasmonic Acid - JA) em

comparação com plantas controle e PI (Fig. 10A, B). Em geral, a inoculação bacteriana aumentou os níveis constitutivos de JA, mas não de SA em comparação com plantas controle e PI (Fig. 10A, B). Em contraste, o efeito da inoculação bacteriana na resposta da planta à herbivoria ou a infecção viral diferiu entre as estirpes ou combinações testadas. A inoculação com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 apresentou um padrão semelhante de aumento dos níveis de SA em resposta à infecção por BYDV. Em relação à co-inoculação (Ab-v5+Ab-v6) e à inoculação com a formulação comercial (CF), nem a pré-indução nem a infecção por BYDV alteraram os níveis de SA (Fig. 10A; ANOVA seguido de LSD - hoc; $F_{85-14} = 3,472$, $P < 0,001$). Por outro lado, a inoculação bacteriana, independente da estirpe ou combinações de estirpes, seguida ou não pela pré-indução ou inoculação viral, apresentaram maiores níveis de JA em relação a plantas controle. No entanto, devido a variabilidade dos dados, os níveis de JA foram estatisticamente semelhantes entre os tratamentos (Fig. 10B; Kruskal-Wallis nas classificações; $gl = 14$, $H = 28,459$, $P = 0,01$).

A alimentação de afídeos induziu o aumento nos níveis de JA, mas não de SA em plantas controle e PI (Fig. 12B, B). Entretanto, a herbivoria pelo vetor não afetou significativamente os níveis de JA em plantas infectadas pelo BYDV (PGPR-inoculado ou tratamentos não-inoculado) (Fig. 11B; teste de Kruskal-Wallis *on ranks*, $df = 14$, $H = 12,395$, $P = 0,574$). No entanto, um padrão semelhante para os níveis de SA de tratamentos não danificados, em que SA foi maior em infectados por BYDV do que em controles, também foi observado para os tratamentos danificados por pulgão, não inoculados e inoculados com Ab-v6. Os tratamentos inoculados com Ab-v5 e inoculados com FC tiveram os mesmos níveis de SA, independentemente de estarem ou não infectados por BYDV (Fig. 11B; ANOVA seguido de post-hoc LSD; $F_{96-14} = 2,805$, $P < 0,001$).

Comparações entre as plantas do trigo não danificadas e danificado-afídeos mostrou que a herbivoria pelos pulgões em plantas dos tratamentos Ab-v6 induziu o aumento dos níveis de SA (Fig. 12A; teste t, $df = 15$, $F = 2,71$, $P = 0,016$), assim como em plantas de todos os tratamentos inoculados com FC (Fig. 12A; FC: teste t; $df = 13$; $F = 3,01$; $P = 0,010$; FC + PI: teste t; $df = 9$; $F = 2,42$; $P = 0,038$; FC + PI + BYDV: teste t; $df = 12$; $F = 2,59$; $P = 0,023$). Com exceção das plantas controle (Fig. 12B; Wilcoxon *rank sum test*, $W = 42$, $P = 0,044$), os níveis de JA não foram alterados em resposta à alimentação do afídeo nos demais tratamentos. Para aqueles tratamentos que os níveis de SA foram maiores em resposta ao dano do pulgão (Ab-v6, CF, CF+PI e CI+PI+BYDV), observamos uma tendência a níveis reduzidos de JA, sugerindo uma interação antagônica entre as vias de sinalização de SA e JA. Entretanto,

provavelmente devido à alta variabilidade nos níveis de JA, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Figura 10. Níveis dos fitohormônios ácido salicílico (Salicylic acid – SA) jasmônico (Jasmonic acid – JA) em plantas submetidas a inoculação com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 da bactéria *Azospirillum brasilense* isoladas ou combinadas ou com a formulação comercial (FC), seguidas ou não pela pré-indução por afídeos *Rhopalosiphum padi* não-virulíferos (PI) ou inoculação do vírus BYDV-PAV por meio da alimentação de afídeos virulíferos (PI+BYDV). Plantas não foram submetidas a alimentação por afídeos antes da coleta do material vegetal. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo *post hoc* LSD de Fisher (SA), ou Kruskal-Wallis (JA), $P>0,05$.

Figura 11. Níveis dos fitohormônios ácido salicílico (Salicylic acid – SA) jasmônico (Jasmonic acid – JA) em plantas submetidas a inoculação com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 da bactéria *Azospirillum brasilense* isoladas ou combinadas ou com a formulação comercial (FC), seguidas ou não pela pré-indução por afídeos *Rhopalosiphum padi* não-virulíferos (PI) ou inoculação do vírus BYDV-PAV por meio da alimentação de afídeos virulíferos (PI+BYDV). 72h antes da coleta do material vegetal as plantas foram submetidas a alimentação por afídeos. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste one-way ANOVA seguido pelo *post hoc* LSD de Fisher (SA), ou Kruskal-Wallis (JA), $P > 0,05$.

Figura 12. Indução dos fitohormônios ácido salicílico (*Salicylic acid* – SA) e ácido jasmônico (*jasmonic acid*- JA) em planta submetidas a inoculação com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 da bactéria *Azospirillum brasilense* isoladas ou combinadas ou com a formulação comercial (FC), seguidas ou não pela pré-indução por afídeos *Rhopalosiphum padi* não-virulíferos (PI) ou inoculação do vírus BYDV-PAV por meio da alimentação de afídeos virulíferos (PI+BYDV). Comparações feitas entre plantas danificadas ou não pela herbívoros por adultos de *R. padi* para cada tratamento isoladamente. Asteriscos indicam diferença significativa de acordo com o teste t (paramétrico) ou Wilcoxon rank sum test (não-paramétrico), $P > 0,05$.

2.4 Discussão

Efeitos como estímulo no crescimento e melhora do vigor de plantas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* – PGPR) são amplamente conhecidos (Levanony e Bashan, 1989; Okon e Labanderagonzalez, 1994; Dobbelaere *et al.*, 1999; Dobbelaere *et al.*, 2001; Ramamoorthy *et al.*, 2001; Vessey, 2003). Adicionalmente, diversos trabalhos mostram ainda que a colonização de plantas por diversas

PGPR podem conferir resistência contra patógenos e insetos (Benhamou *et al.*, 1996; Ramamoorthy *et al.*, 2001). Entretanto, o efeito desse grupo de bactérias sobre vírus de plantas transmitidos por insetos vetores, os quais interagem com o hospedeiro de forma mais complexa em relação a vírus que independem de vetores para sua transmissão permanece desconhecido. Neste trabalho, examinou-se o efeito da colonização por diferentes estirpes da bactéria *A. brasilense* sobre o vírus do nanismo amarelo da cevada (*Barley Yellow Dwarf Virus* - BYDV-PAV) transmitido pelos afídeos da espécie *R. padi* em plantas de trigo, avaliando ainda os efeitos da inoculação bacteriana sobre as interações planta-vírus-vetor assim como seus efeitos sobre as defesas das plantas.

A inoculação das sementes com *A. brasilense* aumentou a biomassa das raízes em comparação às plantas controle, PI e plantas BYDV-infectadas (Fig. 9C), entretanto não apresentaram melhora nos parâmetros da parte aérea (Fig. 9A, B). Considerando que as avaliações dos parâmetros das plantas foram feitas nos estágios iniciais do desenvolvimento da cultura (afilhamento), não detectamos a promoção do crescimento da parte aérea das plantas bacterizadas. Além disso, um sistema radicular mais desenvolvido em plantas inoculadas com PGPR poderá ainda resultar em maior biomassa na parte aérea em estágios posteriores de desenvolvimento.

Adicionalmente aos efeitos de promoção do crescimento das plantas, a associação entre as plantas de trigo e algumas estirpes de *A. brasilense*, inoculadas isoladamente ou combinadas, provavelmente confere proteção contra a infecção por BYDV via interrupção das interações entre o vírus BYDV-PAV, seu vetor *R. padi* e o hospedeiro, como discutidos a seguir.

Inoculação com diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense* atenua os sintomas da infecção por BYDV em trigo

De maneira geral, a infecção das plantas por BYDV-PAV afeta a translocação de produtos da fotossíntese, causando cloroses, crescimento atrofiado dos sistemas radicular e foliar, redução no número de perfilho, e, consequentemente, perdas no rendimento da cultura (Orlob e Arny, 1961; Jensen e Vansambe.Jw, 1972; Baltenberger *et al.*, 1987). Nosso estudo mostrou que a inoculação das sementes com alguns tratamentos bacterianos atenuou os primeiros sintomas da infecção por BYDV. Embora não estatisticamente significativo, a infecção por BYDV reduziu o peso seco da parte aérea de plantas de trigo assim como o número de perfilhos e, em menor grau, a biomassa das raízes, entretanto a inoculação com a estirpe bacteriana Ab-v5 e com a formulação comercial (FC) atenuaram esses sintomas. Plantas

infectadas por BYDV e inoculadas com Ab-v5 (Ab-v5+PI+BYDV) apresentaram aproximadamente 35% mais perfilhos e 57% maior peso seco da parte aérea do que plantas apenas infectadas por BYDV. De fato, outros estudos mostraram o efeito benéfico da inoculação com *Azospirillum* sobre alguns sintomas relacionados a doenças (Zehnder *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2003; Al-Ani *et al.*, 2011). Anteriormente, (Al-Ani *et al.*, 2011) mostraram que, embora uma única inoculação de *Azospirillum irakense* em trigo não fosse eficaz para reduzir os efeitos da infecção por BYDV em campo, quando o inoculante foi aplicado antes e após a infecção, os sintomas foram reduzidos. Apesar disso, o mecanismo envolvido nessa interação não foi investigado.

O aumento nos níveis de ácido jasmônico (*Jasmonic Acid* – JA) constitutivo observado em plantas inoculadas com FC sugere que houve indução de resistência sistêmica (*Induced Systemic Resistance* - ISR), mecanismo de defesa de plantas amplamente conhecido por ser ativado após a colonização das plantas por diversas espécies de PGPR (Liu *et al.*, 1995; Raupach *et al.*, 1996; Zehnder *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998). Indução da ISR por PGPR são em geral caracterizadas e dependentes das vias de sinalização do JA (Van Loon *et al.*, 1998; Ryu *et al.*, 2003; Pozo *et al.*, 2004; Ryu, Farag, *et al.*, 2004; Ryu, Murphy, *et al.*, 2004; Dicke *et al.*, 2009), embora vias de sinalização dependentes de etileno e ácido salicílico (*Salicylic Acid*–SA) também possam estar envolvidas (Pieterse, Van Wees, Van Pelt, Van Loon, *et al.*, 1998; Pieterse *et al.*, 2001; Van Der Ent *et al.*, 2009; Beris *et al.*, 2018).

A infecção por BYDV (em plantas não inoculadas) induziu aumento nos níveis de SA em comparação a plantas controle e PI (Fig. 10A) como previamente documentado em plantas de trigo (Davis *et al.*, 2015) e cevada (Paulmann *et al.*, 2018) infectadas por BYDV, o qual vem sendo associados à susceptibilidade das plantas ao vírus (Paulmann *et al.*, 2018). Durante o ataque por patógenos o aumento nos níveis de ácido salicílico e seus derivados é amplamente conhecido por serem sinais chave para a indução da resistência sistêmica adquirida (*Systemic Acquired Resistance* – SAR) em diversas espécies de plantas (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990; Vlot *et al.*, 2009; Shah e Zeier, 2013). Problemas de desenvolvimento das plantas devido a infecção por BYDV podem estar associados aos níveis elevados de SA (Gallego-Giraldo *et al.*, 2011; Paulmann *et al.*, 2018), os quais são conhecidos por induzirem a acumulação de lignina e compostos fenólicos nas plantas, que por sua vez fortalecem a parede celular hospedeira, atuando como barreiras físicas contra a movimentação de patógenos (Ngadze *et al.*, 2012). Desta forma, duas hipóteses (H) podem ser levantadas com base nos resultados observados: H1: a redução nos níveis de SA em plantas infectadas e inoculadas com o tratamento bacteriano FC podem indicar que a redução dos sintomas atribuídos a doença se

deu pela redução na titulação viral nestas plantas. H2: a inoculação das plantas com o tratamento FC tornou as plantas mais tolerantes a infecção por BYDV. Considerando que alguns trabalhos tem mostrado que plantas de trigo tolerantes ao BYDV apresentam poucos sintomas podendo conter entretanto altos títulos virais (Cezare *et al.*, 2011; Paulmann *et al.*, 2018), podemos inferir que a redução nos níveis de SA concomitante com o aumento nos níveis de JA observado em plantas inoculadas com o tratamento FC podem ter ocorrido devido ao crosstalk negativo característico desta duas vias de sinalização (Thaler *et al.*, 2012), desta forma, com a redução nos níveis de SA pode ter ocorrido consequentemente, a redução dos efeitos característicos da doença desencadeados pelo aumento nos níveis desse fitohormônio.

Efeito da inoculação de *Azospirillum brasilense* sobre a população do vetor *Rhopalosiphum padi*

A colonização por PGPR altera em geral a qualidade da planta hospedeira de várias maneiras, podendo afetar de forma negativa (Zehnder *et al.*, 1997; Stout *et al.*, 2002; Pineda *et al.*, 2012; Fahimi *et al.*, 2014; Alavo, 2015; Harun-or-Rashid *et al.*, 2017; Naeem *et al.*, 2018), positiva (Soler *et al.*, 2012; Shavit *et al.*, 2013), ou até mesmo não afetando (Van Oosten *et al.*, 2008; Pineda *et al.*, 2012) o estabelecimento e colonização das plantas por insetos. Assim, o efeito das PGPR na resistência de plantas a insetos parece ser espécie-específica ou até mesmo estirpe-específica em relação as interações entre bactérias e plantas (Fahimi *et al.*, 2014).

Dado que as defesas das plantas contra a herbivoria por insetos sugadores são principalmente reguladas pelo JA (Moran e Thompson, 2001; Ellis *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2002; Mewis *et al.*, 2006; Zarate *et al.*, 2007; Kusnierczyk *et al.*, 2008), o aumento de seus níveis observado em plantas de trigo inoculadas com alguns tratamentos bacterianos (Fig. 10B, 12B) indicam que as defesas anti-herbivoria foram induzidas (Pieterse, Van Wees, Van Pelt, Knoester, *et al.*, 1998; Van Oosten *et al.*, 2008; Pineda *et al.*, 2012). Esperava-se que os afídeos tivessem um desempenho pior em plantas inoculadas com PGPR em relação a plantas não inoculadas, no entanto, nossos resultados mostraram que a inoculação com as estirpes Ab-v5, Ab-v6 e Ab-v5+Ab-v6 de *A. brasilense* em trigo não afetaram o desempenho de *R. padi* ápteros (Fig. 7A) e, embora não estatisticamente significativa, a inoculação das plantas com a formulação comercial promoveu um aumento de 37% na população de afídeos ápteros em comparação com plantas não inoculadas.

Enquanto a herbivoria pelos pulgões induziu apenas níveis elevados de JA em plantas não inoculadas, plantas inoculadas com FC após ataque responderam com um aumento nos

níveis de SA e uma tendência à supressão de JA, sugerindo desta forma *crosstalk* negativo entre esses dois fitohormônios (Fig. 12A, B), mecanismo subjacente comum na manipulação de defesa das plantas por insetos que se alimentam de floema (Moran e Thompson, 2001; Moran *et al.*, 2002; Zhu-Salzman *et al.*, 2005; Walling, 2008). O *crosstalk* negativo provavelmente facilita a herbivoria dos pulgões, no entanto, o efeito benéfico da inoculação com a FC no desempenho de *R. padi* também pode ser resultado da melhora na qualidade nutricional da planta proporcionada pela interação da planta com a PGPR, uma vez que plantas inoculadas com a FC apresentaram maior biomassa de raízes e folhas em relação a plantas não inoculadas.

Similar ao resultado observado em plantas inoculadas com a FC, plantas danificadas pelos afídeos que foram previamente inoculadas com a estirpe Ab-v6 também apresentaram interação antagonista entre os fitohormônios JA e SA, entretanto, a pré-indução (Ab-v6+PI) e a inoculação viral (Ab-v6+PI+BYDV) aparentemente perturbaram essa interação. Apesar do *crosstalk* negativo entre JA e SA, os níveis populacionais de afídeos ápteros em plantas inoculadas com a estirpe Ab-v6 foram semelhantes às plantas não inoculadas (Controle), indicando que não houve efeito da inoculação com esta estirpe sobre os afídeos. Por outro lado, o número de afídeos alados foi 87% maior em plantas inoculadas com Ab-v6 do que plantas controle, provavelmente devido à baixa qualidade do hospedeiro aos pulgões (Johnson, 1965; Muller *et al.*, 2001), dado que os níveis de defesa relacionados ao fitohormônios não influenciam a produção de alados (Kaplan e Thaler, 2012).

Inoculação de estirpes de *Azospirillum brasilense* afetam as interações BYDV-planta-vetor

Assim como muitos vírus pertencente à família Luteoviridae (Luteovirus), BYDV-PAV está restrito ao floema das plantas, sendo obrigatoriamente transmitido por afídeos de maneira persistente, circulativa e não-propagativa (Watson e Mulligan, 1960). Considerando que BYDV depende de afídeos como vetores, fatores que venham a interferir nesta relação vírus-vetor podem vir a afetar drasticamente a disseminação da doença. Assim como esperado, e previamente documentado (Jimenez-Martinez e Bosque-Perez, 2009), colônias de afídeos mantidas em plantas infectadas com BYDV apresentaram as maiores populações de ápteros e alados (Fig. 7A, B), entretanto, os níveis de fitohormônios observados nessas plantas não explica este resultado. Plantas que foram apenas infectadas pelo BYDV sobre ataque pelos afídeos apresentaram aumento nos níveis de JA, enquanto SA não apresentou alterações (Fig. 10) e, como mencionado anteriormente, JA modula a expressão de defesas induzidas contra insetos sugadores de floema.

Embora a qualidade nutricional das plantas não tenha sido avaliada, diversos trabalhos tem apresentado elevada concentração de nutrientes, tais como esteróis, açúcares e amino ácidos, em plantas infectadas por BYDV (Ajayi e Dewar, 1983; Ajayi, 1986; Porras *et al.*, 2018), indicando que o desempenho superior dos afídeos nessas plantas provavelmente resulta do conteúdo nutricional do hospedeiro em vez da supressão das defesas da planta. Adicionalmente, a melhora na qualidade nutricional parece ser uma estratégia de manipulação do BYDV para aumentar suas chances de dispersão, uma vez que a superpopulação em colônias de afídeos induz a formação de formas aladas, que ao se dispersarem para novos hospedeiros favorecem a dispersão viral (Montllor e Gildow, 1986; Bosque-Perez e Eigenbrode, 2011).

Em geral, nosso estudo mostrou que a inoculação de plantas de trigo com *A. brasilense* afetou o efeito indireto do BYDV sobre o crescimento das colônias de vetores, assim como na produção de alados. Embora diferenças significantes não tenham sido detectadas, a inoculação com a combinação de estirpes Ab-v5+Ab-v6 (Ab-v5/6+PI+BYDV) reduziu o tamanho da população de *R. padi* em 15% comparado a população avaliada em plantas apenas vírus-infectadas (PI+BYDV) (Fig. 7A). Apesar de não termos avaliado a titulação viral, como já mencionado, nossa podemos levantar a hipótese de que a colonização por *A. brasilense* tornou as plantas mais resistentes à multiplicação do vírus em níveis variáveis, dependendo do tratamento bacteriano utilizado, o que provavelmente reflete na redução do título do vírus, atenuando assim os sintomas característicos da doença. Menores títulos virais podem afetar diretamente os vetores associados, de forma a aumentar sua longevidade assim como reduzir sua fecundidade (Araya e Foster, 1987; Fereres *et al.*, 1989; Gildow e Gray, 1993; Blua *et al.*, 1994; Jimenez-Martinez e Bosque-Perez, 2009), e indiretamente via alterações mediadas pelo hospedeiro, tais como qualidade nutricional, como mencionado anteriormente (Ajayi, 1986; Blua *et al.*, 1994; Porras *et al.*, 2018). Uma segunda hipótese seria a de que a inoculação bacteriana tornou as plantas mais tolerantes ao vírus afetando de alguma forma a maneira como o vírus manipula a planta a fim de propiciar o aumento populacional de seu vetor. Os mecanismos subjacentes sobre como a colonização bacteriana afeta a interação entre o BYDV e seu vetor ainda precisam ser elucidados, entretanto nossos resultados indicam, pela primeira vez, que a colonização por uma PGPR pode interferir nas estratégia de manipulação viral, uma vez que a redução na população de afídeos pode vir a impactar negativamente na propagação de BYDV-PAV.

2.5 Considerações finais

Os resultados mostraram que todas as estirpes de *A. brasilense* testadas, isoladas ou combinadas, reduziram a população de *R. padi* (formas ápteras e aladas) em plantas infectadas por BYDV-PAV. Embora a inoculação bacteriana não tenha aumentado a resistência das plantas aos pulgões, é possível que a titulação viral tenha sido afetada, o que explicaria a redução da população de afídeos observada em plantas infectadas por BYDV e inoculadas com *A. brasilense*, uma vez que com a redução na titulação viral os efeitos do vírus sobre fatores da planta que podem propiciar o aumento da população de vetores, como por exemplo mudanças na qualidade nutricional das plantas podem ter sido reduzidos.

Foram observados resultados divergentes entre os tratamentos Ab-v5+Ab-v6 e a formulação comercial (Ab-v5+Ab-v6 50/50%) podendo este ser devido aos componentes adicionais utilizados na formulação comercial ('tratado como segredo industrial pela empresa fornecedora') de forma a manter a estabilidade das colônias bacterianas garantindo assim sua eficiência (Bashan *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2017). Portanto, o desempenho superior das plantas assim como a redução nos sintomas vinculados a infecção pelo BYDV em plantas inoculadas com FC podem resultar de uma manutenção aprimorada das duas estirpes bacterianas. Além disso, ficou evidenciado que estirpes intimamente relacionadas, como Ab-v5 e Ab-v6 (Hungria *et al.*, 2018), podem interagir e afetar o patossistema distintamente. Os resultados também sugerem que outros fitohormônios podem estar envolvidos na regulação das vias de sinalização em resposta à alimentação dos afídeos, uma vez que os níveis de JA e SA não explicaram as interações entre plantas inoculadas com *A. brasilense* e *R. padi*.

REFERÊNCIAS

- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW (2009) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. **Microbial Ecology** 58:921-929. doi: 10.1007/s00248-009-9531-y
- Ajayi O (1986) The effect of barley yellow dwarf virus on the amino-acid-composition of spring wheat. **Annals of Applied Biology** 108:145-149. doi: 10.1111/j.1744-7348.1986.tb01975.x
- Ajayi O, Dewar AM (1983) The effect of barley yellow dwarf virus on field populations of the cereal aphids, *Sitobion avenae* and *Metopolophium dirhodum*. **Annals of Applied Biology** 103:1-11. doi: 10.1111/j.1744-7348.1982.tb01932.x
- Al-Ani RA, Adhab MA, El-Muadhidi MA, Al-Fahad MA (2011) Induced systemic resistance and promotion of wheat and barley plants growth by biotic and non-biotic agents against barley yellow dwarf virus. **African Journal of Biotechnology** 10:12079-12084. doi: 10.5897/AJB11.1921

Alavo TBCaBSaFDGaBH (2015) Cotton fertilization using PGPR *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 and compost: Impact on insect density and cotton yield in North Benin, West Africa. **Cogent Food & Agriculture** 1. doi: 10.1080/23311932.2015.1063829

Araya JE, Foster JE (1987) Laboratory study on the effects of barley yellow dwarf virus on the life-cycle of *Rhopalosiphum padi* (L). Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-**Journal of Plant Diseases and Protection** 94:578-583. doi: NA

Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. **Current Opinion in Biotechnology** 20:642-650. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.014

Baker PF (1960) Aphid behaviour on healthy and on yellows-virus- infected sugar beet. **Annals of Applied Biology**, 48(2)384-391.doi: 10.1111/j.1744-7348.1960.tb03534.x

Baltenberger DE, Ohm HW, Foster JE (1987) Reactions of oat, barley, and wheat to infection with barley yellow dwarf virus isolates. **Crop Science** 27:195-198. doi: 10.2135/cropsci1987.0011183X0027000200010x

Bashan Y, de-Bashan LE, Prabhu SR, Hernandez JP (2014) Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil** 378:1-33. doi: 10.1007/s11104-013-1956-x

Bazzanezi AN, Novakowski JH, Sandini IE (2011), Inoculação com *Azospirillum brasilense* e manejo da adubação nitrogenada na cultura do trigo cv. Quartzo. In: **V Reunião da Comissão Brasileira de pesquisa de Trigo e Triticale**.

Benhamou N, Kloepper JW, QuadtHallman A, Tuzun S (1996) Induction of defense-related ultrastructural modifications in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology** 112:919-929. doi: 10.1104/pp.112.3.919

Beris D, Theologidis I, Skandalis N, Vassilakos N (2018) *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus Y. **Scientific Reports** 8. doi: 10.1038/s41598-018-28677-3

Blua MJ, Perring TM, Madore MA (1994) Plant virus-induced changes in aphid population development and temporal fluctuations in plant nutrients. **Journal of Chemical Ecology** 20:691-707. doi: 10.1007/bf02059607

Bosque-Perez NA, Eigenbrode SD (2011) The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. **Virus Research** 159:201-205. doi: 10.1016/j.virusres.2011.04.020

Cezare DGD, Schons J, Lau D (2011) Análise da resistência/tolerância da cultivar de trigo BRS Timbaúva ao Barley yellow dwarf virus - PAV. **Tropical Plant Pathology** 36:249-255. doi: 10.1590/s1982-56762011000400006

Comeau, A., and Haber, S. (2002). “Breeding for BYDV tolerance in wheat as a basis for multiple stress tolerance strategy”, in **Barley Yellow Dwarf Disease: Recent Advances and Future Strategies**, eds M. Henry and A. McNab (Mexico: CIMMYT), 82–92.

Comeau, A., and S. Haber. 2002. Breeding for BYDV tolerance in wheat as a basis for a multiple stress tolerance strategy. In: M. Henry and A. McNab, editors, **Barley yellow dwarf disease, recent advances and future strategies**. CIMMYT, El Batan, Texcoco, Mexico. p. 82–92. ISBN: 970-648-095-1

D'Arcy CJ, Burnett PA (1995) **Barley yellow dwarf: 40 years of progress**. APS Press, St. Paul, MN (USA). 374 p. ISBN 0-89054-167-1

Davis TS, Bosque-Pérez NA, Popova I, Eigenbrode SD (2015) Evidence for additive effects of virus infection and water availability on phytohormone induction in a staple crop. **Frontiers in Ecology and Evolution** 3. doi: 10.3389/fevo.2015.00114

Dicke M, van Loon JJA, Soler R (2009) Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. **Nature Chemical Biology** 5:317-324. doi: 10.1038/nchembio.169

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Ptacek D, Vanderleyden J, Dutto P, Labandera-Gonzalez C, Caballero-Mellado J, Aguirre JF, Kapulnik Y, Brener S, Burdman S, Kadouri D, Sarig S, Okon, Y (2001) Responses of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. **Australian Journal of Plant Physiology** 28:871-879. doi: 10.1071/pp01074

Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, Vande Broek A, Vanderleyden J (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil** 212:155-164. doi: 10.1023/A:1004658000815

Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI (1995) **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa - SPI; Itaguaí: Embrapa - CNPAB, 1995. 60 p.

Eigenbrode SD, Ding HJ, Shiel P, Berger PH (2002) Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera : Aphididae). **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences** 269:455-460. doi: 10.1098/rspb.2001.1909

Ellis C, Karafyllidis L, Turner JG (2002) Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 15:1025-1030. doi: 10.1094/mpmi.2002.15.10.1025

Fahimi A, Ashouri A, Ahmadzadeh M, Naveh VH, Asgharzadeh A (2014) Effect of PGPR on population growth parameters of cotton aphid. **Archives of Phytopathology and Plant Protection** 47:1274-1285. doi: 10.1080/03235408.2013.840099

Fereres A, Araya JE, Housley TL, Foster JE (1990) Carbohydrate-composition of wheat infected with barley yellow dwarf virus. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz*-**Journal of Plant Diseases and Protection** 97:600-608. doi: NA

Fereres A, Lister RM, Araya JE, Foster JE (1989) development and reproduction of the english grain aphid (Homoptera, Aphididae) on wheat cultivars infected with barley yellow dwarf virus. **Environmental Entomology** 18:388-393. doi: 10.1093/ee/18.3.388

Frost CJ, Mescher MC, Carlson JE, De Moraes CM (2008) Plant defense priming against herbivores: Getting ready for a different battle. **Plant Physiology** 146:818-824. doi: 10.1104/pp.107.113027

Gallego-Giraldo L, Escamilla-Trevino L, Jackson LA, Dixon RA (2011) Salicylic acid mediates the reduced growth of lignin down-regulated plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108:20814-20819. doi: 10.1073/pnas.1117873108

- Gildow FE, Gray SM (1993) The aphid salivary-gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteoviruses. **Phytopathology** 83:1293-1302. doi: 10.1094/Phyto-83-1293
- Gray SM, Power AG, Smith DM, Seaman AJ, Altman NS (1991) Aphid transmission of barley yellow dwarf virus - acquisition access periods and virus concentration requirements. **Phytopathology**, 81:539-545. ISSN 0031-949X
- Haas D, Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology** 3:307-319. doi: 10.1038/nrmicro1129
- Hartmann A, Bashan Y (2009) Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB) - Special Issue. **European Journal of Soil Biology** 45:1-2. doi: 10.1016/j.ejsobi.2008.11.004
- Hartmann M, Frey B, Mayer J, Mader P, Widmer F (2015) Distinct soil microbial diversity under long-term organic and conventional farming. **ISME Journal** 9:1177-1194. doi: 10.1038/ismej.2014.210
- Harun-Or-Rashid M, Khan A, Hossain MT, Chung YR (2017) Induction of Systemic Resistance against Aphids by Endophytic *Bacillus velezensis* YC7010 via Expressing phytoalexin deficient in Arabidopsis. **Frontiers in Plant Science** 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00211
- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil** 331:413-425. doi: 10.1007/s11104-009-0262-0
- Hungria M, Ribeiro RA, Nogueira MA (2018) Draft Genome Sequences of *Azospirillum brasilense* Strains Ab-v5 and Ab-v6, Commercially Used in Inoculants for Grasses and Legumes in Brazil. **Microbiology Resource Announcements** 6. doi: 10.1128/genomeA.00393-18
- Ingwell LL, Eigenbrode SD, Bosque-Perez NA (2012) Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. **Scientific Reports** 2. doi: 10.1038/srep00578
- Jensen SG, Vansambe JW (1972) Differential effects of barley yellow dwarf virus on physiology of tissues of hard red spring wheat. **Phytopathology** 62:290-&. doi: 10.1094/Phyto-62-290
- Jimenez-Martinez ES, Bosque-Perez NA (2009) Life history of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, on transgenic and non-transformed wheat challenged with wheat streak mosaic virus. **Entomologia Experimentalis Et Applicata** 133:19-26. doi: 10.1111/j.1570-7458.2009.00905.x
- Jimenez-Martinez ES, Bosque-Perez NA, Berger PH, Zemetra R, Ding HJ, Eigenbrode SD (2004) Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera : Aphididae) to barley yellow dwarf virus-infected transgenic and untransformed wheat. **Environmental Entomology** 33:1207-1216. doi: 10.1603/0046-225X-33.5.1207
- Johnson B (1965) Wing polymorphism in aphids II. Interaction between aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 8:49-64. doi: 10.1007/BF00304538

- Kaplan I, Thaler JS (2012) Phytohormone-mediated plant resistance and predation risk act independently on the population growth and wing formation of potato aphids, *Macrosiphum euphorbiae*. **Arthropod-Plant Interactions** 6:181-186. doi: 10.1007/s11829-011-9175-y
- Kumar S, Chauhan PS, Agrawal L, Raj R, Srivastava A, Gupta S, Mishra SK, Yadav S, Singh PC, Raj SK, Nautiyal CS (2016) *Paenibacillus lentimorbus* inoculation enhances tobacco growth and extenuates the virulence of cucumber mosaic virus. **Plos One** 11. doi: 10.1371/journal.pone.0149980
- Kurek E, Jaroszuk-Scisel J (2003) Rye (*Secale cereale*) growth promotion by *Pseudomonas fluorescens* strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under various soil conditions. **Biological Control** 26:48-56. doi: 10.1016/s1049-9644(02)00115-9
- Kusnierczyk A, Winge P, Jorstad TS, Troczynska J, Rossiter JT, Bones AM (2008) Towards global understanding of plant defence against aphids - timing and dynamics of early *Arabidopsis* defence responses to cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* attack. **Plant Cell and Environment** 31:1097-1115. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01823.x
- Lau D, Carminatti AJ, Bianchin V, Barreto ELS, Pereira PRVS (2011) Reação de genótipos de trigo ao BYDV – PAV, agente causal do nanismo amarelo: análise de dados 2010. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 8p. (**Comunicado Técnico online, 297**). Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/co/p_co297.htm. ISSN 1517-4964
- Levanony H, Bashan Y (1989) enhancement of cell-division in wheat root-tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* cd. **Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique** 67:2213-2216
- Liu L, Kloepper JW, Tuzun S (1995) Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium wilt* by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology** 85:695-698. doi: 10.1094/Phyto-85-695
- Macias W, Mink GI (1969) Preference of green peach aphids for virus-infected sugarbeet leaves. **Journal of Economic Entomology**, 62(1)28-29. doi: 10.1093/jee/62.1.28
- Mauck K, Bosque-Perez NA, Eigenbrode SD, De Moraes CM, Mescher MC (2012) Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. **Functional Ecology** 26:1162-1175. doi: 10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x
- Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2010) Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 107:3600-3605. doi: 10.1073/pnas.0907191107
- Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2014) Evidence of local adaptation in plant virus effects on host-vector interactions. **Integrative and Comparative Biology** 54:193-209. doi: 10.1093/icb/icu012
- Mewis I, Tokuhisa JG, Schultz JC, Appel HM, Ulrichs C, Gershenzon J (2006) Gene expression and glucosinolate accumulation in *Arabidopsis thaliana* in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways. **Phytochemistry** 67:2450-2462. doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.004
- Mia MAB, Shamsuddin ZH (2010) Nitrogen Fixation and Transportation by Rhizobacteria: A Scenario of Rice and Banana. **International Journal of Botany** 6:235-242
- Miller WA, Rasochova L (1997) Barley yellow dwarf viruses. **Annual Review of Phytopathology** 35:167-190. doi: 10.1146/annurev.phyto.35.1.167

- Montllor CB, Gildow FE (1986) Feeding responses of 2 grain aphids to barley yellow dwarf virus-infected oats. **Entomologia Experimentalis Et Applicata** 42:63-69. doi: 10.1111/j.1570-7458.1986.tb02188.x
- Moran PJ, Cheng YF, Cassell JL, Thompson GA (2002) Gene expression profiling of *Arabidopsis thaliana* in compatible plant-aphid interactions. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 51:182-203. doi: 10.1002/arch.10064
- Moran PJ, Thompson GA (2001) Molecular responses to aphid feeding in *Arabidopsis* in relation to plant defense pathways. **Plant Physiology** 125:1074-1085. doi: 10.1104/pp.125.2.1074
- Muller CB, Williams IS, Hardie J (2001) The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. **Ecological Entomology** 26:330-340. doi: 10.1046/j.1365-2311.2001.00321.x
- Murphy JF, Reddy MS, Ryu CM, Kloepper JW, Li RH (2003) Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 93:1301-1307. doi: 10.1094/phyto.2003.93.10.1301
- Murphy JF, Zehnder GW, Schuster DJ, Sikora EJ, Polston JE, Kloepper JW (2000) Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against Tomato mottle virus. **Plant Disease** 84:779-784. doi: 10.1094/pdis.2000.84.7.779
- Naeem M, Aslam Z, Khaliq A, Ahmed JN, Nawaz A, Hussain M (2018) Plant growth promoting rhizobacteria reduce aphid population and enhance the productivity of bread wheat. **Brazilian Journal of Microbiology** 49:9-14. doi: 10.1016/j.bjm.2017.10.005
- Nezarat S, Gholami A (2009) Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. **Pak J Biol Sci** 12:26-32. doi: 10.3923/pjbs.2009.26.32
- Ngadze E, Icishahayo D, Coutinho TA, van der Waals JE (2012) Role of Polyphenol Oxidase, Peroxidase, Phenylalanine Ammonia Lyase, Chlorogenic Acid, and Total Soluble Phenols in Resistance of Potatoes to Soft Rot. **Plant Disease** 96:186-192. doi: 10.1094/pdis-02-11-0149
- Okon Y, Labanderagonzalez CA (1994) Agronomic applications of *Azospirillum* - an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology & Biochemistry** 26:1591-1601. doi: 10.1016/0038-0717(94)90311-5
- Oliveira ALM et al. (2017) Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input. **Frontiers in Microbiology** 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.01873
- Orlob GB, Arny DC (1961) Some metabolic changes accompanying infection by barley yellow dwarf virus. **Phytopathology** 51:768-&. doi:NA
- Parizoto G, Rebonatto A, Schons J, Lau D (2013) Barley yellow dwarf virus-PAV in Brazil: Seasonal fluctuation and biological characteristics. **Tropical Plant Pathology** 38:11-19. doi: 10.1590/S1982-56762013000100002
- Paulmann MK et al. (2018) Barley yellow dwarf virus Infection Leads to Higher Chemical Defense Signals and Lower Electrophysiological Reactions in Susceptible Compared to Tolerant Barley Genotypes. **Frontiers in Plant Science** 9. doi: 10.3389/fpls.2018.00145

Peñaflor MFV, Mauck KE, Alves KJ, De Moraes CM, Mescher MC (2016) Effects of single and mixed infections of Bean pod mottle virus and Soybean mosaic virus on host-plant chemistry and host-vector interactions. **Functional Ecology** 30:1648-1659. doi: 10.1111/1365-2435.12649

Perring TM, Gruenhagen NM, Farrar CA (1999) Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. **Annual Review of Entomology** 44:457-481. doi: 10.1146/annurev.ento.44.1.457

Piccinin GG, Braccini AL, Dan LGM, Scapim CA, Ricci TT, Bazo GL (2013) Efficiency of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* on agronomic characteristics and yield of wheat. **Industrial Crops and Products** 43:393-397. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.07.052

Pieterse CMJ et al. (1998a) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. **Plant Cell** 10:1571-1580. doi: 10.1105/tpc.10.9.1571

Pieterse CMJ et al. (2001) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: Triggering, signalling and expression. **European Journal of Plant Pathology** 107:51-61. doi: 10.1023/a:1008747926678

Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Van Loon LC, Ug (1998b) A novel defence pathway in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria. **50th International Symposium on Crop Protection**, Pts I-IV, vol 50, pp 931-940

Pineda A, Zheng SJ, van Loon JJA, Dicke M (2012) Rhizobacteria modify plant-aphid interactions: a case of induced systemic susceptibility. **Plant Biology** 14:83-90. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00549.x

Pineda A, Zheng S-J, van Loon JJA, Pieterse CMJ, Dicke M (2010) Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. **Trends in Plant Science** 15:507-514. doi: 10.1016/j.tplants.2010.05.007

Porras M, De Moraes CM, Mescher MC, Rajotte EG, Carlo TA (2018) A plant virus (BYDV) promotes trophic facilitation in aphids on wheat. **Scientific Reports** 8. doi: 10.1038/s41598-018-30023-6

Pozo MJ, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2004) Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions. **Journal of Plant Growth Regulation** 23:211-222. doi: 10.1007/s00344-004-003105

Quiroz A, Niemeyer HM (1998) Olfactometer-assessed responses of aphid *Rhopalosiphum padi* to wheat and oat volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, 24(1):113-124. doi: 10.1023/A:1022393029987

Rais A, Jabeen Z, Shair F, Hafeez FY, Hassan MN (2017) *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. **Plos One** 12. doi: 10.1371/journal.pone.0187412

Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R (2001) Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection** 20:1-11. doi: 10.1016/s0261-2194(00)00056-9

Raupach GS, Liu L, Murphy JF, Tuzun S, Kloepper JW (1996) Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Plant Disease** 80:891-894. doi: 10.1094/pd-80-0891

- Richardson AE, Barea J-M, McNeill AM, Prigent-Combaret C (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil** 321:305-339. doi: 10.1007/s11104-009-9895-2
- Romero AM, Correa OS, Moccia S, Rivas JG (2003) Effect of Azospirillum-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. **Journal of Applied Microbiology** 95:832-838. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02053.x
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, Pare PW (2004a) Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. **Plant Physiology** 134:1017-1026. doi: 10.1104/pp.103.026583
- Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Wei HX, Paré PW, Kloepper JW (2003) Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100:4927-4932. doi: 10.1073/pnas.0730845100
- Ryu CM, Murphy JF, Mysore KS, Kloepper JW (2004b) Plant growth-promoting rhizobacteria systemically protect *Arabidopsis thaliana* against Cucumber mosaic virus by a salicylic acid and NPR1-independent and jasmonic acid-dependent signaling pathway. **Plant Journal** 39:381-392. doi: 10.1111/j.1365-3113.2004.02142.x
- Schmelz EA, Engelberth J, Alborn HT, O'Donnell P, Sammons M, Toshima H, Tumlinson JH (2003) Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 100:10552-10557. doi: 10.1073/pnas.1633615100
- Shankar ACU, Chandra Nayaka S, Niranjana-Raj S, Bhuvanendra Kumar H, Reddy MS, Niranjana SR, Prakash HS (2009) Rhizobacteria-mediated resistance against the blackeye cowpea mosaic strain of bean common mosaic virus in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Pest Management Science** 65:1059-1064. doi: 10.1002/ps.1791
- Shavit R, Ofek-Lazar M, Burdman S, Morin S (2013) Inoculation of tomato plants with rhizobacteria enhances the performance of the phloem-feeding insect *Bemisia tabaci*. **Frontiers in Plant Science** 4. doi: 10.3389/fpls.2013.00306
- Soler R, Pineda A, Li Y, Ponzio C, Van Loon JJA, Weldegergis BT, Dicke M (2012) Neonates know better than their mothers when selecting a host plant. **Oikos** 121:1923-1934. doi: 10.1111/j.1600-0706.2012.20415.x
- Stout MJ, Zehnder GW, Baur ME (2002) Potential for the use of elicitors of plant resistance in arthropod management programs. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 51:222-235. doi: 10.1002/arch.10066
- Thaler JS, Humphrey PT, Whiteman NK (2012) Evolution of jasmonate and salicylate signal crosstalk. **Trends in Plant Science** 17:260-270. doi: 10.1016/j.tplants.2012.02.010
- Van der Ent S, Van Wees SCM, Pieterse CMJ (2009) Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry** 70:1581-1588. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.06.009
- van Hulten M, Pelsers M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 103:5602-5607. doi: 10.1073/pnas.0510213103

- van Loon LC, Bakker P, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 36:453-483. doi: 10.1146/annurev.phyto.36.1.453
- Van Oosten VR, Bodenhausen N, Reymond P, Van Pelt JA, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CM (2008) Differential effectiveness of microbially induced resistance against herbivorous insects in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 21:919-930. doi: 10.1094/mpmi-21-7-0919
- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil** 255:571-586. doi: 10.1023/a:1026037216893
- Walling LL (2008) Avoiding effective defenses: Strategies employed by phloem-feeding insects. **Plant Physiology** 146:859-866. doi: 10.1104/pp.107.113142
- Watson MA, Mulligan T (1960) The manner of transmission of some barley yellow-dwarf viruses by different aphid species. **Annals of Applied Biology** 48:711-720. doi: 10.1111/j.1744-7348.1960.tb03570.x
- Weller DM (1988) Biological-control of soilborne plant-pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 26:379-407. doi: 10.1146/annurev.py.26.090188.002115
- Zarate SI, Kempema LA, Walling LL (2007) Silverleaf whitefly induces salicylic acid Defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. **Plant Physiology** 143:866-875. doi: 10.1104/pp.106.090035
- Zehnder G, Kloepper J, Yao CB, Wei G (1997) Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) by plant growth-promoting rhizobacteria. **Journal of Economic Entomology** 90:391-396
- Zehnder GW, Murphy JF, Sikora EJ, Kloepper JW (2001) Application of rhizobacteria for induced resistance. **European Journal of Plant Pathology** 107:39-50. doi: 10.1023/a:1008732400383
- Zehnder GW, Yao CB, Murphy JF, Sikora ER, Kloepper JW (2000) Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol** 45:127-137. doi: 10.1023/a:1009923702103
- Zhu-Salzman K, Bi J-L, Liu T-X (2005) Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense. **Insect Science** 12:3-15. doi: 10.1111/j.1672-9609.2005.00002.x

3. INOCULAÇÃO COM A RIZOBACATÉRIA *Azospirillum brasilense* E SEUS EFEITOS SOBRE O COMPORTAMENTO DE SELEÇÃO HOSPEDEIRA DO VETOR DO VÍRUS DO NANISMO AMARELO DA CEVADA (BARLEY YELLOW DWARF VIRUS - BYDV) *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae) EM PLANTAS DE TRIGO

Franciele Santos¹; M. Fernanda G. V. Peñaflor²; Consuelo De Moraes³; Mark C. Mescher³; José Mauricio Simões Bento^{1*}

¹ Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, CP 09, Piracicaba, SP, 13418-900, Brasil

² Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Lavras (UFLA), CP 3037, Lavras, MG, 37200-000, Brasil

³ Department of Environmental Systems Science, ETH Zurich, Zurich 8092, Suíça

* José Mauricio Simões Bento, E-mail: jmsbento@usp.br; Telefone: +55 19 3429-4199; Fax: +55 19 3433-0562

RESUMO

Pistas visuais e químicas estão intimamente associadas ao comportamento de busca e escolha hospedeira por insetos filófagos. Neste sentido, diversos vírus de plantas dependentes de insetos para sua transmissão desenvolveram estratégias de manipulação hospedeira a fim de alterar algumas destas características, tornando desta forma, plantas infectadas mais atrativas aos seus vetores. No presente trabalho demonstrou-se que a inoculação de plantas de trigo com a bactéria *Azospirillum brasilense* afetou a escolha olfativa de afídeos ápteros e alados de *Rhopalosiphum padi*, principal inseto vetor do vírus do nanismo amarelo da cevada (*Barley Yellow Dwarf Virus* – BYDV) em plantas de trigo. Verificou-se que a inoculação bacteriana afetou a escolha olfativa de afídeos ápteros não-virulíferos virulíferos de *R. padi*, afetando assim a atratividade de plantas BYDV-infectadas por esses vetores. A preferência hospedeira de formas aladas também foi estudada, utilizando, no entanto, apenas afídeos não-virulíferos do mesmo vetor. Avaliando alados oriundos de duas populações de afídeos, uma mantida em plantas não inoculadas (população controle) e outra em plantas inoculadas com *A. brasilense* (população nitro) foi possível verificar mudanças na preferência de alados entre as duas populações, assim como efeito da inoculação bacteriana no comportamento de escolha desses afídeos. Nossos resultados sugerem que a inoculação de plantas de trigo com a bactéria *A. brasilense* pode afetar o sucesso na aquisição e transmissão do BYDV pelo afídeo *R. padi*, embora mais estudos sejam necessários para elucidar o real impacto da inoculação bacteriana nesse patossistema.

Palavras-chave: Bactérias benéficas; Afídeos ápteros; Afídeos alados; Escolha hospedeira

ABSTRACT

Visual and chemical clues are closely associated with the host selection by phytophagous insects. In this sense, several plant viruses transmitted by insects have developed strategies to change some of these characteristics, thus making infected plants more attractive to their vectors. In the present work, it was demonstrated that the inoculation of wheat plants with the bacterium *Azospirillum brasilense* affected the olfactory choice of aphids aptera and alates of *Rhopalosiphum padi*, the main insect vector of Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) on wheat. Bacterial inoculation was found to affect the olfactory choice of non-viruliferous and viruliferous *R. padi*, thus affecting the attractiveness of BYDV-infected plants. Host choice preference of winged forms has also been studied using, however, only non-viruliferous aphids of the same vector. Evaluating alates from two aphid populations, one reared on non-inoculated plants (control population) and the other in plants inoculated with the bacteria *A. brasilense* (nitro population), it was possible to verify changes in winged preference between the two populations, as well as effects of inoculation. Our results suggest that inoculation of wheat plants with the bacterium *A. brasilense* may affect the successful acquisition and transmission of BYDV by *R. padi* aphids, although further studies are needed to elucidate the real impact of bacterial inoculation on this pathosystem.

Keywords: Beneficial bacteria; Apterous aphids; Alates aphids; Host-plant selection

3.1 Introdução

Patógenos dependentes de outros organismos para sua transmissão frequentemente manipulam seus hospedeiros a fim de garantir a melhor interação entre hospedeiro e vetor, aumentando desta forma suas chances de disseminação (Castle *et al.*, 1998; Eigenbrode *et al.*, 2002; Mauck *et al.*, 2010; Bosque-Perez e Eigenbrode, 2011). Vírus de plantas estão entre os mais diversos e amplamente distribuído grupo de patógenos dependentes de vetores para sua transmissão (Mauck *et al.*, 2012). Dentre estes, o vírus do nanismo amarelo da cevada (*Barley Yellow Dwarf Virus* – BYDV) está entre os mais estudados desse grupo de fitopatógenos (D'arcy e Burnett, 1995). Transmitidos por afídeos de maneira persistente, circulativa não-propagativa (Andret-Link e Fuchs, 2005), os vírus associados ao nanismo e amarelecimento dos cereais (*Yellow dwarf disease*) foram inicialmente classificados em função da especificidade de transmissão pela espécie vetora: RPV (*Rhopalosiphum padi*); RMV (*Rhopalosiphum maidis*); MAV (*Sitobion avenae* antigo *Macrosiphum avenae*); SGV (*Schizaphis graminum*); PAV (*R. padi*, *S. avenae*) (Rochow e Eastop, 1966). No Brasil, a espécie *R. padi* se destaca como uma das espécies mais eficientes na transmissão de BYDV-PAV (Parizoto *et al.*, 2013).

Assim como outros vírus associados a vetores, a infecção viral por BYDV altera as condições de seu hospedeiro de forma a torná-lo mais atrativo, susceptível e nutricionalmente

superior para seus vetores (Ajayi, 1986; Fereres *et al.*, 1990; Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger e Zemetra, 2004; Ingwell *et al.*, 2012; Porras *et al.*, 2018). Diversos trabalhos têm ainda demonstrado que a infecção viral não apenas altera algumas condições de seu hospedeiro, mas também o comportamento de seus vetores (Eigenbrode *et al.*, 2002; Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger, Zemetra, *et al.*, 2004; Medina-Ortega *et al.*, 2009). Plantas BYDV-infectadas tendem a ser mais atrativas a afídeos não virulíferos, aumentando assim as chances de aquisição viral (Medina-Ortega *et al.*, 2009; Ingwell *et al.*, 2012). Entretanto após adquirirem o vírus, o comportamento de escolha hospedeira dos vetores é alterada, uma vez que afídeos virulíferos de *R. padi* apresentam preferência por plantas não-infectadas, promovendo desta forma a dispersão viral (Ingwell *et al.*, 2012). Tais mudanças na atratividade da planta hospedeira aos vetores estão relacionadas não apenas a mudanças visuais das plantas (Baker, 1960; Macias e Mink, 1969; Ajayi e Dewar, 1983), mas também mudanças químicas, envolvendo alterações no perfil de voláteis liberados (Quiroz e Niemeyer, 1998; Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger, Zemetra, *et al.*, 2004; Medina-Ortega *et al.*, 2009), assim como, mudanças na qualidade nutricional destas plantas (Ajayi, 1986; Blua *et al.*, 1994; Porras *et al.*, 2018).

Considerando que BYDV causa uma das principais doenças virais em gramíneas no mundo (Miller e Rasochova, 1997), especialmente devido à ausência de medidas curativas, uma vez que seu controle ocorre principalmente pelo uso de variedades resistentes (Mcgrath *et al.*, 1997; Miller e Rasochova, 1997), ou pelo controle químico do agente vetor (Perring *et al.*, 1999), o entendimento, mesmo que ainda superficial, das interações entre vírus-hospedeiro-vetor, apresenta uma grande oportunidade para o desenvolvimento e elucidação de mecanismos que venham a interromper essas interações, auxiliando desta forma no manejo da doença (Bosque-Perez e Eigenbrode, 2011).

Dentre as possíveis alternativas, a utilização de bactéria promotoras de crescimento em plantas (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria* – PGPR), tem ganhado destaque por sua capacidade de melhorar as condições nutricionais das plantas associadas, estimulando assim seu crescimento (Kloepper *et al.*, 1980; Badri *et al.*, 2009), e também, induzindo a resistência das plantas contra insetos (Pineda *et al.*, 2010; Bano e Muqarab, 2017; Naeem *et al.*, 2018), patógenos, tais como fungos (Weller, 1988; Haas e Defago, 2005; Xu e Kim, 2014), e vírus transmitidos em geral por insetos vetores (Raupach *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2000; Zehnder *et al.*, 2000; Murphy *et al.*, 2003; Shankar *et al.*, 2009).

Neste sentido, a inoculação com *Baccillus pumilus* e *B. subtilis* em sementes de feijão de corda conferiram maior proteção contra o vírus do mosaico com feijão (*Bean common*

mosaic virus - BCMV), comumente transmitidos por afídeos (Shankar *et al.*, 2009). Da mesma forma, plantas de tomate também se tornam mais resistentes ao vírus do mosaico do pepino (*Cucumber mosaic virus* - CMV), outro vírus transmitido por pulgões, quando colonizadas por diferentes estirpes de rizobactérias do gênero *Bacillus*, sendo a redução da severidade do vírus observada em plantas colonizadas pelas PGPR dada provavelmente pela redução na titulação viral em relação a plantas não inoculadas (Murphy *et al.*, 2003). Adicionalmente, a inoculação bacteriana pode também reduzir os sintomas e a severidade de BYDV em plantas de cevada e trigo (Al-Ani *et al.*, 2011). Entretanto, ainda não se sabe se a colonização com essas rizobactérias podem influenciar de alguma forma o comportamento dos afídeos vetores da doença, o que poderá afetar diretamente na incidência do BYDV, uma vez que são os responsáveis pela transmissão da mesma.

Previamente, verificou-se que a inoculação de plantas de trigo com a bactéria *Azospirillum brasilense* afetou a interação entre o BYDV e seu vetor *R. padi*., de forma que plantas vírus-infectadas que foram inoculadas com a bactéria apresentaram redução na população dos vetores, tanto ápteros quanto alados, em relação as plantas apenas vírus infectadas (Santos *et al.*, *dados não publicados*). Desta forma, considerando o efeito positivo da inoculação bacteriana sobre o patossistema BYDV, plantas de trigo e o afídeo vetor *R. padi*, o presente trabalho teve como objetivo, avaliar se a colonização por *A. brasilense* em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.), afeta o comportamento de escolha hospedeira de afídeos ápteros não-virulíferos e virulíferos, e alados não-virulíferos de *R. padi*, podendo desta forma promover mudanças no comportamento dos vetores que possa vir a afetar assim a transmissão do BYDV.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Criação dos Insetos

Afídeos não virulíferos de *R. padi* (Hemiptera: Aphididae) foram originalmente obtidos a partir de criações mantidas no Laboratório de Entomologia e Virologia da Embrapa Trigo (Passo Fundo, RS, Brasil). Os afídeos foram mantidos em plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) com aproximadamente 35 dias de idade, livres de vírus, acondicionadas em gaiolas de polietileno (70x30x30 cm). Posteriormente, uma segunda criação foi estabelecida, onde os afídeos passaram a ser criados também em plantas de cevada previamente inoculadas com formulação comercial produzida com as estirpes Ab-v5 e Ab-v6 da rizobactéria *A. brasilense*. Desta forma duas populações foram estabelecidas, as quais foram denominadas de população controle (insetos criados em plantas de cevada não inoculada) e população Azos (insetos criados

em plantas previamente inoculadas com solução bacteriana). As criações foram mantidas em sala com temperatura controlada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$; $60\% \pm 10\% \text{ RH}$), fotoperíodo 12L:12E, e intensidade de luz de $200 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ no período diurno. Adicionalmente, as plantas foram trocadas a cada duas semanas e regularmente examinadas usando teste sorológico DAS-ELISA para garantir que as colônias se mantinham livres do vírus.

3.2.2 Bacterização das sementes

Sementes de trigo cultivar Quartzo® (*Triticum aestivum* L.) foram inoculadas com a solução comercial (tratamento Azos) (Nitro 1000 Inoculantes Biológicos, Cascavel, PR, Brasil) da bactéria *A. brasilense* (estirpes Ab-v5 e Ab-v6 – 50/50%) na concentração de 1×10^8 unidades de formação de colônias (CFU)/mL. Para tanto, as sementes foram inicialmente desinfetadas superficialmente em solução de hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos, seguido por dupla lavagem com água destilada. Posteriormente, as sementes foram imersas na solução bacteriana por 30 minutos. Para o tratamento controle, a solução bacteriana foi filtrada duas vezes por meio de um filtro plissado $0,22 \mu\text{m}$ (Millex-GV, Millipore) até a obtenção do meio de cultivo sem as bactérias (Fig. 13A, B). Após esta etapa, $100 \mu\text{L}$ do filtrado foi adicionado a um tubo de ensaio contendo 20mL de meio de cultura DYGS (*Dextrose Yeast Glucose Sucrose*) (Döbereiner *et al.*, 1995) e mantido sob as mesmas condições de agitação e temperatura citadas no item 2.2.2 desta tese, porém por um período de 7 dias. O mesmo procedimento foi realizado com a mesma alíquota do produto comercial intacto (não filtrado Nitro – tratamento Azos) (Fig. 13C). Este procedimento foi realizado a fim de garantir que o meio se encontrava livre das bactérias após a filtragem (Fig. 13C). Após a bacterização as sementes foram então semeadas em vasos de 1L contendo substrato Basaplant (Base Agro, Artur Nogueira, SP) previamente esterilizado (1 semente/ vaso). As plantas foram diariamente regadas com água destilada e suplementadas com solução de micronutrientes (NPK 20:20:20) uma semana após o plantio.

Figura 13. Procedimento de filtragem da solução bacteriana comercial de *Azospirillum brasilense*. A: Filtro bacteriológico Millipore (0,22µL); B: Filtragem da solução bacteriana comercial; C: Tubos de ensaio 7 dias após o início da incubação, *Nitro*: Solução bacteriana – tratamento Azos; *Filtrado Nitro*: Meio inoculado com a solução bacteriana filtrada (sem crescimento bacteriano); *Controle*: Meio de cultura DYGS.

3.2.3 Infecção das plantas com o isolado viral BYDV-PAV

Sete dias após o tratamento das sementes, as plântulas de trigo foram inoculadas com o isolado viral BYDV-PAV. Para tanto, dez afídeos virulíferos (insetos mantidos previamente se alimentando em plantas fonte por 72h) foram mantidos em contato com as plantas por 72 horas, permitindo assim a alimentação dos insetos e a inoculação do vírus (Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger, Zemetra, et al., 2004). A fim de evitar a fuga dos insetos, as plantas foram cobertas com gaiolas de acrílico com abertura superior coberta por tecido de “voile” permitindo a circulação do ar (Fig. 2A, B). Simultaneamente, o mesmo procedimento de inoculação viral foi realizado com as plantas do tratamento de pré-indução (PI) (ou falsa inoculação), porém utilizando afídeos não-virulíferos. Após 72 horas, os insetos foram removidos e as plantas mantidas em sala climatizada (temperatura $18^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\% \pm 10\%$ UR; fotoperíodo 12L: 12D; intensidade de luz de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) (Fig. 3). Vinte e quatro dias após o período de inoculação as plantas foram utilizadas para a condução dos experimentos.

3.2.4 Preferência olfativa de ápteros de *Rhopalosiphum padi*

A preferência olfativa dos afídeos foi avaliada em ensaios com chance de escolha confrontando plantas não infectadas (Controle, Pré-induzida (PI), e Azos+PI) e infectadas (PI+BYDV e Azos+PI+BYDV). O teste de dupla escolha foi adaptado do método proposto por Jimenez-Martinez et al. (2004). Para tanto, a arena experimental constituiu de uma placa de Petri (15cm de diâmetro) contendo duas aberturas em sua base cobertas por tecido ‘voile’, a fim de evitar o contato dos pulgões com as plantas testadas (Fig. 14A). As seguintes combinações de tratamentos foram testadas: i) Azos vs Controle; ii) Azos+PI (Pré-Induzida) vs PI; iii) Azos+PI vs PI+BYDV; vi) Azos+PI+BYDV vs PI; e v) Azos+PI+BYDV vs PI+BYDV. Adicionalmente a combinação: Controle vs Branco (sem planta) foi testada a fim de avaliar a viabilidade do sistema (atratividade dos afídeos para as plantas). Para os bioensaios, quatro folhas de cada planta foram posicionadas acima da base da placa (Fig. 14A).

Figura 14. Teste de dupla escolha em arena. A: Arena contendo quatro folhas de trigo em cada tratamento testado. Folhas mantidas sobre o tecido de ‘voile’ a fim de evitar contato dos afídeos *Rhopalosiphum padi*, permitindo assim a passagem dos voláteis liberados pelas plantas; B: Arena de teste coberta por folha de ‘voile’ a fim de evitar estímulos visuais para escolha. Todos os testes ocorreram em sala escura.

Posteriormente, vinte pulgões adultos não-virulíferos, ou virulíferos (insetos mantidos em plantas BYDV-infectadas por 72h antes do início dos bioensaios), privados de alimento por uma hora antes do início dos ensaios, foram liberados no centro das arenas. Uma hora após a liberação dos insetos o número de pulgões no tecido ‘voile’ abaixo das folhas de cada tratamento foi registrado. Após o fim de cada ensaio, aproximadamente 100 mg do colmo de cada planta foi coletado para avaliação da infecção viral por meio do teste DAS-ELISA. A colonização bacteriana das raízes também foi avaliada pela remoção de toda sessão radicular

que após lavagem em água corrente é mantida em meio de cultura seletivo, submetido a diluição seriada e plaqueamento em meio sólido. Os ensaios foram realizados em ambiente escuro a fim de evitar qualquer efeito visual na escolha dos afídeos. Para garantir total ausência de estímulos visuais, após a liberação dos insetos uma folha de papel alumínio foi ainda mantida sobre as arenas (Fig. 14B).

3.2.5 Preferência hospedeira e colonização por alados de *R. padi*

Embora conhecido que os afídeos alados usam pistas químicas (voláteis) na orientação e encontro de um novo hospedeiro, sua escolha final em geral é feita somente após o contato e prova inicial da planta (Schroder *et al.*, 2015). Neste sentido, considerando que a colonização de plantas BYDV-infectadas por bactérias *A. brasilense* altera a dinâmica populacional dos afídeos em comparação ao observado em plantas apenas BYDV-infectadas (*resultados apresentados no primeiro capítulo desta tese*), a preferência hospedeira e colonização de alados não-virulíferos foi testada a fim de verificar se a colonização bacteriana poderia vir a afetar a preferência hospedeira dos vetores.

Para tanto, os ensaios foram realizados usando alados provenientes de duas populações de afídeos. População controle: alados oriundos de colônias mantidas em plantas de cevada sem qualquer tratamento bacteriano; e População Azos: alados oriundos de população mantida em plantas de cevada previamente inoculadas com solução bacteriana (mesma formulação comercial utilizada nas plantas testadas). Os bioensaios realizados com alados de ambas as populações separadamente. Para tanto, as seguintes combinações de tratamentos foram testadas: i) Azos *vs* Controle; ii) Azos+PI *vs* PI; iii) Azos+PI *vs* PI+BYDV; vi) Azos+PI+BYDV *vs* PI; e v) Azos+PI+BYDV *vs* PI+BYDV. Para a condução dos bioensaios, uma planta de cada tratamento foi posicionada de forma equidistante nas gaiolas (60x30x30 cm) (Fig. 15A). Posteriormente, dez pulgões alados (± 24 h de idade) oriundos de cada colônia (Controle e Nitro) foram então liberados no centro das gaiolas (Fig. 15B). Os insetos foram mantidos nas gaiolas para escolha hospedeira e colonização inicial por um período de 24h. Após esse período, o número de alados em cada planta foi quantificado.

Figura 15. Teste de livre escolha e colonização por formas aladas de *Rhopalosiphum padi* em plantas de trigo A: disposição das plantas na gaiola de teste confrontando as combinações de tratamentos (descritas no item 3.2.5); B: tubo de ensaio usado para a liberação dos insetos no centro da gaiola.

3.2.6 Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando modelos lineares generalizados (*General Linear Model* - GLM) com distribuição binomial e função de ligação “logit”, utilizada em casos de super-dispersão dos dados (Hinde e Demétrio, 1998). A qualidade de ajuste do modelo foi avaliada com base no gráfico de meia probabilidade com envelope de simulação (Demétrio, 1997), usando a função *hnp* do pacote *hnp* para R (Demétrio *et al.*, 2014). Os testes foram realizados utilizando o software estatístico R (www.R-project.org) versão 3.3.2.

3.3 Resultados

3.3.1 Preferência olfativa por ápteros de *Rhopalosiphum padi*

Afídeos apresentaram atratividade por plantas de trigo não inoculadas com solução bacteriana de *A. brasilense* (Controle) quando confrontadas com o tratamento sem planta

(Branco) (Fig. 16, GLM, teste binomial: $WaldZ = 5,547$, $P < 0,001$), comprovando desta forma a viabilidade do sistema para a execução dos testes de preferência olfativa.

Figura 16. Escolhas dos afídeos de *Rhopalosiphum padi* em ensaio controle contrastando plantas de trigo não inoculadas com solução bacteriana de *Azospirillum brasilense* Controle vs Branco (sem planta). Barras representam o número médio de afídeos $\pm$ EP. Gráficos de pizza à direita representam a proporção de afídeos que fizeram ou não alguma escolha. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,001$).

Plantas BYDV-infectadas foram significativamente mais atrativas aos afídeos não-virulíferos em relação a plantas pré-induzidas (PI) (Fig. 17; GLM, teste binomial: $WaldZ = -4,794$, $P < 0,001$). Entretanto, plantas inoculadas com a solução bacteriana (Azos+PI) foram mais atrativas aos afídeos em relação as plantas infectadas por BYDV (PI+BYDV) (Fig. 17; GLM, teste binomial: $WaldZ = 5,381$, $P < 0,001$). Do mesmo modo, plantas que foram infectadas pelo vírus e inoculadas pela bactéria (Azos+PI+BYDV), também apresentaram maior atratividade aos afídeos não-virulíferos quando comparadas as plantas que foram apenas vírus-infectadas (PI+BYDV) (Fig. 17; GLM, teste binomial: $WaldZ = 2,696$, $P = 0,0108$).

Plantas submetidas apenas à inoculação bacteriana (Azos) foram mais atrativas aos afídeos em relação as plantas controle (Fig. 17; GLM, teste binomial: $WaldZ = 3,506$, $P = 0,0019$). Adicionalmente, afídeos não-virulíferos não apresentaram preferência entre os tratamentos Azos+PI vs PI (Fig. 17; GLM, teste binomial: $WaldZ = 3,506$, $P = 0,0019$), assim como Azos+PI+BYDV vs PI (Fig. 17; GLM, teste binomial: $WaldZ = -0,913$, $P = 0,361$).

Figura 17. Preferência olfativa de *Rhopalosiphum padi* não-virulíferos por plantas: Azos vs Controle; Azos+PI vs PI; Azos+PI vs PI+BYDV; Azos+PI+BYDV vs PI e Azos+PI+BYDV vs PI+BYDV, em teste de dupla escolha. Os gráficos de pizza à direita representam a proporção de afídeos que fizeram ou não escolha aos tratamentos testados. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Para os testes utilizando afídeos virulíferos ao contrário do que foi observado para afídeos não-virulíferos, observou-se preferência dos vetores por plantas pré-induzidas (PI) em relação a plantas BYDV-infectadas (PI+BYDV) (Fig. 18; GLM, teste binomial: WaldZ = 7,302, $P < 0,001$). Entretanto afídeos virulíferos não apresentaram preferência por nenhum dos tratamentos dentre as demais combinações testadas: Azos vs Controle (Fig. 18; GLM, teste binomial: WaldZ = 1,728, $P = 0,099$); Azos+PI vs PI (Fig. 18; GLM, teste binomial: WaldZ = -0,300, $P = 0,767$); Azos+PI+BYDV vs PI (Fig. 18; GLM, teste binomial: WaldZ = 0, $P = 1$); PI+BYDV vs Azos+PI+BYDV (Fig. 18; GLM, teste binomial: WaldZ = -1,111, $P = 0,281$); PI+BYDV vs Azos+PI (Fig. 18; GLM, teste binomial: WaldZ = 0,596, $P = 0,559$).

Figura 18. Preferência olfativa de *Rhopalosiphum padi* virulíferos por plantas: Azos vs Controle; Azos+PI vs PI; Azos+PI vs PI+BYDV; Azos+PI+BYDV vs PI e Azos+PI+BYDV vs PI+BYDV, em teste de dupla escolha. Os gráficos de pizza à direita representam a proporção de afídeos que fizeram ou não escolha aos tratamentos testados. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,001$).

3.3.2 Preferência hospedeira e colonização por alados de *Rhopalosiphum padi*

Alados não-virulíferos de *R. padi* criados em plantas sem colonização bacteriana (população controle) apresentaram preferência por plantas pré-induzidas (PI) em relação as plantas BYDV-infectadas (PI+BYDV) (Fig. 19; GLM, teste binomial: $WaldZ = 4,211$, $P < 0,001$) assim como a plantas Azos+PI+BYDV (Fig. 19; GLM, teste binomial: $WaldZ = 3,361$, $P = 0,005$). Afídeos alados (não-virulíferos) também apresentaram preferência por plantas pré-induzidas (PI) em relação a plantas Azos+PI, entretanto essa maior preferência foi apenas marginalmente significativa (Fig. 19; GLM, teste binomial: $WaldZ = 2,077$, $P = 0,052$). Adicionalmente, plantas submetidas apenas à inoculação bacteriana (Azos) foram mais atrativas aos afídeos alados em relação a plantas controle (Fig. 19; GLM, teste binomial: $WaldZ = 2,318$, $P = 0,0204$). Nenhum dos demais contrastes apresentaram atratividade significativos pelos afídeos: PI+BYDV vs Azos+PI+BYDV (Fig. 19; GLM, teste binomial:

WaldZ = -0,994, $P=0,334$); PI+BYDV vs Azos+PI (Fig. 19; GLM, teste binomial: WaldZ = 1,772, $P=0,093$).

Figura 19. Preferência hospedeira por alados de *Rhopalosiphum padi* não-virulíferos entre plantas: Azos vs Controle; Azos+PI vs PI; Azos+PI vs PI+BYDV; Azos+PI+BYDV vs PI e Azos+PI+BYDV vs PI+BYDV, em teste de livre escolha. Os gráficos de pizza à direita representam a proporção de afídeos que fizeram ou não escolha aos tratamentos testados. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos ($P<0,001$).

Por outro lado, diferente dos afídeos alados obtidos da população controle, alados oriundos de criação mantida em plantas inoculadas com solução bacteriana comercial (População Nitro) não apresentaram preferência entre plantas BYDV-infetadas (PI+BYDV) e plantas PI (Fig. 20; GLM, teste binomial: WaldZ = 0,267, $P=0,795$). Entretanto, os alados apresentaram preferência por plantas Azos+PI quando confrontadas com plantas PI+BYDV (Fig. 20; GLM, teste binomial: WaldZ = 5,113, $P=0,002$). Adicionalmente, quando foi dada a escolha entre plantas Azos+PI+BYDV e plantas PI, observou-se maior preferência dos alados por plantas PI (Fig. 20; GLM, teste binomial: WaldZ = 3,400, $P<0,001$). Para as demais combinações de tratamentos não houve preferência pelos alados: Azos vs Controle (Fig. 20; GLM, teste binomial: WaldZ = -0,349, $P=0,735$); Azos+PI vs PI (Fig. 20; GLM, teste binomial:

Wald_Z = -1,532, $P=0,148$); PI+BYDV vs Azos+PI+BYDV (Fig. 20; GLM, teste binomial: Wald_Z = 1,649, $P=0,099$).

Figura 20. Preferência hospedeira por alados de *Rhopalosiphum padi* (oriundos de população criada em plantas inoculadas com a bactéria *Azospirillum brasilense*) não-virulíferos entre plantas: Azos vs Controle; Azos+PI vs PI; Azos+PI vs PI+BYDV; Azos+PI+BYDV vs PI e Azos+PI+BYDV vs PI+BYDV, em teste de livre escolha. Os gráficos de pizza à direita representam a proporção de afídeos que fizeram ou não escolha aos tratamentos testados. Asteriscos indicam diferença significativa entre os tratamentos (** $P<0,01$; *** $P<0,001$).

3.4 Discussão

Efeito da inoculação de *A. brasilense* sobre a preferência olfativa de formas ápteras de *R. padi*

Interações entre vírus de plantas e seus vetores são amplamente discutidas na literatura devido as diversas estratégias desenvolvidas por esse grupo de patógenos a fim de manipular o comportamento de seus vetores, aumentando assim suas chances de dispersão (Mcelhany *et al.*, 1995; Ng e Falk, 2006; Stafford *et al.*, 2011; Ingwell *et al.*, 2012; Mauck *et al.*, 2012). Um dos mecanismos observados para o *Barley Yellow Dwarf Virus* (BYDV) tem sido a manipulação da planta hospedeira tornando-a não apenas mais atrativa a seus vetores, mas nutricionalmente

superior (Blua *et al.*, 1994), garantindo assim a alimentação dos insetos nas plantas por tempo necessário para a aquisição viral (Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger e Zemetra, 2004; Porras *et al.*, 2018). Nossos resultados demonstraram que de fato plantas infectadas (PI+BYDV) são mais atrativas à adultos ápteros de *R. padi* em relação a plantas submetidas apenas a pré-indução (PI) (Fig. 17). Resultados semelhantes foram também observados (Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger, Zemetra, *et al.*, 2004; Medina-Ortega *et al.*, 2009), onde adultos ápteros não-virulíferos de *R. padi* também apresentaram preferência por plantas vírus-infectadas. Tal comportamento vem sendo amplamente discutido como uma estratégia para a dispersão viral, uma vez que afídeos não-virulíferos apresentam preferência por plantas vírus-infectadas, comportamento que contribui para aquisição do vírus pelo vetor (Ingwell *et al.*, 2012; Rajabaskar *et al.*, 2014).

Diversos fatores podem afetar o sucesso da aquisição viral, podendo este influenciar drasticamente sua taxa de transmissão (Smyrnioudis *et al.*, 2001; Paz, 2015; Van Munster *et al.*, 2017). Neste sentido, nossos resultados demonstram que apesar de os insetos apresentarem preferência por plantas vírus-infectadas, quando as plantas de trigo foram inoculadas com solução bacteriana à base de duas estirpes de *A. brasilense* (Ab-v5 e Ab-v6), esta preferência foi alterada. Uma vez que os insetos não mais apresentam preferência por plantas apenas infectadas (PI+BYDV), mas sim por plantas que foram previamente inoculadas com a bactéria e BYDV-infectadas (Azos+PI+BYDV). Da mesma forma, quando foram confrontadas plantas vírus infectadas com plantas submetidas à inoculação bacteriana seguida por pré-indução (Azos+PI), afídeos não-virulíferos apresentaram preferência pelas plantas inoculadas (Fig. 17).

Após a aquisição viral, outro ponto crítico no ciclo das relações patógeno hospedeiro está relacionada a transmissão do vírus por meio de seu vetor (Power *et al.*, 1991; McElhany *et al.*, 1995; Dader *et al.*, 2017; Heck, 2018). Afídeos da espécie *R. padi*, em geral, após a aquisição do vírus BYDV por meio da alimentação em plantas infectadas tem sua preferência hospedeira alterada, uma vez que, enquanto afídeos não-virulíferos apresentam preferência por plantas BYDV-infectadas, após a aquisição viral a preferência dos vetores se dá por plantas não infectadas (sadias) (Medina-Ortega *et al.*, 2009; Bosque-Perez e Eigenbrode, 2011; Ingwell *et al.*, 2012). De fato, nossos resultados corroboram com este padrão, uma vez que afídeos ápteros virulíferos apresentaram preferência por plantas sadias em relação as plantas BYDV-infectadas (Fig. 18). Entretanto, quando inserimos a inoculação com *A. brasilense* nesse sistema os afídeos não apresentaram nenhuma preferência entre os tratamentos confrontados, independente das plantas estarem ou não infectadas (Fig. 18). Mudanças na resposta dos vetores as plantas após

a aquisição viral possui grande potencial para afetar a propagação da doença (Mcelhany *et al.*, 1995; Sisterson, 2008; Bosque-Perez e Eigenbrode, 2011).

Nas últimas décadas diversos estudos tem mostrado redução na incidência de doenças virais pela inoculação de bactérias benéficas (Murphy *et al.*, 2003; Al-Ani *et al.*, 2011; Beris *et al.*, 2018). Entretanto, esta é a primeira vez em que se observa a redução na atratividade de vetores não-virulíferos para plantas vírus-infectadas, assim como a plantas não infectadas por afídeos virulíferos por meio da inoculação bacteriana. Nossos resultados sugerem que a redução no crescimento populacional do vetor observado em de todas as plantas submetidas a inoculação bacteriana em relação as plantas que foram apenas BYDV-infectadas (*dados apresentados no primeiro capítulo desta tese*), assim como, a preferência do vetor por plantas Azos+PI+BYDV ou Azos+PI, em relação as plantas apenas PI+BYDV, e a redução na atratividade dos afídeos virulíferos as plantas saudáveis, a inoculação de plantas de trigo com a bactéria *A. brasilense* pode vir a afetar a taxa de transmissão secundária do BYDV (transmissão em curtas distâncias), podendo desta forma auxiliar no manejo da doença.

Efeito da inoculação de *A. brasilense* sobre a escolha hospedeira e colonização de formas aladas de *R. padi*

Vírus pertencentes a família Luteoviridae como é o caso do BYDV-PAV, são estritamente dependentes de seus vetores para sua transmissão, sendo assim, focos de infecção primária só ocorrem pela imigração de afídeos alados virulíferos (Irwin e Thresh, 1990). Elucidar as relações entre vírus e formas aladas de seus vetores são, desta forma, essenciais para entender a dinâmica da dispersão da doença a longas distâncias (Ingwell *et al.*, 2012). Apesar de as interações entre BYDV e ápteros de *R. padi* serem amplamente estudadas (Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger e Zemetra, 2004; Jimenez-Martinez e Bosque-Perez, 2009; Medina-Ortega *et al.*, 2009; Bosque-Perez e Eigenbrode, 2011; Ingwell *et al.*, 2012), pouco se sabe a respeito de sua interação com alados desta espécie.

A busca hospedeira por formas aladas de afídeos pode ser influenciada por pistas olfativas (Nottingham *et al.*, 1991) e visuais (comprimento de ondas – amarelo e verde) (Kennedy *et al.*, 1961) à longas distâncias, ou a curtas distâncias, utilizando também de pistas olfativas (Chapman *et al.*, 1981; Nottingham e Hardie, 1993), como ácidos graxos de cadeias curtas e alguns sesquiterpenos (Phelan e Miller, 1982).

Assim como previamente observado (Medina-Ortega *et al.*, 2009), nossos resultados mostraram preferência dos alados não-virulíferos por plantas não-infectadas (PI) em relação a plantas vírus infectadas (PI+BYDV). Mesmo quando as plantas de trigo foram inoculadas com

A. brasiliense, de forma isolada (Azos+PI) ou combinada com a infecção por BYDV (Azos+PI+BYDV) os afídeos ainda apresentaram preferência por plantas sadias não-inoculadas (PI) (Fig. 19). Ao contrário do que se esperava, alados de *R. padi* não apresentaram o mesmo padrão de escolha do que observado para formas ápteras desta espécie.

Assim como os alados utilizados nos ensaios conduzidos por (Medina-Ortega *et al.*, 2009), os afídeos utilizados neste estudo também foram obtidos a partir de superpopulação (*Crowding*), podendo este fator afetar a escolha dos afídeos segundo esses mesmos autores. Entretanto, considerando que diversos fatores podem vir a induzir a produção de formas aladas em populações de afídeos, como qualidade nutricional (Johnson, 1966; Muller *et al.*, 2001), mudanças de fotoperíodo (Lees, 1959; 1963; Debarro, 1992), presença de predadores (Mehrparvar *et al.*, 2013), assim como a superpopulação (Johnson, 1965; Lees, 1967), pode-se considerar que na maioria das situações a produção de alados ocorre via algum tipo de stress, assim, qualquer método que venha a ser usado para obtenção desses indivíduos pode vir a influenciar sua escolha hospedeira de diferentes formas.

Ainda, considerando que uma das estratégias de dispersão características da infecção por BYDV se dá pela alteração de alguns parâmetros de sua planta hospedeira a fim de torná-la mais atrativa (Medina-Ortega *et al.*, 2009) e melhor nutricionalmente (Jimenez-Martinez e Bosque-Perez, 2009; Porras *et al.*, 2018) para seu vetor, levando este a um rápido crescimento populacional, e conseqüentemente produzindo mais formas aladas as quais irão garantir a dispersão viral para novas áreas, a obtenção de formas aladas para uso em laboratório por meio de superpopulação, reproduz o mais próximo do que aconteceria em um ambiente natural, tornando desta forma, o comportamento observado por esses afídeos confiável.

De fato, as respostas observadas para afídeos alados se mostraram contrárias à preferência observada por ápteros não-virulíferos, os quais apresentaram preferência por plantas BYDV-infectadas em relação a plantas controle. Entretanto, afídeos alados tiveram maior tempo assim como mais estímulos (olfativos, visuais e gustativos) para escolha hospedeira. Adicionalmente, utilizamos alados não-virulíferos nesses experimentos, e do ponto de vista epidemiológico da doença não reproduzimos uma situação de transmissão da mesma, uma vez que a transmissão primária da doença se dá pela imigração de alados virulíferos (Irwin e Thresh, 1990). Neste sentido, novos ensaios utilizando alados virulíferos são ainda necessários para que possamos elucidar os reais efeitos da inoculação bacteriana na escolha hospedeira desses insetos e como isso pode vir a afetar o patossistema do BYDV.

Adicionalmente, a resposta dos insetos a plantas são em geral resultado de sua experiência prévia com o hospedeiro (Bernays e Chapman, 1994), desta forma, a fim de verificar se afídeos alados oriundos de criação mantida em plantas inoculadas com *A. brasilense* apresentariam mudanças em sua escolha hospedeira, os mesmos ensaios conduzidos com insetos oriundos de população controle foram executados com formas aladas da população Azos. De fato, os resultados observados para insetos da população Azos foram diferentes daqueles obtidos para a população controle, entretanto, esses ainda são inconclusivos sendo necessários mais testes a fim de entender melhor o efeito da inoculação com *A. brasilense* sobre o patossistema do BYDV.

2.5 Considerações finais

Os resultados aqui apresentados demonstraram que a inoculação de plantas com *A. brasilense* alterou a preferência hospedeira dos afídeos ápteros de *R. padi*. Embora, afídeos não-virulíferos tenham apresentado preferência por plantas BYDV-infectadas, estratégia viral conhecida por aumentar a taxa de aquisição viral por seus vetores (Jimenez-Martinez, Bosque-Perez, Berger, Zemetra, *et al.*, 2004; Medina-Ortega *et al.*, 2009) com a inoculação bacteriana, este comportamento foi alterado, uma vez que os afídeos passaram a não mais apresentar preferência por estas plantas.. Por outro lado, apesar dos afídeos virulíferos apresentarem preferência por plantas não infectadas, comportamento também já conhecido por favorecer a transmissão do vírus, afídeos virulíferos de *R. padi*, não apresentaram preferência entre plantas inoculadas e não inoculadas com *A. brasilense*. Neste caso, este comportamento ainda precisa ser melhor compreendido, uma vez que a redução no encontro de plantas saudáveis pelos afídeos virulíferos, pode vir a afetar a taxa de transmissão viral.

Ainda que os ensaios realizados com afídeos alados sejam inconclusivos, a criação destes em plantas inoculadas com *A. brasilense* não pareceu afetar os padrões de resposta comparativamente àqueles criados em plantas não inoculadas. Contudo, o efeito da inoculação bacteriana sobre esse morfotipo ainda necessita ser melhor estudado, assim como seus possíveis efeitos na transmissão primária do BYDV.

REFERÊNCIAS

Ajayi O (1986) The effect of barley yellow dwarf virus on the amino-acid-composition of spring wheat. **Annals of Applied Biology** 108:145-149. doi: 10.1111/j.1744-7348.1986.tb01975.x

- Ajayi O, Dewar AM (1983) The effect of barley yellow dwarf virus on field populations of the cereal aphids, *Sitobion avenae* and *Metopolophium dirhodum*. **Annals of Applied Biology** 103:1-11. doi: 10.1111/j.1744-7348.1982.tb01932.x
- Al-Ani RA, Adhab MA, El-Muadhidi MA, Al-Fahad MA (2011) Induced systemic resistance and promotion of wheat and barley plants growth by biotic and non-biotic agents against barley yellow dwarf virus. **African Journal of Biotechnology** 10:12079-12084. doi: 10.5897/AJB11.1921
- Andret-Link P, Fuchs M (2005) Transmission specificity of plant viruses by vectors. **Journal of Plant Pathology** 87:153-165
- Badri DV, Weir TL, van der Lelie D, Vivanco JM (2009) Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. **Current Opinion in Biotechnology** 20:642-650. doi: 10.1016/j.copbio.2009.09.014
- Bano A, Muqarab R (2017) Plant defence induced by PGPR against *Spodoptera litura* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Plant Biology** 19:406-412. doi: 10.1111/plb.12535
- Beris D, Theologidis I, Skandalis N, Vassilakos N (2018) *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus Y. **Scientific Reports** 8. doi: 10.1038/s41598-018-28677-3
- Blua MJ, Perring TM, Madore MA (1994) Plant virus-induced changes in aphid population development and temporal fluctuations in plant nutrients. **Journal of Chemical Ecology** 20:691-707. doi: 10.1007/bf02059607
- Bosque-Perez NA, Eigenbrode SD (2011) The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: Insights from luteovirus pathosystems. **Virus Research** 159:201-205. doi: 10.1016/j.virusres.2011.04.020
- Castle SJ, Mowry TM, Berger PH (1998) Differential settling by *Myzus persicae* (Homoptera : Aphididae) on various virus infected host plants. **Annals of the Entomological Society of America** 91:661-667. doi: 10.1093/aesa/91.5.661
- Chapman RF, Bernays EA, Simpson SJ (1981) Attraction and repulsion of the aphid, *cavariella-aegopodii*, by plant odors. **Journal of Chemical Ecology** 7:881-888. doi: 10.1007/bf00992385
- D'Arcy CJ, Burnett PA (1995) **Barley yellow dwarf: 40 years of progress**. APS Press, St. Paul, MN (USA). 374 p. ISBN 0-89054-167-1
- Dader B, Then C, Berthelot E, Ducouso M, Ng JCK, Drucker M (2017) Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation. **Insect Science** 24:929-946. doi: 10.1111/1744-7917.12470
- Debarro PJ (1992) The role of temperature, photoperiod, crowding and plant-quality on the production of alate viviparous females of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata** 65:205-214
- Demétrio CGB, Hinde J, Moral RA (2014) Models for Overdispersed Data in Entomology. In: Ferreira CP, Godoy WAC (eds) **Ecological Modelling Applied to Entomology**. Springer International Publishing, Cham, pp 219-259
- Eigenbrode SD, Ding HJ, Shiel P, Berger PH (2002) Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera :

Aphididae). **Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences** 269:455-460. doi: 10.1098/rspb.2001.1909

Fereres A, Araya JE, Housley TL, Foster JE (1990) Carbohydrate-composition of wheat infected with barley yellow dwarf virus. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 97:600-608. doi: NA

Haas D, Defago G (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology** 3:307-319. doi: 10.1038/nrmicro1129

Heck M (2018) Insect Transmission of Plant Pathogens: a Systems Biology Perspective. **Msystems** 3. doi: 10.1128/mSystems.00168-17

Hinde J, Demetrio CGB (1998) Overdispersion: Models and estimation. **Computational Statistics & Data Analysis** 27:151-170. doi: 10.1016/s0167-9473(98)00007-3

Ingwell LL, Eigenbrode SD, Bosque-Perez NA (2012) Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. **Scientific Reports** 2. doi: 10.1038/srep00578

Irwin ME, Thresh JM (1990) Epidemiology of barley yellow dwarf - a study in ecological complexity. **Annual Review of Phytopathology** 28:393-424. doi: 10.1146/annurev.py.28.090190.002141

Jimenez-Martinez ES, Bosque-Perez NA (2009) Life history of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, on transgenic and non-transformed wheat challenged with Wheat streak mosaic virus. **Entomologia Experimentalis Et Applicata** 133:19-26. doi: 10.1111/j.1570-7458.2009.00905.x

Jimenez-Martinez ES, Bosque-Perez NA, Berger PH, Zemetra R, Ding HJ, Eigenbrode SD (2004a) Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera : Aphididae) to barley yellow dwarf virus-infected transgenic and untransformed wheat. **Environmental Entomology** 33:1207-1216

Jimenez-Martinez ES, Bosque-Perez NA, Berger PH, Zemetra RS (2004b) Life history of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera : Aphididae), on Transgenic and untransformed wheat challenged with Barley yellow dwarf virus. **Journal of Economic Entomology** 97:203-212. doi: 10.1603/0022-0493-97.2.203

Johnson B (1965) Wing polymorphism in aphids II. Interaction between aphids. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 8:49-64

Johnson B (1966) Wing Polymorphism in aphids .3. influence of host plant. **Entomologia Experimentalis Et Applicata** 9:213-&. doi: 10.1111/j.1570-7458.1966.tb02352.x

Kennedy JS, Kershaw WJS, Booth CO (1961) HOST FINDING BY APHIDS IN FIELD .3. VISUAL ATTRACTION. **Annals of Applied Biology** 49:1-&. doi: 10.1111/j.1744-7348.1961.tb03587.x

Kloepper JW, Schroth MN, Miller TD (1980) Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology** 70:1078-1082. doi: 10.1094/Phyto-70-1078

Lees AD (1959) The role of photoperiod and temperature in the determination of parthenogenetic and sexual forms in the aphid *Megoura viciae* buckton .1. The influence of these factors on apterous virginoparae and their progeny. **Journal of Insect Physiology** 3:92-117. doi: 10.1016/0022-1910(59)90024-1

- Lees AD (1963)) The role of photoperiod and temperature in the determination of parthenogenetic and sexual forms in the aphid *Megoura viciae* buckton .3. Further properties of the maternal switching mechanism in apterous aphids. **Journal of Insect Physiology** 9:153-164. doi: 10.1016/0022-1910(63)90067-2
- Lees AD (1967) Production of apterous and alate forms in aphid *Megoura viciae* buckton with special reference to role of crowding. **Journal of Insect Physiology** 13:289-&. doi: 10.1016/0022-1910(67)90155-2
- Mauck K, Bosque-Perez NA, Eigenbrode SD, De Moraes CM, Mescher MC (2012) Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. **Functional Ecology** 26:1162-1175. doi: 10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x
- Mauck KE, De Moraes CM, Mescher MC (2010) Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 107:3600-3605. doi: 10.1073/pnas.0907191107
- McElhany P, Real LA, Power AG (1995) Vector preference and disease dynamics - a study of barley yellow dwarf virus. **Ecology** 76:444-457. doi: 10.2307/1941203
- McGrath PF et al. (1997) Coat protein-mediated resistance to isolates of barley yellow dwarf in oats and barley. **European Journal of Plant Pathology** 103:695-710. doi: 10.1023/a:1008675313312
- Medina-Ortega KJ, Bosque-Perez NA, Ngumbi E, Jimenez-Martinez ES, Eigenbrode SD (2009) *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) Responses to Volatile Cues From Barley Yellow Dwarf Virus-Infected Wheat. **Environmental Entomology** 38:836-845. doi: 10.1603/022.038.0337
- Mehrparvar M, Zytynska SE, Weisser WW (2013) Multiple Cues for Winged Morph Production in an Aphid Metacommunity. **PLoS ONE** 8:1-10. doi: 10.1371/journal.pone.0058323
- Miller WA, Rasochova L (1997) Barley yellow dwarf viruses. **Annual Review of Phytopathology** 35:167-190. doi: 10.1146/annurev.phyto.35.1.167
- Muller CB, Williams IS, Hardie J (2001) The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. **Ecological Entomology** 26:330-340. doi: 10.1046/j.1365-2311.2001.00321.x
- Murphy JF, Reddy MS, Ryu CM, Kloepper JW, Li RH (2003) Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. **Phytopathology** 93:1301-1307. doi: 10.1094/phyto.2003.93.10.1301
- Murphy JF, Zehnder GW, Schuster DJ, Sikora EJ, Polston JE, Kloepper JW (2000) Plant growth-promoting rhizobacterial mediated protection in tomato against Tomato mottle virus. **Plant Disease** 84:779-784. doi: 10.1094/pdis.2000.84.7.779
- Naeem M, Aslam Z, Khaliq A, Ahmed JN, Nawaz A, Hussain M (2018) Plant growth promoting rhizobacteria reduce aphid population and enhance the productivity of bread wheat. **Brazilian Journal of Microbiology** 49:9-14. doi: 10.1016/j.bjm.2017.10.005
- Ng JCK, Falk BW (2006) Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. **Annual Review of Phytopathology** 44:183-212. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143325

Nottingham SF, Hardie J (1993) Flight behavior of the black bean aphid, *Aphis fabae*, and the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae*, in host and nonhost plant odor. **Physiological Entomology** 18:389-394

Nottingham SF et al. (1991) Behavioral and electrophysiological responses of aphids to host and nonhost plant volatiles. **Journal of Chemical Ecology** 17:1231-1242. doi: 10.1007/bf01402946

Parizoto G, Rebonatto A, Schons J, Lau D (2013) Barley yellow dwarf virus-PAV in Brazil: Seasonal fluctuation and biological characteristics. **Tropical Plant Pathology** 38:11-19. doi: 10.1590/S1982-56762013000100002

Paz S (2015) Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. **Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences** 370. doi: 10.1098/rstb.2013.0561

Perring TM, Gruenhagen NM, Farrar CA (1999) Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. **Annual Review of Entomology** 44:457-481. doi: 10.1146/annurev.ento.44.1.457

Phelan PL, Miller JR (1982) Post-landing behavior of alate myzus-persicae as altered by (e)-beta-farnesene and 3 carboxylic-acids. **Entomologia Experimentalis Et Applicata** 32:46-53. doi: 10.1111/j.1570-7458.1982.tb03180.x

Pineda A, Zheng S-J, van Loon JJA, Pieterse CMJ, Dicke M (2010) Helping plants to deal with insects: the role of beneficial soil-borne microbes. **Trends in Plant Science** 15:507-514. doi: 10.1016/j.tplants.2010.05.007

Porras M, De Moraes CM, Mescher MC, Rajotte EG, Carlo TA (2018) A plant virus (BYDV) promotes trophic facilitation in aphids on wheat. **Scientific Reports** 8. doi: 10.1038/s41598-018-30023-6

Power AG, Seaman AJ, Gray SM (1991) Aphid transmission of barley yellow dwarf virus - inoculation access periods and epidemiologic implications. **Phytopathology** 81:545-548. doi: 10.1094/Phyto-81-545

Rajabaskar D, Bosque-Perez NA, Eigenbrode SD (2014) Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. **Virus Research** 186:32-37. doi: 10.1016/j.virusres.2013.11.005

Raupach GS, Liu L, Murphy JF, Tuzun S, Kloepper JW (1996) Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Plant Disease** 80:891-894. doi: 10.1094/pd-80-0891

Schroder ML, Glinwood R, Ignell R, Kruger K (2015) Landing Preference and Reproduction of *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) in the Laboratory on Three Maize, Potato, and Wheat Cultivars. **Journal of Insect Science** 15. doi: 10.1093/jisesa/iev048

Shankar ACU et al. (2009) Rhizobacteria-mediated resistance against the blackeye cowpea mosaic strain of bean common mosaic virus in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Pest Management Science** 65:1059-1064. doi: 10.1002/ps.1791

Sisterson MS (2008) Effects of insect-vector preference for healthy or infected plants on pathogen spread: Insights from a model. **Journal of Economic Entomology** 101:1-8. doi: 10.1603/0022-0493(2008)101[1:eoipfh]2.0.co;2

- Smyrnioudis IN, Harrington R, Clark SJ, Katis N (2001) The effect of natural enemies on the spread of barley yellow dwarf virus (BYDV) by *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera : Aphididae). **Bulletin of Entomological Research** 91:301-306. doi: 10.1079/ber2001110
- Stafford CA, Walker GP, Ullman DE (2011) Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 108:9350-9355. doi: 10.1073/pnas.1100773108
- van Munster M, Yvon M, Vile D, Dader B, Fereres A, Blanc S (2017) Water deficit enhances the transmission of plant viruses by insect vectors. **Plos One** 12. doi: 10.1371/journal.pone.0174398
- Weller DM (1988) Biological-control of soilborne plant-pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology** 26:379-407. doi: 10.1146/annurev.py.26.090188.002115
- Xu SJ, Kim BS (2014) Biocontrol of Fusarium Crown and Root Rot and Promotion of Growth of Tomato by *Paenibacillus* Strains Isolated from Soil. **Mycobiology** 42:158-166. doi: 10.5941/myco.2014.42.2.158
- Zehnder GW, Yao CB, Murphy JF, Sikora ER, Kloepper JW (2000) Induction of resistance in tomato against cucumber mosaic cucumovirus by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol** 45:127-137. doi: 10.1023/a:1009923702103