

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

ELIANA PELIÇON PEREIRA FIGUEIRA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E PRODUTIVAS DO FEIJOEIRO
INDUZIDAS POR *Trichoderma* spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM RESPOSTA AO
ATAQUE DE *Colletotrichum lindemuthianum***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2018

ELIANA PELIÇON PEREIRA FIGUEIRA

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS, ANATÔMICAS E PRODUTIVAS DO FEIJOEIRO
INDUZIDAS POR *Trichoderma* spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM RESPOSTA AO
ATAQUE DE *Colletotrichum lindemuthianum***

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Dr. Odair José Kuhn

Coorientador: Dr. José Renato Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Figueira, Eliana Peliçon Pereira
Alterações fisiológicas, anatômicas e produtivas do feijoeiro induzidas por *Trichoderma* spp. e fosfito de potássio em resposta ao ataque de *Colletotrichum lindemuthianum* / Eliana Peliçon Pereira Figueira; orientador(a), Odair José Kuhn; coorientador(a), José Renato Stangarlin , 2018.
118 f.

Tese (doutorado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Marechal Cândido Rondon, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2018.

1. *Phaseolus vulgaris*. 2. Indução de resistência. 3. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. I. Kuhn, Odair José. II. Stangarlin , José Renato . III. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000
Marechal Cândido Rondon - PR.



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

ELIANA PELIÇON PEREIRA FIGUEIRA

Alterações fisiológicas, anatômicas e produtivas do feijoeiro induzidas por *Trichoderma* spp. e fosfito de potássio em resposta ao ataque de *Colletotrichum lindemuthianum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia, área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Fitossanidade e Controle Alternativo, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientadora) - Odair José Kuhn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Vandeir Francisco Guimarães

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Cláudio Yuri Tsutsumi

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)


Roberto Luis Portz

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)


Márcia de Holanda Nozaki

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Toledo (PUC-Toledo)

Marechal Cândido Rondon, 10 de agosto de 2018

À Deus Pai, OFEREÇO!
À minha família, por todo o amor, cuidado, incentivo e por
compartilhar o meu sonho, DEDICO!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo sustento nas horas de dificuldades e por permitir a conclusão de mais um grande sonho.

Sou grata ao professor orientador de doutorado, Dr. Odair José Kuhn e ao professor coorientador Dr. José Renato Stangarlin pela disponibilidade, ensinamentos e incentivos.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, através do Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade.

À todos os professores e funcionários da Unioeste que colaboraram de forma direta ou indireta no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Vandeir Francisco Guimarães por disponibilizar o IRGA para realização das análises e ao colega André Gustavo Battistus, que se dispôs à auxiliar na sua utilização.

Ao IFPR, pela possibilidade de afastamento das atividades, para dedicação apenas à pós-graduação, pela disponibilidade de utilização de infraestrutura institucional e, ainda, a todos os colegas de trabalho que apoiaram e auxiliaram, especialmente a Camila Lampugnani Antunes de Caxias, a Layani Antonio Silva e a Andressa Bilha Cruz.

Aos amigos em especial Nicanor Henkemeier, Jefferson Carlos Carvalho, Eloisa Lorenzetti, Omari Dangelo Forlin Dildey, Anderson Luis Heling que sempre se dispuseram a ajudar na execução dos trabalhos.

Sou grata à colega de trabalho, colega de pós-graduação e amiga, Tatiane Martinazzo Portz, pelo apoio nas horas difíceis, pela companhia, pela confiança e segurança, por me auxiliar nas tarefas com toda dedicação e criteriosidade. Amiga, agora sou eu quem digo, você foi colocada por Deus para me ajudar a suportar e me acalantar nesta dura caminhada do doutorado. Obrigada!

À Minha família, especialmente aos meus filhos Mateus Augusto P. Figueira e Ana Luza P. Figueira, que mesmo pequenos souberam superar e entender os momentos de minha ausência, amo vocês!

Ao meu porto seguro, meu esposo, Onofre Ap. Figueira Dias, que suportou minhas ausências e me apoiou em todas as decisões nesta longa caminhada.

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e acreditaram no meu sonho! Em especial ao meu irmão Marcos Donizete Peliçon Pereira por auxiliar nas análises.

À minha cunhada Fabiana M. Secariolo Pereira pelo auxílio prestado.

E a todas as pessoas que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para a realização deste sonho.

“Não sei por quantas lutas irei passar, mas sei que nunca passarei sozinho!” (ISAIAS 43:2).

RESUMO

FIGUEIRA, Eliana Pelicon Pereira, Dr., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Agosto - 2018. **Alterações fisiológicas, anatômicas e produtivas do feijoeiro induzidas por *Trichoderma* spp. e fosfito de potássio em resposta ao ataque de *Colletotrichum lindemuthianum*.** Orientador: Odair José Kuhn. Coorientador: José Renato Stangarlin

No Brasil, a cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta grande importância socioeconômica, sendo o país um dos maiores produtores mundiais de feijão. Dentre os obstáculos do cultivo do feijoeiro estão as doenças de origem biótica, em destaque a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, podendo levar a perdas significativas na produtividade. A indução de resistência constitui uma alternativa ao controle da antracnose no feijoeiro. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo verificar a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. e fosfito de potássio no controle da antracnose, avaliar e identificar as respostas anatômicas e histológicas da indução de resistência no feijoeiro (*P. vulgaris*) em resposta ao ataque do *C. lindemuthianum*, bem como avaliar aspectos fisiológicos e produtivos da cultura. Os tratamentos consistiram de dois isolados: *T. harzianum* (isolado TOD1) e *T. virens* (isolado TM4), do fertilizante foliar Fosfito de Potássio Fertilis® e do tratamento com água destilada (controle). Os indutores foram aplicados no feijoeiro isoladamente ou combinados, constituindo cinco tratamentos mais o tratamento controle. Os seis tratamentos foram avaliados na ausência e presença de *C. lindemuthianum* em esquema fatorial (6x2). Mediante os tratamentos realizados, avaliou-se a severidade da antracnose no feijoeiro; as alterações anatômicas e histológicas da folha, raiz e caule; os teores de compostos fenólicos e lignina nas folhas; as trocas gasosas; localização de H₂O₂; deposição de lignina e resposta de hipersensibilidade em hipocótilo de feijoeiro por colorações histoquímicas; e os parâmetros agrônômicos da cultura. Em condições de casa de vegetação verificou-se que o fosfito de potássio e as combinações de *Trichoderma virens* e *Trichoderma harzianum* com fosfito de potássio reduzem a severidade da doença; *Trichoderma virens* e *Trichoderma harzianum* associado a fosfito de potássio aumentam a espessura do folíolo, aumentam o diâmetro do xilema e aceleram o desenvolvimento do feijoeiro; *Trichoderma virens* combinado com fosfito de potássio aumenta o teor de lignina da folha; *Trichoderma harzianum* combinado com fosfito de potássio aumenta a taxa fotossintética do feijoeiro. Em estudos com o hipocótilo, verificou-se que *Trichoderma harzianum* combinado com fosfito de potássio acelera o processo de reação de hipersensibilidade e acúmulo de H₂O₂ no local de penetração do patógeno. Com relação aos

componentes de produção, o tratamento com *Trichoderma harzianum* combinado com fosfito de potássio promoveu um aumento no número de vagens por planta e na massa de cem grãos. Dessa forma, conclui-se que a combinação dos isolados de *Trichoderma* spp. e fosfito de potássio favoreceu o desenvolvimento do feijoeiro e promoveu o controle da antracnose no feijoeiro.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Antracnose. Indução de resistência

ABSTRACT

FIGUEIRA, Eliana Pelicon Pereira, Dr., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, August - 2018. **Physiological, anatomical and productive changes of beans induced by *Trichoderma* spp. and potassium phosphate in response to the attack of *Colletotrichum lindemuthianum*.** Advisor: Odair José Kuhn. Co-Advisor: José Renato Stangarlin.

In Brazil, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivation shows a great socioeconomic importance, since the country is one of the world's largest producers. Among the obstacles of bean cultivation, there are diseases of biotic origin, in particular anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, which may lead to significant losses in productivity. Resistance induction is an alternative to anthracnose control in common bean. Thus, this paper aimed to verify the efficiency of *Trichoderma* spp. and potassium phosphite in the control of anthracnose, evaluate and identify the anatomical and histological responses of resistance induction in common bean (*P. vulgaris*) in response to the attack of *C. lindemuthianum*, as well as to evaluate the physiological and productive aspects of the culture. The treatments consisted of two isolates, *T. harzianum* (TOD1 isolate) and *T. virens* (TM4 isolate), Fertilis™ Potassium Phosphite leaf fertilizer and treatment with distilled water (control). The inducers were applied to the bean plant alone or combined, constituting five treatments in addition to the control treatment. The six treatments were assessed in the absence and presence of *C. lindemuthianum* in a factorial scheme (6x2). Through the treatments, it was evaluated the anthracnose severity in bean; the anatomical and histological changes of leaf, root and stem; the contents of phenolic compounds and lignin in bean leaves; gas exchanges; location of H₂O₂; deposition of lignin and hypersensitivity response in hypocotyl of common bean by histochemical staining; and the agronomic parameters of the cultivation. Under greenhouse conditions, it was verified that potassium phosphite and combinations of *Trichoderma virens* and *Trichoderma harzianum* with potassium phosphite reduce the severity of the disease; *Trichoderma virens* and *Trichoderma harzianum* associated with potassium phosphite increase the leaflet thickness, the xylem diameter and accelerated the development of bean plant; *Trichoderma virens* combined with potassium phosphite increases the lignin content of the leaf; *Trichoderma harzianum* combined with potassium phosphite increases the rate of photosynthesis in common bean. In studies on hypocotyl, it was verified that *Trichoderma harzianum* combined with potassium phosphite accelerates the process of hypersensitivity reaction and accumulation of H₂O₂ in the place of pathogen penetration. Regarding the production components, treatment with *Trichoderma harzianum*

combined with potassium phosphite promoted an increase in the number of pods/plant and in the mass of one hundred seeds. Thus, it is concluded that the combination of *Trichoderma* spp. and potassium phosphite promoted the development of common bean and promoted the control of anthracnose.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Anthracnose. Induction of resistance.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Corte transversal da lâmina foliolar de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola. Fonte: Moreira (2014). 5
- Figura 2.** Sistema radicular de plantas de feijão IPR- Tangará na fase V4 mostrando as diferentes classes de raiz que o compõe. RP: raiz primária; RB: raiz basal; RA: raiz adventícia; RL: raiz lateral. Foto: Eliana P. Pereira Figueira (2016). 7
- Figura 3.** Secção transversal da raiz principal da planta de *Phaseolus vulgaris* L., com duas semanas de idade, mostrando sua estrutura primária; CV: cilindro vascular. Fonte: Nassar; Boghdady; Ahmed (2010). 8
- Figura 4.** Esquema do corte transversal do caule de *Phaseolus vulgaris*. 1: epiderme; 2: colênquima; 3: parênquima cortical; 4: bainha amilífera; 5: vasos do floema; 6: faixa cambial; 7: vasos do xilema; 8: parênquima medular (medula). Fonte: adaptado de Hallak et al. (1999). 10
- Figura 5.** Esquema simplificado das rotas envolvidas na síntese de metabólitos secundários. Fonte: Taiz e Zeiger (2009). 14
- Figura 6.** **A:** Placa com cultura de *Colletotrichum lindemuthianum*. **B:** conídios de *C. lindemuthianum*. **C:** Acérvulo e conídios de *C. lindemuthianum*. Seta: conídios, A: acérvulo. Foto: Eliana P. Pereira Figueira e Fred Books. 26
- Figura 7.** Sintomas da antracnose no feijoeiro. **A:** Trifólio com nervuras escurecidas. **B:** lesões no pecíolo. **C:** Vagens com lesões circulares e deprimidas, de coloração marrom escura com centro mais claro. Fotos: Eliana P. Pereira Figueira e Nicanor Pilarski Henkemeier (2016). 27
- Figura 8.** Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999). 43
- Figura 9.** Folha do feijoeiro com sintomas de antracnose. Em destaque a Região do trifólio central onde foi coletado o tecido para avaliação anatômica e histológica. Foto: Eliana P. Pereira Figueira (2016). 45
- Figura 10.** Sistema radicular do feijoeiro. A tesoura aponta a região onde foi coletado o tecido para avaliação anatômica e histológica. Foto: Eliana P. Pereira Figueira (2016). 46
- Figura 11.** Sistema radicular do feijoeiro com parte do caule. A região em destaque refere-se ao local de coleta da porção do caule. Foto: Eliana P. Pereira Figueira (2016). 47
- Figura 12.** Curva padrão para cálculo base do teor de fenóis a partir da absorvância. 48
- Figura 13.** Curva padrão para cálculo base do teor de lignina a partir da absorvância. 48
- Figura 14.** Folhas de feijoeiro, cultivar IPR-Tangará, com sintomas típicos de antracnose. A figura mostra a diferença na severidade da doença mediante os tratamentos indutores. Em **A:**

Tratamento controle; **B**: Tratamento com *Trichoderma harzianum* + fosfito de K; **C**: Tratamento com Fosfito de K; **D**: Tratamento com *Trichoderma virens* + fosfito de K. 56

Figura 15. Secções transversais da região mediana do folíolo central de *Phaseolus vulgaris* no estágio V4, submetido aos diferentes tratamentos indutores e ao tratamento controle. **A**: Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam o tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K; **B**: Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam o tratamento com *T. virens* + fosfito de K; **C**: Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam o tratamento com *T. virens*; **D**: Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam os tratamentos com fosfito de K; **E** e **F**: Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam o tratamento controle, **E**: ausência do Patógeno, **F**: presença do patógeno. PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; AD: epiderme adaxial; AB: epiderme abaxial; M: mesófilo; V: vasos condutores. Coloração: azul de alcian e safranina..... 59

Figura 16. Detalhe da lâmina foliolar, evidenciando a porção inferior do mesófilo e a epiderme abaxial. As setas indicam a região do parênquima lacunoso onde é observada leve constrição de coloração avermelhada no tecido. PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; AB: epiderme abaxial; M: mesófilo; V: vasos condutores. Coloração: azul de alcian e safranina..... 65

Figura 17. Secções transversais da raiz primária de *Phaseolus vulgaris* no estágio V4, submetido aos diferentes tratamentos indutores. **A** e **B**: Tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K; **C** e **D**: Tratamento com *T. virens*; **E** e **F**: Tratamento com *T. virens* + fosfito de K; **G**: Tratamento com fosfito de K; **H**: tratamento controle. Cilindro vascular (CV); Setas indicam os vasos do xilema. Coloração: safranina e azul de alcian. 67

Figura 18. Secções transversais de parte do caule de *Phaseolus vulgaris*, no estágio V4, que foram submetidos aos diferentes tratamentos indutores e tratamento controle. **A**: Tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K; **B**: Tratamento controle. X: feixes de xilema; FC: faixa cambial; PE: periciclo; P: parênquima medular; C: córtex. Coloração: safranina e azul de alcian..... 72

Figura 19. Secções transversais de parte do caule de *Phaseolus vulgaris*, no estágio V4, que foram submetidos aos diferentes tratamentos indutores e tratamento controle. **A**: Tratamento com *T. virens*; **B**: Tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K; **C**: Tratamento com *T. virens* + fosfito de K; **D**: Tratamento controle. Seta branca indica a faixa cambial; P: parênquima medular; C: córtex; BA: bainha amilífera; E: epiderme; F: feixes de floema; X: feixes de xilema. Coloração: safranina e azul de alcian. 73

Figura 20. Localização H_2O_2 *in situ* no hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma harzianum* + fosfito de K e inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum*. **A**, **B** e **C**: Fotomicrografia da epiderme do hipocótilo com detecção de H_2O_2 no tempo de 24 horas a.i. nas células da epiderme ao redor dos estômatos. CO: conídio de *Colletotrichum lindemuthianum*; HI: hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; ET: estômato; CE : célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão..... 80

Figura 21. Localização de H_2O_2 *in situ* no hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma harzianum* + fosfito de K, no tempo de 48 horas a.i. **A**, **B** e **C**: Fotomicrografia de porções da epiderme do hipocótilo com detecção de H_2O_2 nas células. HI :

hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; CE : célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão. 81

Figura 22. Localização de H_2O_2 *in situ* no hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma virens* + fosfito de K, no tempo de 48 horas a.i. **A, B e C:** Fotomicrografia da epiderme do hipocótilo com detecção de H_2O_2 . CO: conídio de *Colletotrichum lindemuthianum*; HI: hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; ET: estômato; CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão..... 82

Figura 23. Localização de H_2O_2 *in situ* no hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma virens* + fosfito de K, no tempo de 48 horas a.i. **A B e C:** Fotomicrografia da epiderme do hipocótilo com detecção de H_2O_2 . CO: conídio de *Colletotrichum lindemuthianum*; HI: hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; ET: estômato; CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão..... 83

Figura 24. Localização de H_2O_2 *in situ* na epiderme do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma virens* e fosfito de K, no tempo de 96 horas a.i. **A e B:** Tratamento com *Trichoderma virens*; **C:** Tratamento com fosfito de K. CO: conídio de *Colletotrichum lindemuthianum*; HI: hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; ET: estômato; CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão..... 84

Figura 25. Deposição de lignina na epiderme em hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com *Trichoderma virens* + fosfito de K 48 horas a.i. CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme com deposição de lignina..... 87

Figura 26. Deposição de lignina na epiderme do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com diferentes tratamentos indutores e inoculados com *C. lindemuthianum*. **A:** controle (96 horas a.i.) **B:** *Trichoderma harzianum* (96 horas a.i.); **C** fosfito de K- 72 horas a.i.; **D:** *Trichoderma virens* (72 horas a.i.); **E e F:** *Trichoderma harzianum* + fosfito de K (72 horas a.i.); **G e H:** *Trichoderma virens* + fosfito de K (48 horas a.i.). CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme com deposição de lignina. As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão. 88

Figura 27. Células da epiderme do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* controle na ausência de *Colletotrichum lindemuthianum*, mostrando a reposta do tecido sadio à coloração com vermelho neutro em tampão fosfato de K (pH 7,6) e sacarose. **A:** porção da epiderme 5 minutos após a imersão em solução com vermelho neutro, mostrando células em plasmólise inicial. **B:** porção a epiderme 7 minutos após ter recebido a solução com o corante, sendo observado o vanço do processo de plasmólise. **C:** porção da epiderme controle 10 minutos após ter recebido a solução com o corante. Seta indica a retração da membrana plasmática com o conteúdo celular de algumas das células que sofreram plasmólise. 90

Figura 28. Resposta de hipersensibilidade em células epiderme do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com diferentes tratamentos indutores e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. As imagens apresentam porções da epiderme coradas com a solução de vermelho neutro. Nas imagens observam-se células epidermais com três os tipos de respostas

observadas para os tratamentos com *Trichoderma harzianum* + fosfito de K e *T. virens* + fosfito de K. (CP): células vivas plasmolisadas (sem a ocorrência de resposta de hipersensibilidade); (RH): células em RH que não plasmolisaram e não reteram o corante; (RHV): células que não plasmolisaram, mas coraram fortemente de vermelho, devido à presença de compostos fenólicos. As RHV apresentam citoplasma desorganizado com distribuição irregular do corante. MP: membrana plasmática, PC: parede celular. 91

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tratamentos indutores utilizados na presença e na ausência do patógeno 41
- Tabela 2.** Análise conjunta da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para antracnose no feijoeiro comum, cultivados em casa de vegetação e tratados com *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* + fosfito de K, *Trichoderma virens* + fosfito de K e o controle água..... 53
- Tabela 3.** Espessura do parênquima paliçádico (μm) do folíolo central de plantas de feijoeiro, no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*..... 57
- Tabela 4.** Espessura do parênquima lacunoso (μm) do folíolo central de plantas de feijoeiro, no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*..... 60
- Tabela 5.** Espessura da epiderme abaxial e adaxial (μm) do folíolo central de plantas de feijoeiro no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*..... 61
- Tabela 6.** Diâmetro dos vasos do xilema (μm) da raiz primária de plantas de feijoeiro, no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*..... 66
- Tabela 7.** Diâmetro dos vasos do xilema (μm) do caule de plantas de feijoeiro, no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*..... 69
- Tabela 8.** Diâmetro do córtex (μm) caulinar de plantas de feijoeiro no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*. 70

Tabela 9. Teor de fenóis totais (mg de catecol g⁻¹ de tecido seco) em tecido foliar do feijoeiro no início do estágio V4, cultivados em casa de vegetação e tratados com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*. 74

Tabela 10. Teor de lignina (mg de lignina g⁻¹ de tecido seco) em tecido foliar do feijoeiro no início do estágio V4, cultivados em casa de vegetação e tratados com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*. 76

Tabela 11. Valores das trocas gasosas do tecido foliolar do feijoeiro no início do estágio V4, cultivados em casa de vegetação e tratados com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos, na presença de *C. lindemuthianum*. 77

Tabela 12. Valores médios do volume da raiz, diâmetro do caule e altura da planta do feijoeiro IPR- Tangará, aos 72 dias após o plantio, cultivado em casa de vegetação e tratado com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias gerais obtidas nos diferentes tratamentos... 93

Tabela 13. Valores médios do número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de cem grãos obtidas do feijoeiro IPR- Tangará, aos 72 dias após o plantio, cultivado em casa de vegetação e tratado com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*. 94

Tabela 14. Correlação entre os tratamentos indutores aplicados no feijoeiro e as alterações observadas (variáveis analisadas). Os valores apresentados na tabela correspondem aos valores médios da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD); da espessura do parênquima paliçádico (µm), do parênquima lacunoso (µm), da epiderme abaxial e epiderme adaxial (µm); do diâmetro dos vasos do xilema da raiz e do caule (µm); do teor de lignina (mg de lignina g⁻¹ de tecido seco); da taxa fotossintética (µmol CO₂ m⁻² s⁻¹); do número de vagens por planta e da massa de cem grãos (g), obtidos do feijoeiro cultivar IPR-Tangará, cultivado em casa de vegetação. Os seis tratamentos indutores utilizados no trabalho foram: *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela correlaciona as médias obtidas em cada tratamento na presença de *C. lindemuthianum*. 96

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	CULTURA DO FEIJOEIRO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	3
2.2	CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS DO FEIJOEIRO	4
2.2.1	Folha.....	4
2.2.2	Sistema Radicular	6
2.2.3	Caule	9
2.3	METABOLISMO VEGETAL	11
2.3.1	Metabolismo Primário.....	11
2.3.2	Metabolismo Secundário.....	13
2.3.3	Espécies reativas de oxigênio (EROs)	18
2.4	INTERAÇÃO PLANTA-MICROORGANISMO	19
2.4.1	Interações Positivas	20
2.4.2	Interações Negativas	24
2.5	CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS	28
2.6	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	30
2.6.1	Mecanismos de Indução de Resistência	32
2.7	RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE	34
2.8	PRIMING.....	35
2.9	FOSFITO COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp.....	40
3.2	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO INÓCULO DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	40
3.3	TRATAMENTO INDUTOR	41
3.4	CULTIVO DO FEIJOEIRO INDUZIDO POR <i>Trichoderma</i> spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	42
3.4.1	Avaliação da severidade da doença.....	43
3.4.2	Coleta e Armazenamento das Amostras de Tecido Vegetal	44
3.4.3	Análises morfoanatômicas	44
3.4.4	Determinação dos teores de fenóis totais	47
3.4.5	Determinação de teores de lignina	48
3.4.6	Trocas Gasosas.....	49

3.5 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA MEDIADA POR <i>Trichoderma</i> spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM HIPOCÓTILO DE FEIJOEIRO	49
3.5.1 Localização de H ₂ O ₂ <i>in situ</i>	50
3.5.2 Deposição de lignina	50
3.5.3 Ocorrência de reação de hipersensibilidade (RH)	51
3.6 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E COMPONENTES DE PRODUÇÃO	51
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	52
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 CULTIVO DO FEIJOEIRO INDUZIDO POR <i>Trichoderma</i> spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	53
4.1.1 Severidade da doença	53
4.1.2 Análises morfoanatómicas	56
4.1.3 Teor de fenóis totais.....	73
4.1.4 Teor de Lignina.....	75
4.1.5 Trocas Gasosas.....	76
4.2 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA MEDIADA POR <i>Trichoderma</i> spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM HIPOCÓTILO DE FEIJOEIRO	79
4.2.1 Localização de H ₂ O ₂ <i>in situ</i>	79
4.2.2 Deposição de Lignina.....	85
4.2.3 Resposta de hipersensibilidade	89
4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E COMPONENTES DE PRODUÇÃO	92
5 CONCLUSÕES.....	97
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é bastante difundida no Brasil, sendo o país o terceiro produtor mundial e o principal consumidor da leguminosa (COELHO, 2017). Apesar de ser uma cultura economicamente expressiva, a produtividade média nacional é considerada baixa, sendo que na safra de 2016/17 foram registrados 1.069 kg ha⁻¹ de grãos (PEREIRA et al., 2014; CONAB, 2018). Diversos fatores podem estar associados ao baixo rendimento da cultura, entre os quais destacam-se as condições climáticas desfavoráveis, acidez do solo, condição nutricional deficitária e o manejo inadequado de pragas (PAULA JÚNIOR et al., 2015).

Somando a estes fatores estão as doenças de origem biótica, e uma vez associada, podem contribuir de forma significativa na queda da produtividade (BERNARDES; SILVEIRA; MESQUITA, 2010). No caso do feijoeiro, várias são as doenças que afetam o rendimento da cultura, dentre as principais destaca-se a antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn) (BARBOSA; GONZAGA, 2012). A antracnose é considerada uma das doenças mais severas da cultura, podendo levar a perdas significativas na produtividade, principalmente quando são utilizadas sementes infectadas e as condições de temperatura e umidade são favoráveis (CHIORATO et al., 2006).

O controle da antracnose no feijoeiro ocorre principalmente através do uso de agroquímicos. Apesar dessa forma de controle minimizar as perdas na produção, o uso exagerado pode acarretar em efeitos negativos, como a ação sobre a saúde dos produtores e consumidores, poluição ambiental e o desenvolvimento de resistência dos patógenos aos princípios ativos desses produtos (NOZAKI; KLIEMANN, 2016; PEDRO et al., 2012; SINGH et al., 2018).

Na busca de alternativas de controle contra fitopatógenos, o estudo da indução de resistência tem se intensificado nos últimos anos e um dos enfoques de grande relevância são os mecanismos envolvidos neste tipo de resistência (CARVALHO, 2012). A indução de resistência é um estado de alerta, desencadeado por agentes externos que promovem a ativação de mecanismos de defesa latentes existentes na planta (STANGARLIN et al., 2011).

Na indução de resistência a planta torna-se preparada para responder de forma eficiente ao ataque do patógeno. Para isto, mecanismos bioquímicos e estruturais são ativados resultando em respostas tais como o fortalecimento da resistência física e mecânica da parede celular e a produção de enzimas e compostos antimicrobianos que potencializam os processos

de defesa na planta. Essas alterações contribuem para a formação de barreiras reforçando a estrutura celular e impedindo a instalação/dispersão do patógeno na planta (NIRANJAN RAJ et al., 2012).

Além das alterações estruturais comumente observadas neste tipo de respostas, outras alterações têm sido relatadas como forma de resistência ao estresse, seja biótico ou abiótico. Todas essas alterações envolvem a ativação de vias metabólicas e produção de metabólitos primários e secundários (MAUCH-MANI et al., 2017).

No estudo da indução de resistência, vários são os agentes indutores já descritos, sendo estes de natureza biótica ou abiótica. O fosfito de potássio é um dos indutores abióticos utilizados na indução de resistência, sendo que sua ação já foi comprovada contra patógenos do mamoeiro (TAVARES et al., 2009), macieira (ARAÚJO et al., 2010) e cafeeiro (NOJOSA et al., 2009). Contudo, vários estudos também enfocam o uso de agentes bióticos. Dentre os vários indutores bióticos estudados, os fungos do gênero *Trichoderma* vêm se destacando no controle de fitopatógenos, principalmente a sua ação na indução de resistência. Estudos recentes têm demonstrado o sucesso deste gênero na indução de resistência em arroz, tomate, pepino, cacaueteiro e feijão (FONTENELLE et al., 2011; PEDRO et al. 2012; RIBEIRO JÚNIOR, 2006; YOSHIOKA et al., 2012). Além disso, as espécies deste gênero favorecem o crescimento de um grande número de plantas, através da colonização do sistema radicular (DINESH; PRATEEKSHA, 2015).

Dessa forma, a interação entre um indutor, a planta e um agente patogênico é um mecanismo complexo que envolve uma ampla troca de sinais moleculares que conduzem a uma série de eventos expressos de forma sincrônica. Portanto, a compreensão à nível molecular, bioquímico, citológico e histológico da indução de resistência e da relação patógeno-hospedeiro é vital para a elaboração de estratégias que permitam o controle de doenças (HARDOIM et al., 2015; NIRANJAN RAJ et al., 2012).

Neste sentido, o presente estudo teve por objetivo verificar a eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. e fosfito de potássio no controle da antracnose, avaliar e identificar as respostas anatômicas e histológicas da indução de resistência no feijoeiro (*P. vulgaris*) em resposta ao ataque do *C. lindemuthianum*, bem como avaliar aspectos fisiológicos e produtivos da cultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CULTURA DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Pertencente à ordem Rosales, o feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma dicotiledônea da família leguminosae e gênero *Phaseolus* (SANTOS et al., 2015). *P. vulgaris* L. originou-se no continente Americano e foi levado para a Europa no século XVI pelos Espanhóis e Portugueses, sendo posteriormente difundido para África e outros lugares do mundo (NASSAR; AHMED; BOGHDADY, 2010). Na atualidade, *P. vulgaris* L. é considerado a espécie mais antiga e a mais cultivada do gênero *Phaseolus*, sendo amplamente distribuída nas diversas regiões do mundo (SILVA; COSTA, 2003).

No Brasil, a cultura do feijoeiro é considerada uma das mais expressivas da agricultura, uma vez que o feijão é alimento base da dieta dos brasileiros, sendo fonte rica de proteínas, carboidratos e sais minerais (OLIVEIRA et al., 2014). Devido ao seu alto valor nutricional, sua importância extrapola o aspecto econômico, sendo considerado, juntamente com o arroz, alimento essencial na segurança alimentar e nutricional da população (BORÉM; CARNEIRO, 2015).

Embora inicialmente caracterizada como uma cultura de subsistência, nos últimos anos houve um crescente interesse na cultura por parte dos grandes e médios produtores rurais, levando à adoção de tecnologias avançadas, incluindo irrigação, manejo fitossanitário e colheita mecanizada (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Dessa forma, seu plantio passou a ser efetuado em praticamente todos os estados brasileiros, por pequenos e grandes produtores, nos sistemas de produção solteiro ou consorciado com outras culturas (MOURA; BRITO, 2015).

O Brasil é o terceiro produtor mundial e também o principal consumidor da leguminosa atingindo, na safra 2016/17, a produção total de aproximadamente 3,4 milhões de toneladas de feijão, em uma área cultivada de 3,18 milhões de ha distribuída em três safras distintas (COELHO, 2017; CONAB, 2018). Apesar de largamente distribuída, a produção nacional da leguminosa concentra-se nos Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás (CONAB, 2016). O Estado do Paraná responde por 22,57% da produção nacional, com 750 mil toneladas de feijão, sendo considerado o maior produtor nacional de feijão-comum (MORAES; MENELAU, 2017; CONAB, 2018).

A produtividade média de feijão no Paraná atingiu, na safra de 2016/2017, o valor de 1.588 kg.ha⁻¹ (CONAB, 2018). Embora o estado apresente uma produtividade média expressiva, tem se observado variações na qualidade dos grãos nas últimas safras. Essa variação na qualidade esta relacionada à uma série de peculiaridades que envolvem a cultura do feijão, sobretudo em relação às dificuldades de manejo, os problemas fitossanitários e à possibilidade de clima chuvoso na época da colheita (CONAB, 2017). De acordo Andrade et al. (2015) a cultura do feijoeiro é considerada relativamente exigente quanto à maioria das condições edafoclimáticas e bastante susceptível a incidência de doenças de natureza biótica.

2.2 CARACTERÍSTICAS MORFOANATÔMICAS DO FEJJOEIRO

O feijoeiro é uma planta herbácea, podendo ser ereta, semitrepadora ou trepadora, apresenta um sistema radicular formado por uma raiz principal e raízes secundárias e terciárias (SANTOS et al., 2015). De acordo com Andrade et al. (2015) por ser uma leguminosa cultivada em uma grande diversidade de ambientes e em vários países de todo o mundo é uma das espécies com maior variabilidade de caracteres agrônômicos que inclui: habito de crescimento, tamanho e cor de grãos e o ciclo da cultura.

O ciclo do feijoeiro pode variar de 75 a 110 dias, aproximadamente, dependendo do cultivar, das condições ambientais e da época de plantio (ADAIR; KLUTHCOUSKI, 2009). O desenvolvimento do feijoeiro ocorre em duas fases principais: a fase vegetativa e a reprodutiva. A fase vegetativa compreende do aparecimento das primeiras folhas primárias até o aparecimento dos primeiros botões florais. A fase reprodutiva inicia logo após o aparecimento dos botões florais e vai até a maturação das sementes (SANTOS et al., 2015).

2.2.1 Folha

No feijoeiro observam-se dois tipos de folhas durante seu desenvolvimento: folha simples e folha composta. As folhas simples surgem ainda na germinação das sementes e caem antes do completo desenvolvimento da planta, por isso, também são chamadas de primárias. As folhas compostas, por sua vez, são trifolioladas com um folíolo central simétrico e os outros dois laterais, opostos e assimétricos (SANTOS et al., 2015).

As folhas do feijoeiro possuem basicamente a mesma estrutura, sendo constituída por três tipos de tecidos: o epidérmico, de preenchimento e o vascular. A epiderme está presente nas duas faces da folha e podem apresentar tricomas de três tipos diferentes: reto, curvo ou

arredondado (NASSAR; BOGHDADY; AHMED, 2010; VOLTAN et al., 1991). Na face superior (adaxial), a epiderme apresenta uma única camada de células de paredes marcadamente onduladas. Na face inferior (abaxial) a epiderme também é formada por uma camada de células, porém, menores que as da face adaxial, devido ao maior número de estômatos. Por apresentar estômatos nas duas faces, a folha é classificada como anfiestomática (SANTOS et al., 2015).

O mesófilo constitui o tecido de preenchimento da folha, sendo formado por dois diferentes tipos parênquima: paliçádico e lacunoso. O parênquima paliçádico se dispõe em direção à face adaxial, é composto por uma camada de células colunares densamente compactadas e dispostas perpendiculares à epiderme, as células apresentam abundância de cloroplastos. O parênquima lacunoso ocorre em direção à epiderme abaxial, formado por células com forma e arranjo irregulares, constituindo a maior parte das células do mesófilo (aproximadamente 4 a 5 camadas de células). Apresenta espaços intercelulares e menor número de cloroplastos em comparação com as células paliçádicas (Figura 1) (FAROUK; OSMAN, 2011; VOLTAN et al., 1991).

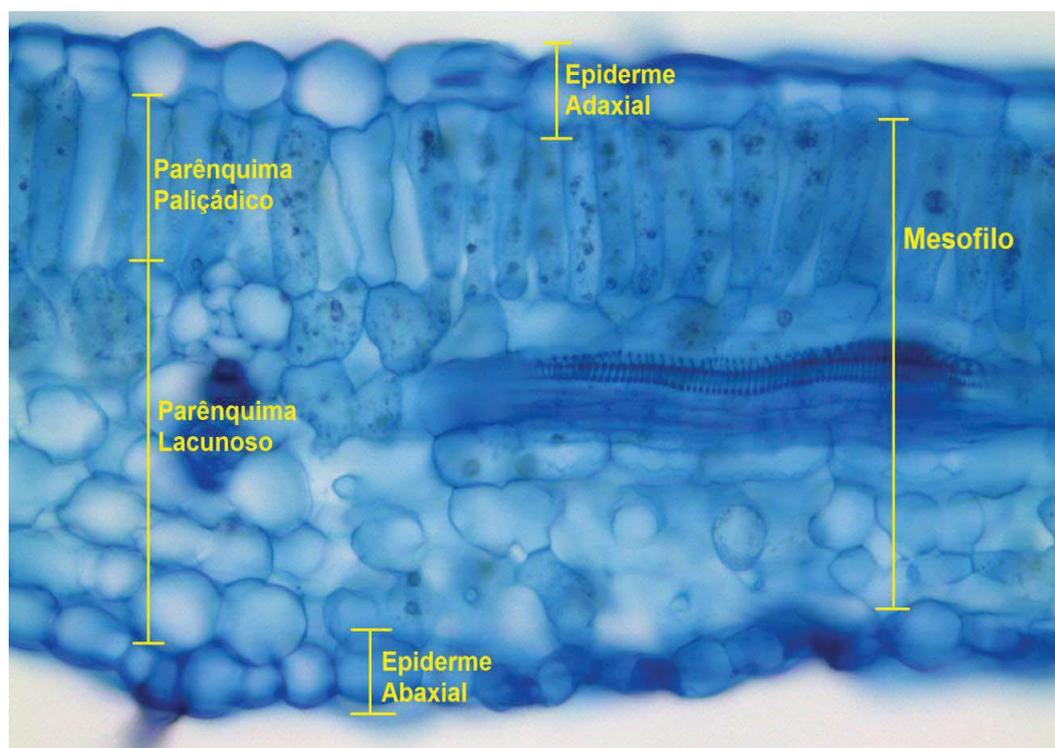


Figura 1. Corte transversal da lâmina foliolar de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Pérola. Fonte: Moreira (2014).

O tecido vascular que compõe a folha é formado por feixes vasculares que normalmente formam o esqueleto da folha. No feixe vascular, o xilema se orienta em sentido

à superfície adaxial e o floema em direção à região abaxial (NASSAR; BOGHDADY; AHMED, 2010).

Alguns autores relatam variações na morfologia e anatomia das folhas do feijoeiro em virtude da luz, estresse hídrico e de genótipos. Entre eles Voltan et al. (1991); Silva et al. (1999); Navea et al. (2002) e White e Montes-R (2005), relataram a ocorrência de diferenças morfoanatômicas nas folhas em cultivares de feijão comum. Os autores observaram diferenças quanto à espessura da epiderme, do mesófilo e quanto ao número de estômatos.

As mudanças anatômicas são resultado de adaptações para favorecer a sanidade e a superação de estresses sejam eles bióticos ou abióticos. Neste sentido, Chakraborty, Tiedemann e Teng (2000) afirmam que a formação de papilas e acúmulo de silício em locais de penetração do apressório; maior acúmulo de carboidratos nas folhas; mais ceras, camadas extras de células epidérmicas e maior número de células do mesófilo podem influenciar a resistência do hospedeiro.

2.2.2 Sistema Radicular

As raízes absorvem, através do solo, os nutrientes e água necessários para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas, além de fornecer suporte mecânico (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2013). No caso do feijoeiro, existem quatro diferentes classes de raízes que compõe a arquitetura radical da planta. Essas diferentes classes refletem a plasticidade da planta de feijoeiro em se adaptar ao complexo ambiente solo. Dessa forma, as classes de raízes presentes no feijoeiro incluem: primária, basais, adventícias e laterais (NASSAR; AHMED; BOGHDADY, 2010; SANTOS et al., 2015).

A raiz primária ou raiz principal origina-se da radícula na fase embriogênica da planta e na ausência de obstáculos cresce verticalmente para baixo; as raízes basais emergem na zona axial do hipocótilo acima da interfase raiz-parte aérea e juntamente com as raízes laterais formam a maior parte do sistema radicular; as raízes adventícias se localizam logo acima das raízes basais e crescem horizontalmente no solo, tendo localização mais superficial o que facilita a aquisição de nutrientes como o fósforo; as raízes laterais são ramificações das raízes primária, basal e adventícia (SANTOS et al., 2015) (Figura 2).



Figura 2. Sistema radicular de plantas de feijão IPR- Tangará na fase V4 mostrando as diferentes classes de raiz que o compõe. RP: raiz primária; RB: raiz basal; RA: raiz adventícia; RL: raiz lateral. Foto: Eliana P. Pereira Figueira (2016).

A raiz principal é a primeira a surgir a partir da radícula e apresenta uma organização tecidual típica de dicotiledôneas, com tecidos especializados que permitem o desempenho satisfatório de suas funções (PEÑA-VALDIVIA et al., 2010). Dessa forma, um corte transversal da raiz do feijoeiro, no estágio primário de desenvolvimento, revela a presença de três sistemas de tecidos: a epiderme (sistema dérmico), o córtex (sistema fundamental) e os tecidos vasculares (sistema vascular) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2013) (Figura 3).

A epiderme é a camada mais externa da raiz, em contato direto com o solo. É originada a partir do protoderme, caracterizada pela presença de uma camada de células pequenas que revestem toda a raiz. Algumas dessas células podem se prolongar e originar os pêlos radiculares (NASSAR; BOGHADY; AHMED, 2010)

Subjacente à epiderme está o córtex, formado por várias camadas de células de paredes finas com formato irregular e espaços intercelulares bem desenvolvidos. O córtex é originado de células do meristema fundamental e ocupa a maior parte da raiz (MORAES-DALLAQUA; BELTRATI; RODRIGUES, 2000). A camada mais interna do córtex é denominada de endoderme, caracterizada pela presença de células compactadas que carecem de espaços aeríferos, diferentemente das outras camadas do córtex. Na endoderme, ocorre a presença das estrias de Caspary, que se aderem às membranas das células endodérmicas. A estria de Caspary constitui uma barreira para o movimento apoplástico de água e solutos no cilindro vascular (NASSAR; BOGHADY; AHMED, 2010).

Logo abaixo da endoderme está o periciclo, formado por uma camada de células parenquimáticas de parede fina, originadas a partir do procâmbio. O periciclo se dispõe em

anel e envolve completamente os tecidos vasculares. Na maioria das plantas, o periciclo da origem as raízes laterais (MORAES-DALLAQUA; BELTRATI, RODRIGUES, 2000).

O tecido vascular ou feixe vascular é radial do tipo tetrarca, uma vez que quatro grupos de xilema se arranjam em camadas separadas dispostos em raios alternativos, sendo intercalados por quatro grupos de floema. Os espaços entre eles são preenchidos por pequenas células do parênquima (NASSAR; BOGHADY; AHMED, 2010). De acordo com Queiroz-Voltan, Nogueira e Miranda (2000), as projeções do xilema partem em direção ao periciclo e podem variar em número, de espécie para espécie e algumas vezes dentro da mesma espécie.

Como o procâmbio tem modo de diferenciação centrípeta, os vasos do protoxilema ocorrem na região periférica do feixe próximo à região do periciclo. Já o metaxilema é parte do xilema primário que se diferencia depois do protoxilema e ocupa a região central do feixe vascular (NASSAR; BOGHADY; AHMED, 2010).

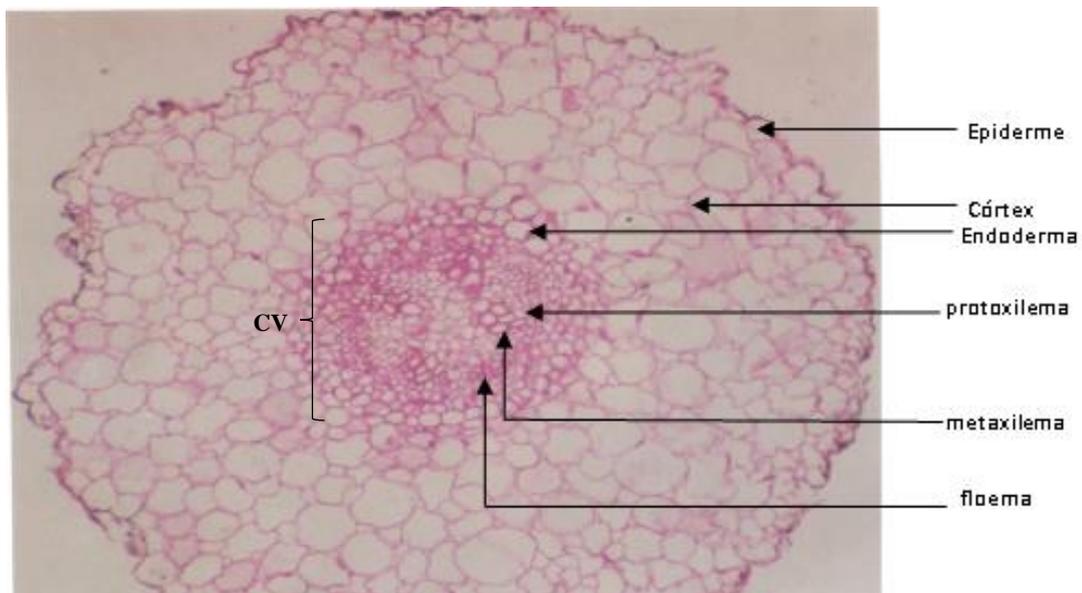


Figura 3. Secção transversal da raiz principal da planta de *Phaseolus vulgaris* L., com duas semanas de idade, mostrando sua estrutura primária; CV: cilindro vascular. Fonte: Nassar; Boghdady; Ahmed (2010).

Durante o desenvolvimento secundário da raiz principal, aproximadamente quatro semanas após a germinação, os tecidos vasculares secundários (xilema secundário e floema secundário) são formados a partir do câmbio vascular. Com o aumento da espessura da raiz, a epiderme e uma parte externa do córtex se destacam, sendo formada, por sua vez a periderme. A periderme, composta principalmente de tecido suberizado, recobre toda estrutura externa da raiz. Nesta fase, a raiz compreende principalmente o cilindro vascular envolto pela periderme

(NASSAR; BOGHADY; AHMED, 2010; QUEIROZ-VOLTAN; NOGUEIRA; MIRANDA, 2000).

2.2.3 Caule

O caule do feijoeiro é herbáceo, classificado morfológicamente como haste, suas principais funções são o suporte e a condução. No feijoeiro, após o surgimento das folhas primárias, o caule continua a se desenvolver, dando origem a uma sucessão de nós e internódios. Cada nó corresponde ao ponto de inserção das folhas trifolioladas e de um grupo de gemas axilares, sendo o internódio o espaço entre dois nós (SANTOS et al., 2015).

Secções transversais da região internodal do caule de feijoeiro comum, em desenvolvimento primário, mostram a disposição dos tecidos em camadas de células diferenciadas, formando regiões tais como: a epiderme, córtex (colênquima e parênquima cortical), bainha amilífera, parênquima interfascicular, feixes vasculares (xilema e floema) e o parênquima medular (Figura 4) (HALLAK et al., 1999; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2013).

De acordo com Nassar, Boghdady e Ahmed (2010) as células epidérmicas do caule do feijoeiro apresentam o formato cúbico e estão cobertas com uma fina camada de cutícula. Estômatos de tipo paracíticos estão presentes na epiderme, cada um composto por duas células guarda e duas subsidiárias. Na superfície externa da epiderme são observados tricomas.

O córtex é composto de uma ou mais camadas de células de colênquima subjacente à epiderme, ocorrendo em todo contorno do caule, seguido, por aproximadamente três a quatro camadas de parênquima cortical, caracterizado como clorênquima devido a presença de cloroplastídeos (HALLAK et al., 1999; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2013; WOOD; PATRICK; OFFLER, 1994). A camada mais interna de células corticais constitui a bainha amilífera, estrutura de reserva de amido que se cora intensamente, sendo facilmente reconhecida (HALLAK et al., 1999; NASSAR; BOGHADY; AHMED, 2010).

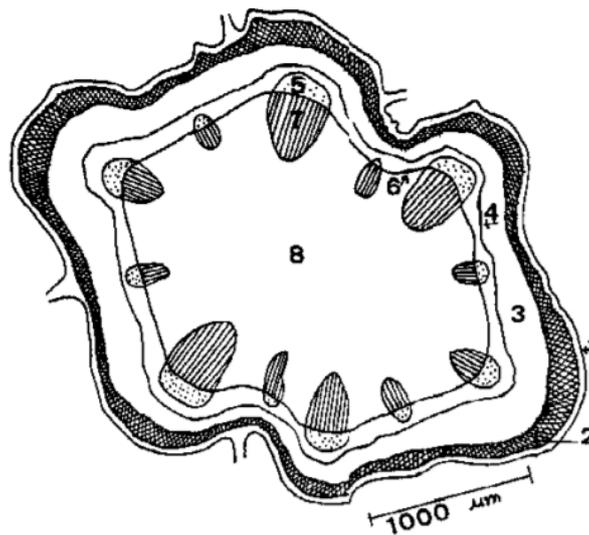


Figura 4. Esquema do corte transversal do caule de *Phaseolus vulgaris*. 1: epiderme; 2: colênquima; 3: parênquima cortical; 4: bainha amilífera; 5: vasos do floema; 6: faixa cambial; 7: vasos do xilema; 8: parênquima medular (medula). Fonte: adaptado de Hallak et al. (1999).

Os feixes vasculares, apresentando porções floemáticas e xilemáticas, formam um sistema de cordões isolados ao redor da medula, dispostos em anel, sendo separados por um grupo de células do parênquima formando o parênquima interfascicular (ENRIGTH; CUMBIE, 1973; HALLAK et al., 1999; NASSAR; BOGHDADY; AHMED, 2010). Dessa forma, o xilema primário (protoxilema) encontra-se disposto próximo a região medular e o secundário (metaxilema) mais próximo da periferia. No caso do floema, o floema primário (protofloema) dispõe-se mais externamente à medula e o secundário (metafloema) dispõe-se próximo à região medular (WOOD; PATRICK; OFFLER, 1994).

A medula, que compreende uma grande porção central do caule, consiste em células do parênquima medular de paredes finas que tendem a diminuir de tamanho próximo à periferia da medula. Pequenos espaços intercelulares triangulares são visíveis na medula (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2013).

Durante o desenvolvimento secundário do caule do feijoeiro, os feixes de vasos do xilema apresentam-se dispostos em linhas radiais, intercalados por células de parênquima interfascicular iniciando a diferenciação (procâmbio). O floema secundário aumenta consideravelmente em quantidade. Externamente ao floema, em contato com a bainha amilífera, ocorre a presença de fibras e células esclerificadas (tendem a aumentar com o desenvolvimento do caule) formando o periciclo (SAJO; CASTRO, 2006).

Um anel cambial completo (faixa cambial) é formado pela continuidade do parênquima interfascicular (células do parênquima) com o fascicular (feixes de vasos),

separando os vasos do xilema dos do floema (NASSAR; BOGHDADY; AHMED, 2010; RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2013).

Com a idade de dez semanas após a germinação, o crescimento secundário atingiu seu ápice e a medula passa a apresentar a região central destituída de células, com aspecto de “oca” (HAYES; OFFLER; PATRICK, 1985).

2.3 METABOLISMO VEGETAL

O metabolismo envolve um conjunto de reações que ocorrem nas células, sendo estas guiadas por enzimas específicas que garantem a direção dessas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas (NELSON; COX; LEHNINGER, 2011). Os produtos formados de uma rota metabólica podem ser requeridos como reagente por outra, estabelecendo uma rede de informações químicas indispensáveis para a sinalização e manutenção das funções no organismo (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Nas células vegetais, as diversas rotas metabólicas podem levar a produtos com funções diferentes, por isso o metabolismo vegetal pode ser dividido em primário e secundário (TAIZ; ZEIGER, 2009).

2.3.1 Metabolismo Primário

As plantas possuem um metabolismo geral, comum para todas as espécies designado de metabolismo primário (TAIZ; ZEIGER, 2009). Através do metabolismo primário ocorre a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência das espécies vegetais, tais como: carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Os metabólitos primários formados são de extrema importância, pois participam da formação de estruturas como: a parede celular, a membrana plasmática, as enzimas e o DNA, entre outras moléculas responsáveis por funções distintas nas células (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Dessa forma, entende-se como metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham função essencial no vegetal tais como a fotossíntese, respiração, glicólise, o ciclo do ácido cítrico, o transporte de solutos, a síntese de aminoácidos, as transaminações, a síntese de proteínas, enzimas e coenzimas, a síntese de materiais estruturais, a duplicação do material genético, a divisão celular (crescimento), entre outros (PEREIRA; CARDOSO, 2012; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Contudo, cabe destacar que a biossíntese de metabólitos primários está relacionada a uma série de eventos que ocorrem de forma sincronizada, iniciando desde a captação de energia luminosa, na membrana dos tilacóides (fotossíntese), até a replicação gênica, no núcleo da célula e além de fomentar as funções básicas das plantas, tem sido sugerido que o papel do metabolismo primário, durante as interações planta-patógeno, é apoiar as necessidades de energia celular para respostas de defesa da planta (KANGASJARVI et al., 2012).

A disponibilidade de energia é crítica durante a execução das respostas de defesa das plantas devido à expressão de centenas de genes de múltiplas vias de defesa. Além disso, as respostas de defesa parecem impor um custo de adequação. Portanto, é através do metabolismo primário que as plantas garantem estruturalmente a permanência de sua descendência no ambiente (ROJAS et al., 2014).

2.3.1.1 Fotossíntese

O crescimento das plantas está condicionado primordialmente à obtenção de energia proveniente da radiação solar, através da interceptação e utilização no processo de fotossíntese. A fotossíntese líquida reflete na produção de biomassa, a qual pode ser influenciada por diversos fatores como luz, temperatura, umidade, fertilidade do solo e pelo manejo de cultura, sendo, portanto, importantes condicionadores da arquitetura da planta (LOPES et al., 2013). A redução na atividade fotossintética, influenciada pelos fatores descritos acima, poderá interferir no crescimento da planta bem como a diminuição na produtividade, sendo dependente do ambiente de cultivo (FERRAZ, et al., 2012; PAIVA et al., 2005).

A fotossíntese pode sofrer limitação por processos de ordem primária e/ou bioquímica podendo ocorrer em dois pontos específicos do processo fotossintético. Um ponto de limitação ao processo refere-se às resistências estomáticas e mesofílicas que o CO_2 encontra e a sua conseqüente difusão, desde a atmosfera até os sítios de carboxilação nos cloroplastos. Outra limitação refere-se à fixação de CO_2 , pela Rubisco (FLEXAS et al., 2008). Além disso, uma vez que a fotossíntese envolve uma série de componentes, como pigmentos fotossintéticos, fotossistemas, cadeia de transporte de elétrons e reações de redução do CO_2 , qualquer tipo de dano gerado por um fator estressante pode restringir a capacidade fotossintética da planta (ASHRAF; HARRIS, 2013).

Dessa forma, diferentes patógenos, baseados em seu ciclo de vida (biotrófico ou necrotófico), impactam diferencialmente a eficiência fotossintética das plantas (ASHRAF; HARRIS, 2013). Para a maioria das doenças foliares, a fotossíntese líquida de folhas infectadas é reduzida desde o momento da infecção pelo patógeno. Esta redução na atividade fotossintética pode ser causada por uma série de fatores que incluem a redução na interceptação da radiação devido ao dano causado, a regulação negativa dos genes reguladores dos fotossistemas e o fechamento dos estômatos (barreira adicional à entrada dos patógenos) (ROJAS et al., 2014).

No que tange a este aspecto, a indução de resistência é uma alternativa à esta interferência, pois vários estudos demonstram que o tratamento com alguns indutores podem promover o aumento da atividade fotossintética. Pinto et al. (2012) observam o aumento da atividade fotossintética na indução, através da aplicação de silicato de potássio na dose 3 mL L⁻¹ em cacauzeiro, associado à taxa de fotossíntese também houve aumento dos teores foliares de fenóis solúveis totais nas plantas induzidas, havendo eficiência no controle de doenças.

2.3.2 Metabolismo Secundário

Diferentemente do metabolismo primário, os produtos formados a partir do metabolismo secundário parece não ter função direta no crescimento e desenvolvimento da planta (TAIZ; ZEIGER, 2009). Os metabólitos secundários também diferem dos primários por apresentar distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie vegetal ou um grupo de espécies relacionadas (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Embora não apresentem função direta sobre o crescimento e desenvolvimento, os metabólitos secundários apresentam funções ecológicas importantes para os vegetais pois: protegem as plantas contra herbívoros e microrganismos patogênicos; são atrativos para polinizadores e dispersores de semente; atuam como agentes na competição planta-planta e nas simbioses planta-microrganismos. Portanto a capacidade de competição e sobrevivência das plantas é dependente de seus metabólitos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2009; BOURGAUD et al., 2001).

De acordo com Mazid, Khan e Mohammad (2011) o metabolismo secundário é responsável pela produção de muitos dos compostos de defesa envolvidos nas resistências constitutiva e adquirida das plantas. A habilidade das plantas de conter a infecção por patógenos depende do quão rápida é a produção desses metabólitos secundários, o que, pelo

mevalônico (mevalonato). Os terpenos podem ser chamados de isoprenos e a maioria dos terpenos estudados age como metabólitos secundários na defesa de muitas plantas contra herbívoros, pois são compostos tóxicos para a maioria dos insetos (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). Contudo, algumas classes de terpenos como as giberelinas, podem atuar no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo considerada como metabólito primário (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos nitrogenados e sulfurados compreende uma grande variedade de compostos secundários vegetais que possui nitrogênio em sua estrutura. Nesta categoria inclui alguns compostos bem conhecidos na defesa das plantas contra herbívoros e patógenos, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). A maioria desses compostos é sintetizada a partir de aminoácidos comuns provenientes do ciclo do ácido tricarbóxico e da via do ácido chiquímico (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções vegetais e são biossintetizados por diferentes rotas, razão pelo qual é considerado um grupo bastante heterogêneo (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011).

2.3.2.1 Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos compreendem uma grande diversidade de produtos secundários que contém um grupo fenol na sua constituição (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). São geralmente solúveis em água, uma vez que frequentemente ocorrem na forma de glicosídeos. No tecido vegetal, podem estar presente em baixas concentrações e usualmente localizados nos vacúolos celulares, contudo, podem aumentar em quantidade mediante à estresses sofridos pelas plantas (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010; STANGARLIN et al., 2011).

Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na biossíntese dos compostos fenólicos: rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. A rota do ácido malônico, embora seja uma fonte importante de compostos fenólicos em fungos e bactérias, é menos significativa nas plantas superiores (KULBAT, 2016; TAIZ; ZEIGER, 2009).

A rota do ácido chiquímico converte os carboidratos da glicólise e da rota pentose fosfato em aminoácidos aromáticos como a fenilalanina, tirosina e triptofano. As classes mais abundantes de compostos fenólicos em plantas são derivadas da fenilalanina. A fenilalanina é convertida em ácido cinâmico pela fenilalanina amônia-liase (FAL), considerada uma das enzimas mais importantes na regulação do metabolismo secundário vegetal (HATFIELD et

al., 2009). A partir da conversão da fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico pela FAL, as reações subsequentes levam à formação de intermediários ou compostos fenólicos simples chamados de fenilpropanóides, estes podem originar as cumarinas, ácido benzóico, ácido cafeico entre outros compostos fenólicos (KULBAT, 2016). De acordo com Brooker et al. (2008) a cumarina constitui um grupo de compostos fenólicos com uma ampla gama de atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias. Os fenilpropanóides são ainda importante unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos como a lignina.

Os compostos fenólicos por sua vez, fornecem o suporte para que as plantas utilizem diferentes mecanismos para garantir sua defesa, como modificações físicas, a partir da lignificação e suberização da parede celular; mudanças metabólicas, como síntese de proteínas-RP e a síntese e acúmulo de fenilpropanóides como as fitoalexinas (BHATTACHARYA; SOOD; CITOVSKY, 2010; LATTANZIO; LATTANZIO; CARDINALI, 2006).

De acordo com Bhattacharya, Sood e Citovsky (2010) a síntese, liberação e acúmulo de compostos fenólicos, são estratégias chave empregadas na defesa das plantas contra invasores microbianos. Os compostos fenólicos são sintetizados quando receptores de reconhecimento de padrão reconhecem patógenos potenciais por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Como resultado, o progresso da infecção é restrito muito antes do patógeno ganhar o controle total da planta. Cabe ressaltar que os compostos fenólicos liberados diferem de espécie para espécie e também com tempo, espaço e localização.

Trabalhos mostram que o teor de compostos fenólicos pode ser alterado nas plantas mediante indução de resistência. Kuhn e Pascholati (2010) observaram a redução do teor de compostos fenólicos pelo indutor acibenzolar-S-metil (ASM) nas folhas de feijão após a segunda aplicação (21 dias após o início do tratamento). De acordo com os autores, a redução dos compostos fenólicos ocorreu a medida que as células foram se tornando lignificadas, uma vez que compostos fenólicos são substrato para a síntese de lignina. Já Danner et al. (2008) observaram um aumento do teor de compostos fenólicos pelo indutor ASM e proteína harpina, no pêssigo. Segundo os autores os indutores ativaram a via dos fenilpropanóides resultando na maior produção de compostos fenólicos. Em ambos os casos houve a redução da doença.

2.3.2.2 Lignina

Lignina é um polímero de grupos fenilpropanóides altamente ramificados, formada em geral, por três diferentes unidades chamadas de monolignóis: guaiacila (lignina G), siringila (lignina S) e p-hidroxifenila (lignina H). Os monolignóis são produzidos a partir de uma série de reações de hidroxilação e metilação de intermediários da rota dos fenilpropanóides (LI et al., 2014; MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011). Encontrada nas paredes celulares de vários tipos de tecido de sustentação e vascular, a lignina é incorporada como último componente da parede celular secundária, entremeando a matriz de polissacarídeos, conferindo rigidez, impermeabilidade e resistência (CESARINO et al., 2012). A rigidez da lignina fortalece o caule e tecido vascular permitindo o crescimento ascendente e possibilitando que água e sais minerais sejam conduzidos pelo xilema sem que haja colapso do tecido (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Além das funções típicas de sustentação conferida pela lignina aos tecidos vegetais, a mesma poderá desempenhar funções de proteção nas plantas contra predadores. Em algumas plantas, a presença da lignina pode interferir na digestibilidade e conseqüentemente reduzir o seu consumo por herbívoros (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011); outra forma é a ação localizada de lignificação no tecido vegetal que ocorre em pontos de penetração dos fitopatógenos, constituindo uma barreira de resistência inicial (MALINOVSKY et al., 2014). Neste último caso, a lignina poderá bloquear o crescimento dos patógenos através da lignificação das hifas no tecido vegetal, isolando-as no hospedeiro e dificultando o trânsito de nutrientes do hospedeiro para o patógeno e de toxinas do patógeno para o hospedeiro, sendo uma resposta frequente à infecção ou à lesão (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011; PASCHOLATI; DALIO, 2018; STANGARLIN et al., 2011). Em contrapartida, a própria parede celular secundária, entremeada por lignina, constitui uma barreira resistente e duradoura contra fitopatógenos, conferindo proteção mecânica contra a entrada de fitopatógenos (NAFISI; FIMOIGNARI; SAKURAGI, 2015).

Dessa forma, a parede celular atua na primeira linha de defesa das plantas contra o ataque de patógenos, pois representa uma barreira física à entrada e disseminação dos microorganismos. Além disso, a parede é capaz de perceber a presença de fatores estressantes e induzir respostas de defesa (MALINOVSKY et al., 2014). Por exemplo, expansinas atuam no afrouxamento da parede em resposta à seca (SASIDHARAN; VOESENEK; PIERIK, 2011). Contra o ataque de patógenos são observados o aumento da lignificação de tecidos (SATTLER; FUNNELL-HARRIS, 2013) e formação de papilas nas células epidérmicas

(UNDERWOOD, 2012) proporcionando um reforço mecânico da parede à desorganização e à entrada do patógeno (GILBERT, 2010; TAVARES; SOUZA; BUCKERIDGE, 2015).

Schurt et al. (2013), observaram a relação entre o aumento do teor de lignina e a defesa contra *Rhizoctonia solani* em plantas de arroz induzidas com silício. As plantas com silício foram mais resistentes à queima das bainhas, devido a maior lignificação dos tecidos, quando comparadas com as plantas controle.

2.3.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos do metabolismo celular, produzidas em diferentes compartimentos celulares no decorrer das vias metabólicas da fotossíntese, fotorrespiração ou respiração, ou ainda na região do apoplasto pela ação de NADPH oxidases ligadas à membrana plasmática, ou de peroxidases associadas à parede celular (ARORA et al., 2016; MITTLER, 2002). Existem basicamente sob quatro formas de EROs nas células: single oxygen ($^1\text{O}_2$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (KULBAT, 2016; STANGARLIN et al., 2011).

O aumento de EROs é observado nas plantas quando se encontram sob condições de estresse, este aumento ocorre de forma rápida e consistente sendo denominado de “explosão oxidativa”, o que geralmente acontece em duas fases. Na primeira fase observa-se em poucos minutos o acúmulo de EROs, resultante provavelmente do contato entre a planta e o patógeno, e que nem sempre está correlacionada com a produção de respostas de resistência, pois pode acontecer em interações compatíveis. Já na segunda fase, a explosão oxidativa é mais forte e prolongada, e está relacionada com a indução de resistência da planta ao patógeno, sendo características em interações incompatíveis (GILL; TUTEJA, 2010; STANGARLIN et al., 2011). Por serem moléculas altamente reativas, são potencialmente capazes de causar danos oxidativos ou comprometer a integridade celular, as EROs são mantidas em níveis subletais nas células, permitindo a atuação eficiente contra os agentes patogênicos (NIRAJAN RAJ et al., 2012).

Uma das primeiras respostas observadas em plantas que sofrem ataque de patógenos é o aumento na produção de EROs (explosão oxidativa) (SOARES; MACHADO, 2007). As EROs possuem um papel fundamental nas vias de sinalização celular durante a percepção do patógeno, alterando a expressão de diferentes genes e reprogramando rotas metabólicas que,

enfim, produzem respostas de defesa (SEWELAM; KAZAN; SCHENK, 2016; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

EROs podem mediar diferentes mecanismos de defesa na planta, um dos principais é a atuação direta dessas moléculas sobre o patógeno, inibindo seu desenvolvimento. Outros processos guiados pela produção das EROs incluem: o fortalecimento da parede celular, através de alterações nas ligações cruzadas entre os compostos químicos, a indução da morte celular programada nas regiões infectadas, de modo a restringir a invasão do patógeno; a ativação de vias de sinalização que regulam a produção de compostos de defesa, como a via do ácido salicílico e do ácido jasmônico (BAXTER; STEWART, 2013; ZURBRIGGEN; CARRILLO; HAJIREZAEI, 2010).

Nirajan Raj et al. (2012) em seus estudos com milho, observaram a presença de H_2O_2 *in situ* através de técnicas histoquímicas no coleótilo 12 horas após a inoculação com o patógeno, o que permitiu maior eficiência na resistência às plantas de milho induzidas com *Bacillus pumilus*.

2.4 INTERAÇÃO PLANTA-MICROORGANISMO

As plantas constituem um excelente ecossistema para os microrganismos, pois oferece uma ampla diversidade de habitats que incluem a zona de influência do sistema radicular (rizosfera), a parte aérea da planta (filoplasma ou filosfera) e os tecidos internos (endosfera) (VORHOLT, 2012). Dessa forma, órgãos da planta tanto acima quanto abaixo do solo interagem com uma diversidade de microrganismos, estabelecendo diversas relações entre si (BARBOSA et al., 2015).

A rizosfera é a região com maior diversidade microbiana, em razão da quantidade de nutrientes secretados e liberados pelas raízes das plantas como mucilagem e exsudatos radiculares (AKKER et al., 2012; BRAGA; DOURADO; ARAÚJO, 2016). Por outro lado, a filosfera é relativamente pobre em nutrientes e sujeita à extremos de temperatura, radiação e umidade, por isso a diversidade microbiana se torna menor e transitória quando comparado à rizosfera (VORHOLT, 2012). Os habitantes microbianos da rizosfera e da filosfera, próximos ou sob o tecido da planta, são considerados epifíticos, enquanto os microrganismos que residem dentro dos tecidos da planta (endosfera), seja nas folhas, raízes ou caules, são considerados endofíticos (TURNER; JAMES; POOLE, 2014).

De acordo com Hardoim et al. (2015), microrganismos endofíticos incluem principalmente fungos, bactérias e protistas que vivem no interior das plantas, habitando seus tecidos sem causar dano aparente. Os microrganismos podem penetrar à planta hospedeira de várias formas, por meio de aberturas naturais ou decorrentes da ação de enzimas produzidas pelo microrganismo, por ferimentos e/ou pela propagação vegetativa (TURNER; JAMES; POOLE, 2014). De forma geral, todos os tecidos da planta hospedam uma comunidade microbiana (LUGTENBERG; CARADUS; JOHNSON, 2016).

Os microrganismos epifíticos ou endofíticos considerados habitantes da rizosfera, filoplano ou mesmo no interior da planta, desempenham papéis importantes e podem influenciar de forma positiva ou negativa no desenvolvimento da planta (DANTAS et al., 2009; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2010). De acordo com Hardoim et al. (2015), a natureza das interações planta-microrganismo varia de mutualismo a patogenicidade. Isso depende de um conjunto de fatores abióticos e bióticos, incluindo os genótipos de plantas e microrganismos, as condições ambientais e a rede dinâmica de interações dentro do bioma da planta.

Na área agrícola, estudos apontam que diversos microrganismos podem ser utilizados na promoção do crescimento vegetal, bem como na proteção da planta contra diversos tipos de estresses (LUGTENBERG; CARADUS; JOHNSON, 2016; VIMAL et al., 2017). Bactérias e fungos promotores de crescimento vegetal são muito estudados e atuam através de uma variedade de mecanismos (TURNER; JAMES; POOLE, 2014).

2.4.1 Interações Positivas

Os microrganismos benéficos, simbioses e não-simbioses interagem com as plantas sem causar aparentemente nenhum dano ao seu hospedeiro. Esses microrganismos atuam de forma à beneficiar as plantas, desempenhando papéis cruciais no seu metabolismo, desenvolvimento, crescimento, adequação e diversificação (HARDOIM et al., 2015).

Como resultado dessa interação positiva, os microrganismos podem atuar direta ou indiretamente, através de diversos mecanismos que promovem uma série de respostas tais como: aumento na disponibilidade de nutrientes minerais para as plantas (RASHID et al., 2016; SPOLAOR et al., 2016; ZELICOURT; AL-YOUSIF; HIRT, 2013) produção de sideróforos que sequestram e disponibilizam íons férricos às plantas (MARIANO et al., 2004); supressão de microrganismos patogênicos às plantas através da produção de toxinas e

antibióticos (DANTAS et al., 2009; POLLI et al., 2012); alterações de propriedades fisiológicas na planta como a produção de fitohormônios (BHATTACHARYA; YU; LEE, 2015; KUREPIN et al., 2015; REMANS et al., 2008); estímulo ao crescimento vegetal e aumento da produção de metabólitos (MORAIS et al., 2015; REMANS et al., 2008); maior resistência às condições de estresse e indução de resistência (VAN DER ENT; VAN WEES; PIETERSE, 2009; YUAN et al., 2016; ZELICOURT; AL-YOUSIF; HIRT, 2013). Através desses mecanismos a planta obtém diversas vantagens que justificam a permanência da interação (VIMAL et al., 2017).

Para alguns microrganismos, estes mecanismos são bem descritos, como para as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP). Estas também podem aumentar a taxa de germinação das sementes e o crescimento radicular, melhorando o desenvolvimento da parte aérea e, conseqüentemente, proporcionando maior rendimento e resistência das culturas (ALVES et al., 2011).

Schossler et al. (2016) utilizando rizobactérias promotoras de crescimento como *Rhizobium tropici* observaram um aumento na altura média do feijoeiro e maior número de vagens por planta em relação à testemunha, evidenciando que as bactérias fornecem uma fonte de nitrogênio fixo para a planta, e podem ainda solubilizar o fósforo, aumentando sua biodisponibilidade na rizosfera. Efeito adicional foi observado por Sbalcheiro, Denardin e Brammer (2009) que relataram, além da melhoria no desenvolvimento da planta, o controle do cretamento bacteriano comum no feijoeiro através da inoculação de *Bacillus* sp., mostrando ser efetivo na indução de enzimas relacionadas às defesas da planta, tanto na aplicação via semente como em aplicação por aspersão nas folhas. Esses resultados corroboram com os obtidos por Kuhn e Pascholati (2010) que avaliaram o efeito protetor de *B. Cereus* no feijoeiro contra a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, onde além de conferir a proteção da cultura contra o patógeno, *Bacillus Cereus* induziu uma resistência de baixo custo para planta quando comparado com indutor abiótico.

Além das BPCPs, diversas espécies fungos podem interagir com as plantas e desencadear mecanismos que podem atuar em benefício da planta hospedeira (MACHADO et al., 2012; TURNER; JAMES; POOLE, 2014). No que tange a este aspecto, fungos do gênero *Trichoderma* vêm se destacando por sua versatilidade de ação, onde são capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas às doenças (FORTES et al., 2007; LOUZADA et al., 2009).

2.4.1.1 *Trichoderma* spp.

O gênero *Trichoderma* pertence ao filo Ascomycota, Ordem Hypocreales (CHAVERRI, SAMUELS; 2003; SAMUELS, 2006). Caracterizam por apresentarem hifas que formam massas de micélio com aparência flocosa, exibindo crescimento rápido com temperatura ótima entre 25 à 30 °C. O micélio apresenta inicialmente a cor branca que, após a presença dos conídios, é substituída por diversos tons de verde, e em alguns casos, entretoms de amarelo. Seus conídios são estruturas unicelulares, formados a partir de células conidiogênicas, com forma ovóide ou elipsoide, com textura lisa ou rugosa. São originados na extremidade de estruturas denominadas conidióforos, emergindo diretamente das hifas (CHAVERRI; SAMUELS, 2003; ZHU; ZHUANG, 2015).

Os fungos desse gênero são habitantes naturais do solo, apesar de amplamente distribuído, estão presentes com maior frequência em regiões de clima temperado e tropical (MACHADO et al., 2012). Normalmente vivem de maneira saprofítica, colonizando e participando da ciclagem de nutrientes do solo, resultando no aumento da disponibilização de nutrientes na rizosfera (SAITO et al., 2009; SINGH et al., 2018).

A comunicação efetiva estabelecida entre os fungos desse gênero e as plantas é extremamente vantajosa, pois além de atuarem na proteção das plantas contra fitopatógenos podem aliviar sintomas relacionados ao estresse abiótico e estão associados ao estímulo do crescimento da planta e/ou produção de biomassa (SABA et al., 2012). Algumas cepas de *Trichoderma* são capazes de fornecer às plantas nutrientes e hormônios. Outras contribuem com a homeostase fortalecendo a fotossíntese e o metabolismo de carboidratos nas plantas (NAWROCKA; MALOLEPSZA, 2013).

A promoção de crescimento das plantas mediada por *Trichoderma* está diretamente associada às alterações no padrão de expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo dos carboidratos, à fotossíntese e as respostas de defesa, mediante a interação *Trichoderma* e planta hospedeira, sugerindo que *Trichoderma* promove aumento no crescimento da planta mediante produção de energia (SHORESH; HARMAN, 2008). Algumas linhagens de *Trichoderma* sp. aumentam a superfície total do sistema radicular, possibilitando um maior acesso aos elementos minerais do solo (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009). Outras são capazes de solubilizar e disponibilizar para a planta o fosfato do solo e produzir ácido indol acético com consequente acúmulo de biomassa em culturas como de arroz, feijão, soja e milho (CHAGAS et al., 2017).

Moreira (2014) afirma que a inoculação de *Trichoderma* spp. no feijoeiro promoveu alterações anatômicas na espessura do mesófilo foliar, melhorando a fotossíntese. A autora afirma ainda que *Trichoderma* promoveu um aumento do volume e do comprimento da raiz de feijoeiro, além de acelerar o desenvolvimento da estrutura secundária do cilindro vascular das raízes, com maior lignificação do xilema, o que possivelmente promoveu maior absorção de nutrientes e menor perda de água, favorecendo o crescimento das plantas.

Além de seu uso potencial na promoção de crescimento de plantas, os estudos envolvendo a interação planta-*Trichoderma* tem como enfoque principal o controle de doenças por fitopatógenos, pois as espécies do gênero *Trichoderma* podem inibir o crescimento dos patógenos ou impedir o seu estabelecimento na planta hospedeira (KUMAR et al., 2017).

No que tange a este aspecto, os fungos do gênero *Trichoderma* spp. podem viver saprofiticamente ou colonizar raízes de plantas ou mesmo outros fungos de solo (KUMAR et al., 2017; MACHADO et al., 2012). De acordo com Singh et al. (2018), descobertas recentes mostram que eles são oportunistas, avírentas, simbiontes de plantas, além de parasitas de outros fungos. Silva G. et al. (2015) afirma que este gênero compreende um dos grupos mais relevantes de fungos antagonísticos, visto que as espécies de *Trichoderma* possuem diversos mecanismos de ação pelos quais pode atuar, tais como: antibiose, hiperparasitismo, competição e indutores de resistência.

De acordo com Pedro et al. (2012) isolados de *Trichoderma* spp. são capazes de produzir mais de 100 tipos de compostos bioativos, o que inclui enzimas degradadoras de parede celular, antibióticos e muitas outras substâncias ainda não caracterizadas, as quais podem apresentar propriedades antifúngicas ou atuar como eliciadores de respostas de defesa das plantas. Dessa forma, esses fungos não apenas antagonizam patógenos de planta como também induzem mecanismos de defesa na planta que resultam em alterações bioquímicas e estruturais protegendo-a dos fitopatógenos (SABA et al., 2012).

Quando em contato com a planta, as hifas do *Trichoderma* spp., que colonizam a raiz, liberam celulase permitindo a penetração do fungo nas camadas iniciais da epiderme e este, através da produção da proteína hidrofóbica, adere-se as superfícies hidrofóbicas da raiz (KERSHA; TALBOT, 1998). Em contato com a raiz, o fungo induz as plantas a produzirem eliciadores, aumentando a expressão de genes relacionados à defesa, o que leva a expressão dos mecanismos latentes de defesa das plantas e sua consequente ação sobre os patógenos (BROTMAN et al., 2013; DRUZHININA et al., 2011).

De acordo com Singh et al. (2018), a ativação dos mecanismos de defesa induzidos por *Trichoderma* é dependente das vias do ácido salicílico (AS) e do ácido jasmônico (AJ)/etileno (ET). Assim, quando a planta é colonizada por *Trichoderma* spp. há uma regulação positiva de longa duração nos genes via AS, porém quando desafiadas pelo patógeno, o pré-tratamento com *Trichoderma* pode modular a expressão gênica dependente de AS e logo após ativar expressão dos genes de defesa induzidos pela via do AJ, fazendo com que a resposta sistêmica induzida aumente com o tempo (HERMOSA et al., 2012).

De acordo com Silva et al. (2011), os fungos do gênero *Trichoderma* são eficientes indutores de resistência no pepineiro (*Cucumis sativus* L.) conferindo proteção à antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lagenarium*, em até 88,39%. Esses resultados são condizentes com os apresentados por O'Brien (2017), que descreve uma redução significativa da infecção do morango por *Botrytis cinerea* após o tratamento com *Trichoderma atroviridae*.

2.4.2 Interações Negativas

Embora as plantas possam coevoluir com determinados organismos e estabelecer relações positivas, em alguns casos a interação planta-microrganismo pode levar ao estabelecimento de uma relação onde o hospedeiro torna-se prejudicado (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004). Alguns microrganismos conseguem vencer as defesas das plantas e aproveitar desta interação para retirar nutrientes e utilizá-los para no seu próprio metabolismo, ou produzem substâncias tóxicas que são absorvidas pelo hospedeiro. Em ambos os casos, poderá ocorrer interferência nas funções normais da planta, levando ao desequilíbrio e o desenvolvimento da doença (REZENDE et al., 2011).

De acordo com Dordas (2008), quando uma planta é infectada por um patógeno sua fisiologia é prejudicada, e especialmente a absorção de nutrientes, a assimilação, a translocação da raiz para a parte aérea e também a utilização dos nutrientes. O patógeno também pode afetar a permeabilidade da membrana ou a mobilização em direção aos locais infectados, o que pode induzir a deficiência nutricional ou em alguns casos a hiperacumulação e toxicidade de nutrientes.

Essa desvantajosa relação com determinados microrganismos, pode levar a instalação e ao desenvolvimento da doença nas plantas. Contudo, o desenvolvimento da doença não depende somente de como o patógeno age ou da sua virulência, mas de fatores

como a suscetibilidade do hospedeiro e principalmente de um ambiente que favoreça a instalação da doença (FERREIRA et al., 2007).

Na cultura do feijoeiro, os microrganismos causadores de doenças incluem os fungos, bactérias, vírus e nematoides. Dentre os microrganismos causadores de doença, os que apresentam maior frequência são os fungos, podendo ser de parte aérea e do solo (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Dentre os fungos causadores de doença destaca-se o *Colletotrichum lindemuthianum*, principal patógeno da parte aérea do feijoeiro, agente etiológico da antracnose.

2.4.2.1 Antracnose

Nas cultivares de feijoeiro susceptíveis, a antracnose é uma das principais doenças fúngicas que podem levar à redução drástica na produtividade ou depreciar a qualidade do produto. Essa doença ocorre com frequência em regiões com alta umidade e temperaturas amenas. De acordo com Paula Junior et al. (2015), as condições ideais para o desenvolvimento da doença inclui temperaturas entre 15 e 25 °C e umidade relativa do ar acima de 95%. Nas vagens a esporulação do fungo é abundante em temperaturas que variam entre 14 e 18 °C.

O agente causal da antracnose, *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., é um fungo hemibiotrófico intracelular e se reproduz de forma assexuada. *C. lindemuthianum* corresponde à fase imperfeita do fungo e possui o micélio septado e ramificado, com coloração que varia de hialina a quase negra à medida que vai envelhecendo (Figura 6) (PAULA JÚNIOR et al., 2015).

Os conídios do fungo são hialinos, unicelulares, variando de alongado à cilíndrico, com as extremidades arredondadas, podendo em alguns casos, ocorrer uma extremidade pontiaguda. Os conídios produzidos nos acérvulos apresentam-se envoltos por matriz gelatinosa de cor salmão, ocre ou rosa, constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. A matriz gelatinosa protege os conídios da dissecação, aumentando a eficiência de germinação e penetração no hospedeiro (MENEZES, 2006).

Após o contato inicial com a superfície foliar, sob condições favoráveis, os conídios germinam em um período de 6 a 9 horas, formando o tubo germinativo e o apressório (WENDLAND et al., 2016). A penetração do apressório na cutícula e parede celular da planta hospedeira provavelmente envolva a combinação entre força mecânica e secreção de enzimas degradadoras da cutícula e parede celular. Após a fixação do apressório na superfície foliar,

há formação da hifa infectiva, que emerge a partir do poro do apressório e penetra diretamente a cutícula e na parede celular do hospedeiro (MÜNCHA et al., 2008; PERFECT et al., 1999).

Após a penetração nos tecidos da folha, *C. lindemuthianum*, apresenta dois estádios de infecção: uma fase inicial biotrófica e uma fase secundária necrotrófica. A fase biotrófica tem duração média de 24 horas, nesta fase as membranas das células infectadas invaginam-se em torno das vesículas de infecção, não havendo qualquer alteração estrutural no citoplasma (PERFECT et al., 1999).

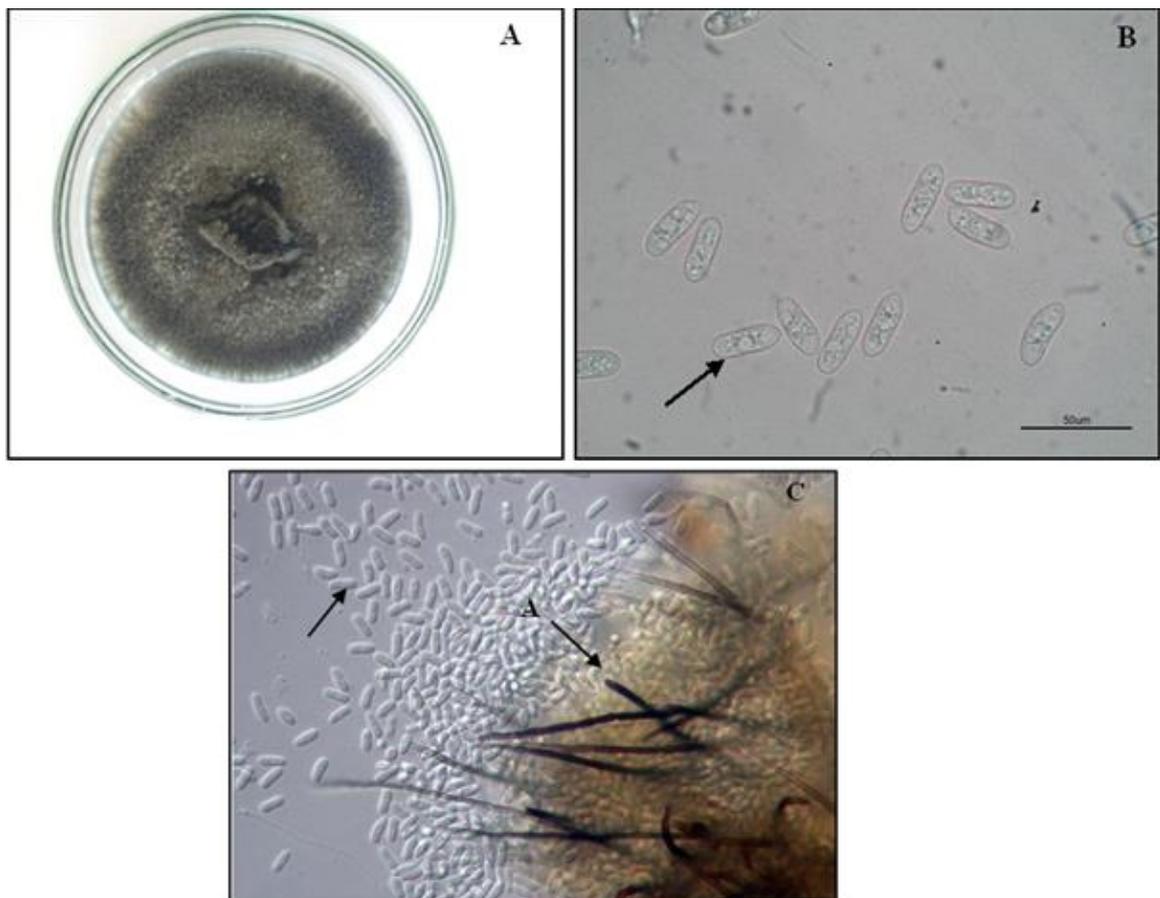


Figura 6. A: Placa com cultura de *Colletotrichum lindemuthianum*. B: conídios de *C. lindemuthianum*. C: Acérvulo e conídios de *C. lindemuthianum*. Seta: conídios, A: acérvulo. Foto: Eliana P. Pereira Figueira e Fred Books.

Após a infecção de várias células do hospedeiro as hifas crescem intracelularmente, degenerando as células infectadas e formando hifas secundárias, constituindo a fase necrotrófica de infecção. Nesta fase, são observados os sintomas típicos da doença (MÜNCHA et al., 2008).

Dependendo da intensidade da doença, os sintomas da antracnose podem ser observados em todos os órgãos da planta. Plantas jovens podem ser mais susceptíveis a doença

por possuírem tecidos menos lignificados (CRUZ et al., 2014). Nas folhas é observado o escurecimento das nervuras, sintoma característico da antracnose no feijoeiro. No caule e pecíolos as lesões são normalmente, elípticas deprimidas e escuras. Nas vagens as lesões são circulares e deprimidas, de coloração marrom-clara ou escura com centro mais claro (Figura 7). Sementes infectadas podem apresentar lesões escuras de tamanhos variáveis (PAULA JÚNIOR et al., 2015).

Como o fungo sobrevive em restos de cultura e em sementes, alguns fatores podem contribuir para a disseminação da doença (PEDRO et. al., 2012). À longas distâncias, o uso de sementes contaminadas e chuvas moderadas e frequentes, acompanhadas de ventos, podem contribuir para disseminação. À curta distância, respingos de chuva sobre resíduos de colheita, insetos, homem e implementos agrícolas podem ser fatores potenciais na disseminação.

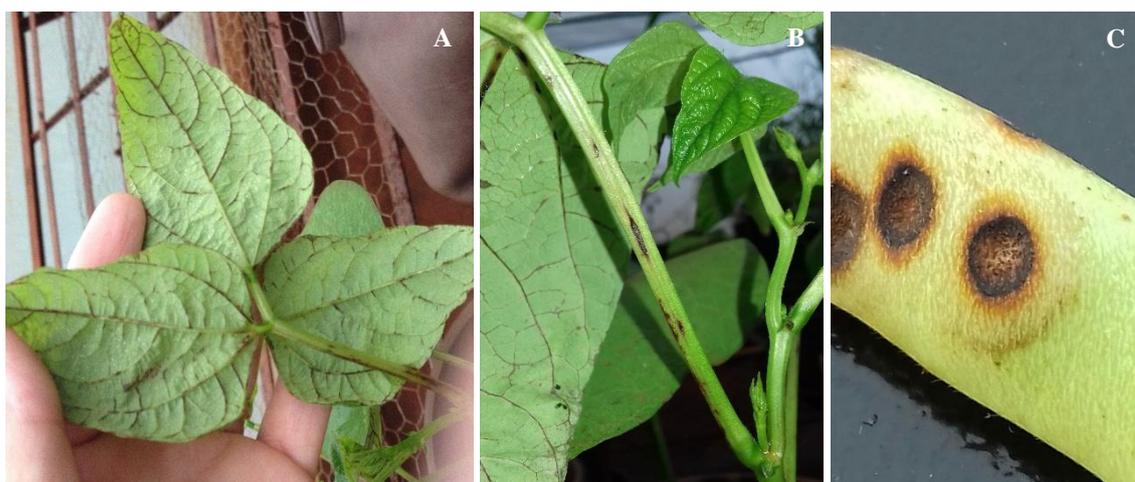


Figura 7. Sintomas da antracnose no feijoeiro. **A:** Trifólio com nervuras escurecidas. **B:** lesões no pecíolo. **C:** Vagens com lesões circulares e deprimidas, de coloração marrom escura com centro mais claro. Fotos: Eliana P. Pereira Figueira e Nicanor Pilarski Henkemeier (2016).

Dessa forma, o controle da antracnose está pautada, principalmente, no uso de cultivares resistentes, de sementes sadias tratadas com fungicidas e aplicação direta de fungicidas na cultura (GADAGA et al., 2017). Embora os métodos de controle acima citados sejam recomendados, a existência de várias raças do patógeno representa um fator limitante para a obtenção de novas cultivares de feijoeiro resistentes à antracnose (WENDLAND et al., 2016). A utilização de fungicidas também é uma medida de controle bastante utilizada pelos agricultores, contudo, seu uso exagerado pode acarretar em efeitos negativos sobre o ambiente e a saúde dos produtores além de favorecer o surgimento de espécies resistentes do patógeno

(PEDRO et al., 2012). No que tange a este aspecto, Gadaga et al. (2017) afirmam que é necessário encontrar métodos alternativos de controle da antracnose, para diminuir as perdas ocasionadas por essa doença na cultura do feijoeiro.

2.5 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS

O uso de agroquímicos para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura, cresceu de forma acelerada nas últimas décadas no Brasil, o que colocou o país como líder mundial no consumo de insumos agrícolas (MARTINI et al., 2016). Apesar da eficiência no controle das doenças em plantas, os agrotóxicos constituem um dos componentes que mais geram custos na produção (O'BRIEN, 2017). Aliado ao alto custo está o seu efeito negativo sobre o ambiente, levando a contaminação do solo, da água, dos animais e dos alimentos, provocando impactos expressivos na saúde pública (BORTOLUZZI et al., 2006; SOARES; PORTO, 2012). Singh et al. (2018), afirmam que além de afetar o meio ambiente e os organismos não-alvo, o uso contínuo e intenso de agroquímicos cria alta pressão seletiva sobre patógenos, o que resulta no desenvolvimento de resistência dos patógenos ao princípio ativo desses produtos.

Dessa forma, o emprego de novas tecnologias de controle, ambientalmente mais seguras, tem substituído a utilização de agrotóxicos e contribuído para uma agricultura mais sustentável (O'BRIEN, 2017). Dentre as possibilidades está o controle alternativo, que visa além de defender a planta, manter um sistema de controle menos dependente dos agrotóxicos (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). De acordo com Singh et al. (2018) o uso de biofertilizantes e biopesticidas é uma alternativa para sustentar alta produção com baixo impacto ecológico.

Nessa perspectiva, as principais formas de controle alternativo incluem: o controle biológico, a indução de mecanismos de defesa das plantas e o uso de extratos naturais que apresentam propriedades antimicrobianas ou indutoras de resistência (STANGARLIN et al., 2010).

O controle biológico visa a supressão da doença através da aplicação de um agente de biocontrole, geralmente um fungo, bactéria ou vírus, ou uma mistura destes. Dessa forma, na tentativa de transpor uma situação frequente na natureza, os agentes de biocontrole são aplicados diretamente nas plantas ou no solo e através de relações antagônicas, agem impedindo a infecção e o estabelecimento do patógeno na planta (BEDENDO; MASSOLA JUNIOR; AMORIM, 2011). Os mecanismos antagônicos utilizados incluem a antibiose,

amensalismo, parasitismo, competição, predação, hipovirulência e pela produção de metabólitos que inibem o desenvolvimento de outro microrganismo (O'BRIEN, 2017).

De acordo com O'Brien (2017), uma das principais vantagens de usar um agente de biocontrole está no fato de serem altamente específicos e, portanto, são considerados inofensivos para espécies não-alvo. Outra vantagem do controle biológico refere-se ao fato de que alguns dos agentes de biocontrole, além de proteger a planta, atuam estimulando o crescimento da mesma.

Espécies do gênero *Trichoderma* são exemplos de agentes de biocontrole em potencial. Isso se deve à uma série de características que incluem o seu crescimento rápido, o fato de serem excelentes produtores de esporos, ótimos oportunistas e poderosos produtores de antibióticos. Além dessas características, a facilidade de produção em grande escala e a possibilidade de armazenamento durante meses possibilitam a sua comercialização (NAWROCKA; MALOLEPSZA, 2013; SABA et al., 2012).

Pequisas recentes demonstram ainda, que os agentes de biocontrole podem atuar de forma efetiva no controle de doenças pós-colheita ou mesmo na redução de sintomas causados pelo estress hídrico (DIMKPA; WEINAND; ASCH, 2009). Brader et al. (2014), relatam em seu trabalho que o uso da bactéria *Azospirillum lipoferum* leva a uma redução significativa nos sintomas provocados pelo estress hídrico no milho.

A indução de resistência é uma forma de controle alternativo mediado pela ativação de mecanismo de defesa latentes, em resposta ao tratamento com moléculas indutoras, que resulta na proteção contra infecções subsequentes por fitopatógenos (PEDRO et al., 2012; STANGARLIN et al., 1999).

As respostas de defesa desencadeadas após o contato com o indutor, resultam na ativação de mecanismos estruturais ou bioquímicos nas plantas que agem retardando o patógeno ou impedindo a instalação da doença (PASCHOLATI; DALIO, 2018; STANGARLIN et al., 2011). Os indutores que promovem a ativação desses mecanismos de defesas nas plantas podem ser de origem biótica (extratos, compostos e moléculas extraídas de organismos vivos, como plantas e microorganismos) ou abiótica (acibenzolar-S-metil e análogos) (ARAUJO; MENEZES, 2009).

Vários estudos têm sido realizados demonstrando a eficiência dos indutores na indução de resistência e no controle de doenças em plantas (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016). Dentre os indutores bióticos mais estudados destacam-se principalmente *Bacillus subtilis* (ARAUJO; MENEZES, 2009; SHAFI; TIAN; 2017), *Pseudomonas*

aeruginosa (AUDENAERT et al., 2002; MUNHOZ et al., 2017) e fungos do gênero *Trichoderma* (HOITINK; MADDEN; DORRANCE, 2006; VITTI et al., 2016). Já entre os indutores abióticos destaca-se o Acibenzolar-S-metil (ASM). O ASM é um análogo funcional ao ácido salicílico o que induz respostas semelhantes nas plantas aos induzidos por agentes patogênicos (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

Outra forma de controle alternativo contra fitopatógenos é o uso de extratos naturais de plantas com potencial antimicrobiano e indutor de defesa das plantas. Nos estudos de Fonseca et al. (2015) o óleo essencial de alecrim-do-campo tem efeito potencial *in vitro* contra *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*. Esses resultados corroboram com os obtidos por Hillen et al. (2012) onde os óleos essenciais extraídos de *Eremanthus erythropappus* (candeia), *Cymbopogon martinii* (palmarosa) e de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) tiveram efeitos de inibição sobre o crescimento *in vitro* de *Alternaria carthami*, *Alternaria* sp. e *Rhizoctonia solani*.

2.6 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

As plantas são capazes de se proteger usando um complexo conjunto de mecanismos que envolvem sinais que iniciam no reconhecimento do agente patogênico pela planta e culmina com uma reprogramação metabólica, resultando na resposta defesa da planta (STANGARLIN et al., 2011). Por meio de sinalização, as plantas são capazes de detectar danos em seus próprios órgãos, e podem também aumentar a sua resistência em resposta a sinais que indicam a presença de inimigos em seu ambiente imediato (NIRANJAN RAJ et al., 2012; WALTERS; FOUNTAINE, 2009).

Nas respostas de defesa, as plantas podem ou não apresentar resistência específica a um agente patogênico. Nas plantas com resistência específica o gene de resistência (gene R) do hospedeiro, codifica para proteínas que reconhecem o produto do gene de avirulência (Avr) no patógeno (PIQUEREZ et al., 2014). Nesta situação, a planta responde rapidamente ao agente patogênico, gerando, por exemplo, uma resposta de hipersensibilidade (HR). Em contraste, se o agente patogênico não possui um gene Avr que é reconhecido pela planta hospedeira, HR não é ativado e o patógeno é combatido por um gama de defesas não específicas. Isto é conhecido como resistência poligênica ou basal (WALTERS; FOUNTAINE, 2009).

Dessa forma, fica claro que a partir da infecção por um patógeno, os vegetais suscetíveis podem desenvolver uma maior resistência e apresentarem respostas eficazes possíveis de retardar ou impedir a ação dos agentes patogênicos (LLORENS; GARCÍA-AGUSTÍN; LAPEÑA, 2017). Isto é conhecido como resistência induzida e de acordo com Choudhary, Prakash e Johri (2007), pode ser de dois tipos: resistência sistêmica adquirida ou SAR (do inglês – *systemic acquired resistance*) e a resistência sistêmica induzida ou IRS (do inglês - *induced systemic resistance*).

SAR refere-se à forma de resistência ativada na planta dependente da via de sinalização do ácido salicílico. É estimulada após a exposição à microrganismos patogênicos, não patogênicos ou a estímulos químicos artificiais como o quitosana ou ácido salicílico (PASCHOLATI, 2011; WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). O aumento dos níveis de ácido salicílico, tanto local como sistemicamente, é reconhecido por uma proteína reguladora NPR1 que gera um sinal de ativação do gene RP, com conseqüente produção de proteínas-RP. Esse tipo de resposta só será efetiva após o intervalo de tempo necessário para que as proteínas-RP se acumulem nos tecidos vegetais (WALTERS; FOUNTAINE, 2009).

Já a IRS é depende das vias de sinalização do ácido jasmônico e etileno e não envolve a síntese de proteínas-RP. Caracterizada como uma resistência de amplo espectro, age contra patógenos de vários tipos, bem como à estresses abióticos (O'BRIEN, 2017). Desenvolve como um resultado da colonização das raízes das plantas por microrganismos não patogênicos ou pelo uso elicitores naturais ou sintéticos (BARROS et al., 2010; CHOUDHARY; PRAKASH; JOHRI, 2007).

Na indução de resistência, vários são os agentes indutores ou elicitores capazes de estimular a resposta de defesa da planta, sendo de natureza biótica ou abiótica (SOYLU BAYSAL; SOYLU, 2003; WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013). Compostos presentes em extratos de plantas, fungos e rizobactérias promotoras de crescimento, são muito explorados na literatura como indutores bióticos, em contrapartida, alguns indutores abióticos comerciais também são utilizados na indução de resistência, como por exemplo, o acibenzolar-S-metil (ASM), probenazole, produtos a base de silício e fosfitos, entre outros (BARROS et al., 2010; THAKUR; SOHAL, 2013; UCHÔA et al., 2014; WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

Em alguns casos, as plantas podem obter informações sobre seus invasores mesmo antes do contato direto, usando compostos voláteis como elicitores (O'BRIEN, 2017; SHARIFI; LEE; RYU, 2017). Quintana-Rodriguez et al. (2014), afirmam que os compostos voláteis também podem ser liberados pelas plantas que sofrem o ataque de patógenos, e atuam

como uma fonte de informações e de comunicação planta-planta, podendo mediar a sinalização de resistência e resposta de defesa na planta vizinha.

Na resistência induzida, a efetiva resistência da planta está associada ao intervalo de tempo entre o tratamento com o elicitor e a inoculação do patógeno, sendo dependente da síntese e acúmulo de substâncias específicas de defesa da planta (WALTERS; FOUNTAINE, 2009). A partir do momento em que a planta tem seus mecanismos de defesa induzidos, a resistência pode ser transitória ou mantida durante diversos dias (ou semanas), numa expressão coordenada por um conjunto de genes que codificam as proteínas e enzimas que atuam permitindo a proteção da planta (BARROS et al., 2010; CAMPOS, 2009; MUNDT, 2014).

2.6.1 Mecanismos de Indução de Resistência

Como resposta às ameaças, em destaque às por fitopatógenos, as plantas apresentam mecanismos capazes de retardar ou evitar os danos provocados pelos patógenos em seus tecidos (STANGARLIN et al., 2011). Os mecanismos de defesa pelos quais as plantas utilizam para se proteger podem ser estruturais ou bioquímicos. Os mecanismos estruturais constituem-se como barreiras físicas, que impedem a penetração e colonização dos tecidos pelo patógeno. Já os bioquímicos, constituem-se de substâncias tóxicas capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno no hospedeiro, gerando condições impróprias para seu crescimento e sobrevivência no interior da planta (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Os mecanismos estruturais e bioquímicos podem ser pré-formados ou pós-formados em relação ao contato inicial com o agente patogênico (STANGARLIN et al., 2011). São designados pré-formados (passivos ou constitutivos) as substâncias ou estruturas que estão presentes na planta antes do primeiro contato com o patógeno ou elicitor, no caso das substâncias bioquímicas, estão presentes em altas concentrações no tecido sadio antes desse contato inicial (PASCHOLATI; DALIO, 2018). No caso dos pós-formados (ativos ou induzíveis), se mostram ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, e são produzidos ou ativados em resposta a presença do indutor, normalmente o próprio patógeno (PASCHOLATI, 2011; STANGARLIN et al., 2011; SUN et al., 2014).

Os mecanismos estruturais pré-formados correspondem às estruturas que atuam como barreira para a entrada do patógeno e podem ser identificados como a cutícula, os

estômatos e os tricomas. Mecanismos como a formação de halos, lignificação, papilas e de camadas de cortiça e abscisão constituem os estruturais pós-formados (PASCHOLATI; DALIO, 2018; SUN et al., 2014). Nos mecanismos bioquímicos pré-formados é possível encontrar substâncias como fenóis, lactonas, alcalóides, algumas proteínas e terpenóides, como ácido clorogênico, ácido catecólico e protocatecólico, avenacinas, tuliposídeos, α -tomatina, glicosídeos fenólicos, enzimas de defesa vegetal e inibidores proteicos (STANGARLIN et al., 2011). Os mecanismos bioquímicos pós-formados englobam o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas-RP e a formação de radicais livres oriundos do estresse oxidativo, como as espécies reativas de oxigênio e o óxido nítrico (SOARES; MACHADO, 2007; STANGARLIN et al., 2011; SUN, et al., 2014).

O reconhecimento dos invasores pela planta ocorre através da liberação de moléculas chamadas de eliciadores (O'BRIEN, 2017). As respostas das plantas ao contato com os eliciadores são complexas, envolvem a ativação de vias de sinalização, onde genes específicos de defesa são ativados e expressos sistemicamente, induzindo à mudanças metabólicas específicas (QUINTANA-RODRIGUEZ et al., 2014).

O contato do eliciador com os receptores de membrana das células vegetais promovem mudanças transitórias no nível de cálcio intracelular, segundos ou minutos após o contato, o que promove fluxos de íons através das membranas, levando a despolarização da membrana. De forma conjunta, o aumento do cálcio intracelular precede a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MAUCH-MANI et al., 2017). A despolarização da membrana leva à alterações dos estados de fosforilação das proteínas resultando numa cascata de sinalizações que promovem a ativação de mensageiros secundários, que amplificam o sinal e regulam expressão de genes específicos de defesa (SUN et al., 2014). Essas sinalizações geradas a partir da despolarização da membrana desencadeiam a ativação das vias do ácido salicílico ou jasmonico/etileno, dependendo da natureza do eliciador (MAUCH-MANI et al., 2017).

Gerlach et al. (2015) verificaram que no milho, após o inoculação com fungos micorrizicos houve a indução de um grupo de genes relacionados à defesa e uma indução concomitante de metabolitos secundários, curiosamente foi observada a mudanças nos genes envolvidos no metabolismo primário, como o metabolismo dos carboidratos, ácidos orgânicos e aminoácidos.

Os genes ativados codificam para produtos que promovem alterações metabólicas correlacionadas com a síntese de proteínas-RP (tais como as enzimas peroxidases, β -1,3-

glucanases e quitinases) ou com mudanças no padrão de determinadas enzimas das células, tais como a fenilalanina amônia-liase, permitindo que as plantas respondam adequadamente às ameaças bióticas (DINIZ, 2009; JUSTYNA; EWA, 2013).

As respostas ocorrem inicialmente nas células circundantes, com produção de EROs, resposta de hipersensibilidade (RH), síntese de metabólitos secundários como fitoalexinas, fenóis e antocianinas seguidas da formação de barreiras estruturais tais como: alterações na composição da parede celular, formação de papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça e tiloses, que impedem o avanço do patógeno na planta (BARROS et al., 2010; HEIL; BOSTOCK, 2002; NIRANJAN RAJ et al., 2012; STANGARLIN et al., 2011).

As respostas geradas podem ocorrer no local do contato com o elicitores (resistência local) ou se espalharem pela planta induzindo à mudanças sutis na expressão de genes em tecidos sadios da planta (resistência sistêmica) (BARROS et al., 2010). Enquanto as fitoalexinas são principalmente características da resposta local, as proteínas-RP ocorrem tanto local como sistemicamente (HEIL; BOSTOCK, 2002). Diniz (2009) afirma que a partir do local da indução um sinal pode ser liberado e através do floema atinge sistemicamente órgãos não afetados da planta, promovendo uma resposta sistêmica a partir de uma resposta local.

2.7 RESPOSTA DE HIPERSENSIBILIDADE

A resposta de hipersensibilidade (RH) consiste na formação de barreira químicas alocadas no ponto de penetração do patógeno, sendo um dos mais eficientes mecanismos de defesa (STANGARLIN et al., 2011). No tecido vegetal, RH é observada através do aparecimento de lesões necróticas localizadas, resultantes da morte celular programada no sítio de infecção, impedindo o desenvolvimento do patógeno (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011).

Essa resposta envolve sucessivos eventos e sinais que compreendem desde o reconhecimento entre o patógeno e o hospedeiro até o colapso celular vegetal localizado, impedindo o desenvolvimento da infecção pelo patógeno, correspondendo à primeira etapa de resposta de defesa da planta (NIRANJAN RAJ et al., 2012). Os aspectos fisiológicos da HR incluem o aumento rápido e transitório de espécies reativas de oxigênio, a perda de íons potássio (K^+) e ganho de íons hidrogênio (H^+) pelas células, a destruição de compartimentos e o espessamento das paredes celulares e da cutícula, além da síntese de toxinas (fitoalexinas) e

proteínas relacionadas à defesa, denominadas proteínas-RP (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011).

Dentre as principais alterações decorrentes da RH está a indução da produção de um grande número de proteínas solúveis, que são conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese ou, simplesmente, proteínas-RP, destacando-se as peroxidases, quitinases e β -1,3-glucanases. Outras são o aumento da expressão de fenilalanina amônia-liase (FAL) e deposição de lignina, e aumento dos níveis de ácido salicílico (SINGH; UPADHYAY, 2013).

Vários estudos já foram realizados evidenciando a resposta de hipersensibilidade em plantas tratadas com indutores. No coleótilo do milho tratado com indutor *Bacillus pumilus* INR-7, RH foi observada na grande maioria dos coleótilos analisados 12 horas após a inoculação com o patógeno, diferentemente do observado no milho resistente à doença onde RH foi observada antes de 12 horas e no controle susceptível RH na mesma proporção somente ocorreu após 24 horas da inoculação com o *Sclerospora graminicola* (NIRANJAN RAJ et al., 2012). Nas folhas de feijoeiro foi observada a reação de hipersensibilidade 48 horas após a inoculação com o *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas tratadas com o indutor Ulvana (FREITAS; STADNIK, 2012).

2.8 PRIMING

A exposição das plantas a certos estresses, bióticos ou abióticos, pode induzir um estado de sensibilização em toda a planta. Este estado de sensibilização, caracterizado por uma ativação mais rápida e eficiente das defesas celulares mediante à uma nova exposição ao estresse, é conhecido como *priming* de defesa (JUNG et al., 2009; PASTOR et al., 2013).

De acordo com Justyna e Ewa (2013), o *priming* de defesa (“estado de alerta”) é uma condição na qual plantas tratadas com o eliciador tornam-se preparadas à ativar respostas de defesa de forma rápida e de magnitude aumentada, quando expostas ao ataque seguinte por um patógeno. O estado de *priming* é uma alternativa à ativação da resistência induzida de longa duração, pois promove o desenvolvimento de “memória” para sinais de estresse subsequentes. Seus mecanismos baseiam-se em mudanças epigenéticas ou no armazenamento de sinais químicos intracelulares, como proteínas ou fatores de transcrição (BRUCE et al., 2007; CONRATH, 2011).

O estado de *priming* pode ser alcançado pelo tratamento com microrganismos benéficos ou produtos químicos sintéticos ou naturais (MAUCH-MANI et al., 2017). Os

eliciadores, capazes de estimular o *priming*, constituem-se de moléculas com natureza química variada (peptídeos, oligossacarídeos, glicoproteínas e ácidos graxos) reconhecida pelas plantas, com consequente ativação de repostas de defesa (HILKER et al., 2016).

Diversos tipos de eliciadores que estimulam o *priming* já foram identificados e descritos na literatura. Entre eles destacam-se as moléculas de reconhecimento padrão ou padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) presentes em microrganismos benéficos (BECKERS et al., 2009). O ergosterol, contido nas membranas celulares dos fungos do gênero *Trichoderma*, é um exemplo clássico de MAMPs que induz ao estado de alerta ou *priming* nas plantas (MAUCH-MANI et al., 2017).

O reconhecimento desses eliciadores pelas plantas ocorre através de receptores de reconhecimento padrão ou por proteínas de resistência presentes na membrana das células vegetais (HILKER et al., 2016). Além de serem reconhecidos pelos receptores da planta, o que facilita a resposta de defesa, MAMPs podem induzir alterações metabólicas que promovem um aumento nos níveis de receptores de reconhecimento padrão nas células vegetais, facilitando o reconhecimento dos padrões moleculares presentes nos patógenos (PAMPs), desencadeando uma resposta de defesa mais eficiente (MAUCH-MANI et al., 2017).

O aumento nos níveis de receptores de reconhecimento padrão nas células vegetais foi evidenciado em plantas de *Arabidopsis* tratadas com o análogo de ácido salicílico, onde foi observado o aumento de receptores como BAK1, Flagellin-Sensitive 2 (FLS2) e Chitin Elicitor Receptor Kinase 1 (CERK1), que por sua vez, apresentou maior capacidade de resposta à flagelina e à quitina presente em bactérias e fungos fitopatogênicos (BOLLER; FELIX, 2009).

Como resultado do *priming*, as plantas induzidas também exibem um aprimoramento na fosforilação de proteínas envolvidas nas vias de sinalização de defesa. Beckers et al. (2009), afirmam que uma vez sensibilizado, as fosforilações passam a ser mais eficientes, conforme observado em *Arabidopsis* após o desafio com *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, o que resulta em uma resposta de defesa mais rápida e intensa.

A percepção aumentada, desenvolvida mediante o *priming* deve-se não apenas aos receptores celulares, mas também às estruturas físicas que ajudam as plantas a monitorar seus arredores e se defenderem, como é o caso dos tricomas. O tratamento químico com jasmonato de metila induz uma maior produção de tricomas nas folhas de tomate, preparando a planta para aumentar a sensibilidade à presença de herbívoros (BOUGHTON; HOOVER; FELTON,

2005). As plantas sensibilizadas podem também mostrar uma geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) potenciada em resposta a um desafio. Wang et al. (2016) recentemente sugeriram que a interação entre a sinalização EROs e a geração de Ca^{2+} cloroplasmática facilitaria o fechamento estomático quando as plantas perceberem um ambiente estressante.

Curiosamente, uma resposta estomática melhorada também pode levar à tolerância ao estresse abiótico, conforme relatado por Jakab et al. (2005). Plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com ácido β -aminobutírico (BABA), exibiram fechamento estomático mais rápido, quando expostas a baixa umidade, que as plantas não tratadas. Além da abertura estomática, foi observado que em plantas tratadas com BABA, apresentaram uma diminuição na condução estomática melhorando a eficiência do uso da água e levando à tolerância ao estresse hídrico (MAUCH-MANI et al., 2017).

Dessa forma o *priming*, uma alternativa eficaz de proteção das plantas contra estresses bióticos e abióticos, e, portanto, representa uma abordagem potencial para melhorar a proteção das plantas em sistemas agrícolas. As vantagens do *priming* estão principalmente no fato de ser uma estratégia de resistência eficiente e de apresentar custo metabólico relativamente baixo no avanço da defesa da planta, uma vez que seus mecanismos de defesa são sutilmente modulados, até que nova ameaça de infecção retorne (CONRATH, 2011; HILKER et al., 2016).

2.9 FOSFITO COMO INDUTOR DE RESISTÊNCIA

O fosfito (H_2PO_3^-) é um composto derivado da neutralização do ácido fosforoso (H_3PO_3) com uma base (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, ou hidróxido de amônio), é considerado um fertilizante para aplicação foliar ou via solo (ARAUJO et al., 2014), sendo rapidamente absorvido pela planta e transcolado pelo xilema e, posteriormente pelo floema (LOVATT; MIKKELSEN, 2006).

Sua recomendação como fertilizante em geral está associada ao fato de possuírem, em sua composição, nutrientes como o cálcio, amônia e o potássio, dependendo da base utilizada para neutralizar H_3PO_3 . Contudo, não há evidências concretas de que plantas utilizam o fosfito como fonte de fósforo (P) sendo os fosfatos, fontes exclusivas de P para as plantas (JACKSON et al., 2000). Porém, no caso do fosfito de K poderá ocorrer a otimização do potássio nas plantas, o que se torna vantajoso pois o K apresenta inúmeras funções, destacando-se, o envolvimento na síntese de compostos de alto peso molecular (proteínas,

celulose e amido) e a ativação de vários sistemas enzimáticos, muitos deles participantes dos processos de fotossíntese e respiração (LOOSLI et al., 2017). De acordo com Dalio et al. (2012), o fosfito possui excelentes qualidades fitosanitárias, atuando diretamente sobre os fungos ou ativando mecanismos de defesa da planta.

Além disso, o uso do fosfito pode se associar a melhoria da qualidade nutricional, pois os fosfitos apresentam rápida absorção nas raízes, folhas e córtex do tronco com menor exigência de energia da planta, sendo ainda ótimos complexantes, favorecendo a absorção de K, Ca, B, Zn, Mo e Mn entre outros nutrientes (JACKSON et al., 2000).

Embora o fosfito apresente um efeito fungicida e possa ser efetivo no controle específico de algumas espécies de Oomycetos, tem pouco efeito sobre a maioria de fungos do solo. O seu efeito fungicida relativamente limitado, combinado com sua capacidade de estimular as plantas e induzir respostas com amplo espectro de metabolitos biologicamente ativos, faz do fosfito um agente de controle relativamente benigno e seguro para o ambiente (LOVATT; MIKKELSEN, 2006).

Os mecanismos envolvidos na indução de resistência pelo fosfito são complexos e pouco esclarecidos. Contudo, alguns estudos apontam que o fosfito é capaz de ativar genes das vias do ácido salicílico (AS) e ácido jasmônico etileno (AJ/ET) em plantas inoculadas e não inoculadas com o patógeno. A transcrição elevada desses genes em *Arabidopsis thaliana*, na ausência do patógeno, sugere que em vez de simplesmente estimular a planta para uma resposta mais rápida e intensa à infecção, o fosfito é capaz de regular positivamente a expressão de genes de defesa na ausência de uma infecção. A expressão aumentada dos genes de defesa nesta condição, mostra que o efeito de fosfito no sistema de defesa da planta não é apenas mediado por uma liberação de elicitores do patógeno invasor, mas que o próprio fosfito modula a resposta de defesa (DALIO et al., 2014; ESHRAGHI et al., 2011).

A ativação de genes das vias AS e AJ/ET mostra que, embora essas vias sejam tipicamente consideradas antagônicas (THATCHER; ANDERSON, SINGH, 2005), fosfito regula de forma coordenada uma série de vias de defesa. No entanto, o entendimento desta regulação ainda é não é bem esclarecido, pois Rookes, Wright e Cahill (2008) utilizando *Arabidopsis* mutantes para as essas vias, não apresentaram aumento na suscetibilidade ao patógeno *P. cinnamomi*, sugerindo o envolvimento de outras vias na resistência. Portanto, sugere-se que fosfito possa conferir resistência a determinados patógenos através de mecanismos independentes das vias de sinalização comuns (ESHRAGHI et al., 2011; BURRA et al. 2014).

O estímulo da resposta de defesa da planta pelo fosfito tem sido observado em várias interações planta-patógeno (DALIO et al., 2014; JACKSON et al., 2000) e apesar de recentes, estudos em maçã, cafeeiro, cacauzeiro e mamoeiro já apontaram a eficiência destes compostos tanto no controle direto de fungos, quanto na indução de resistência das plantas contra patógenos (BRACKMANN et al., 2004; DIANESE et al., 2009; NOJOSA et al., 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* de Marechal Cândido Rondon, na casa de vegetação climatizada da Estação Experimental de Horticultura e Cultivo Protegido, pertencente a mesma instituição, localizada sob latitude de 24°33' S, longitude de 54°04' W e altitude aproximada de 420 metros e, no Laboratório de Biologia do Instituto Federal do Paraná (IFPR), *Campus* Assis Chateaubriand, localizado sob latitude de 24°24' S, longitude de 53°30' W e altitude próxima a 400 metros.

3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *Trichoderma* spp.

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no estudo pertencem à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Unioeste, *Campus* Marechal Cândido Rondon. Os isolados selecionados para o trabalho foram *Trichoderma harzianum* (isolado TOD1) e *Trichoderma virens* (isolado TM4). Esses isolados foram selecionados com base nos resultados observados por Dildey (2014) onde ambos os isolados mostraram-se endofíticos nas raízes do feijoeiro e eficientes na produção de enzimas relacionadas a indução de resistência contra *Colletotrichum lindemuthianum*.

Os isolados foram mantidos em placas de Petri com meio BDA (batata – dextrose – ágar) a 28 °C e fotoperíodo de 12 horas até a produção dos inóculos. A concentração do inóculo dos isolados de *Trichoderma* spp, utilizados nos bioensaios, foi determinada pela quantificação do número de conídios. Para tal, foi realizada a contagem de esporos em microscópio de luz Olympus CX31, com auxílio de câmara de Neubauer. O inóculo dos isolados de *Trichoderma* spp. foram adicionados, separadamente, ao solo e à areia utilizado no cultivo de feijão. A infestação foi realizada pela adição de 1 mL da suspensão de inóculo no momento da semeadura diretamente no sulco, à concentração de 1×10^9 conídios mL⁻¹.

3.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO INÓCULO DE *Colletotrichum lindemuthianum*

O fungo *C. lindemuthianum* raça 73 utilizado como patógeno desafiador foi cedido pela EMBRAPA- CNPAF, Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. (Cl 1247-78, CNPAF- Embrapa).

Os esporos da raça de *C. lindemuthianum*, utilizados para as inoculações, foram obtidos através do cultivo em tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar-vagem. O meio consiste de uma mistura de água ultrapurificada e ágar na concentração de 0,02 g mL⁻¹ acrescida de vagens de feijão. A solução de ágar-água é fundida em micro-ondas e colocada em tubo de ensaio, posteriormente uma ou duas vagens são imersas no meio em cada tubo. O tubo é vedado e autoclavado à 121 °C por 20 minutos, após a autoclavagem o tubo é matindo em posição inclinada até a solidificação.

Em condições assépticas, *C. lindemuthianum* é repicado para os tubos contendo o meio e incubado em câmara de crescimento à temperatura de 20 °C, por um período de 7-10 dias. A partir da esporulação do fungo em meio de cultura, foram preparadas suspensões de esporos utilizando água destilada estéril. Todo processo de preparação foi realizado em câmara de fluxo laminar. A solução foi ajustada para 1,0 x 10⁶ conídios mL⁻¹. A contagem dos esporos para o preparo da solução foi realizada em microscópio de luz Olympus CX31, com auxílio de câmara de Neubauer.

3.3 TRATAMENTO INDUTOR

Os tratamentos utilizados na indução de resistência no feijoeiro contra *C. lindemuthianum* foram compostos de três indutores, sendo dois bióticos e um abiótico. Os indutores bióticos utilizados foram *T. harzianum* (isolado TOD1) e *T. virens* (isolado TM4); e o indutor abiótico foi o fertilizante foliar Fosfito de Potássio Fertilis®.

Dessa forma, o estudo constituiu-se de seis tratamentos e duas condições: na ausência do patógeno e na presença do patógeno em esquema fatorial conforme Tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos indutores utilizados na presença e na ausência do patógeno

TRATAMENTOS		
	Ausência de <i>C. lindemuthianum</i>	Presença de <i>C. lindemuthianum</i>
1	<i>T. harzianum</i>	<i>T. harzianum</i>
2	<i>T. virens</i>	<i>T. virens</i>
3	Fosfito de Potássio (K)	Fosfito de Potássio (K)
4	<i>T. harzianum</i> + Fosfito de K	<i>T. harzianum</i> + Fosfito de K
5	<i>T. virens</i> + Fosfito de K	<i>T. virens</i> + Fosfito de K
6	Água destilada estéril	Água destilada estéril

A aplicação dos tratamentos ocorreu da seguinte forma: nos tratamentos com *T. virens* e *T. harzianum* as sementes de feijão receberam 1 mL da suspensão de conídios na

concentração 1×10^9 conídios mL^{-1} sendo depositado diretamente nos sulcos de solo durante a semeadura. No caso do fosfito de K o tratamento ocorreu diretamente nas sementes antes da semeadura, onde as mesmas foram tratadas com uma solução de fosfito de K na concentração de 4 mL L^{-1} , conforme recomendado pelo fabricante. Além do tratamento das sementes foi realizada uma pulverização foliar de fosfito de K, logo após a expansão do segundo trifólio, na mesma concentração descrita anteriormente. Dessa forma, os tratamentos 3, 4 e 5 receberam o fosfito de K como tratamento da semente e via foliar. Nos tratamentos 4 e 5 houve uma combinação de tratamentos com *Trichoderma* e fosfito, conforme Tabela 1.

3.4 CULTIVO DO FEIJOEIRO INDUZIDO POR *Trichoderma* spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O cultivo do feijoeiro em vasos foi realizado em casa de vegetação climatizada da Estação Experimental de Horticultura e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mário César Lopes, Campus de Marechal Cândido Rondon, PR. A cultivar utilizada foi IPR Tangará, descrita como susceptível à antracnose (IAPAR, 2018).

As sementes de feijão IPR Tangará, foram semeadas em vasos de polipropileno, cilíndrico, com capacidade de 4 L, contendo substrato solo:areia:materia orgânica na proporção de 3:2:1, essa mistura autoclavada por uma hora a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ repetindo-se a operação após 24 horas. Foram semeadas seis sementes de feijão do cultivar, com posterior desbaste, deixando se apenas cinco plantas por vaso.

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial 6×2 , sendo seis tratamentos e duas condições, conforme descrito no item 3.3 (Tabela 1), sendo então 12 fatores distribuídos em 5 blocos, totalizando 60 parcelas experimentais.

As plantas cultivadas em vasos receberam os tratamentos conforme item 3.3 e 72 horas após a pulverização foliar de fosfito de K ocorreu a inoculação do patógeno. A suspensão de esporos ajustada $1,0 \times 10^6$ conídios mL^{-1} foi aplicada pelo processo de aspersão foliar nas plantas de feijoeiro, que foram borrifados na parte aérea até a completo molhamento foliar. Após a inoculação, as plantas de feijoeiro foram mantidas em câmara úmida por 24 horas e em temperatura de aproximadamente $22 \text{ }^\circ\text{C}$ (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003), em seguida, deixadas em temperatura ambiente. As plantas permaneceram na casa de vegetação para posterior coleta e realização das análises.

3.4.1 Avaliação da severidade da doença

Para avaliação da severidade da antracnose foram realizados dois experimentos em casa de vegetação, em duas épocas diferentes. O primeiro foi realizado entre os meses de agosto a novembro de 2015 e o segundo entre maio a julho de 2016. Os dois experimentos foram analisados por análise conjunta, utilizando o software SAS (SAS Institute, 2014).

A avaliação foi iniciada no quarto dia após a inoculação, com auxílio da escala diagramática desenvolvida por Dalla Pria, Amorim e Canteli (1999) (Figura 8), realizada com intervalo de três dias e repetida por um período de quinze dias.

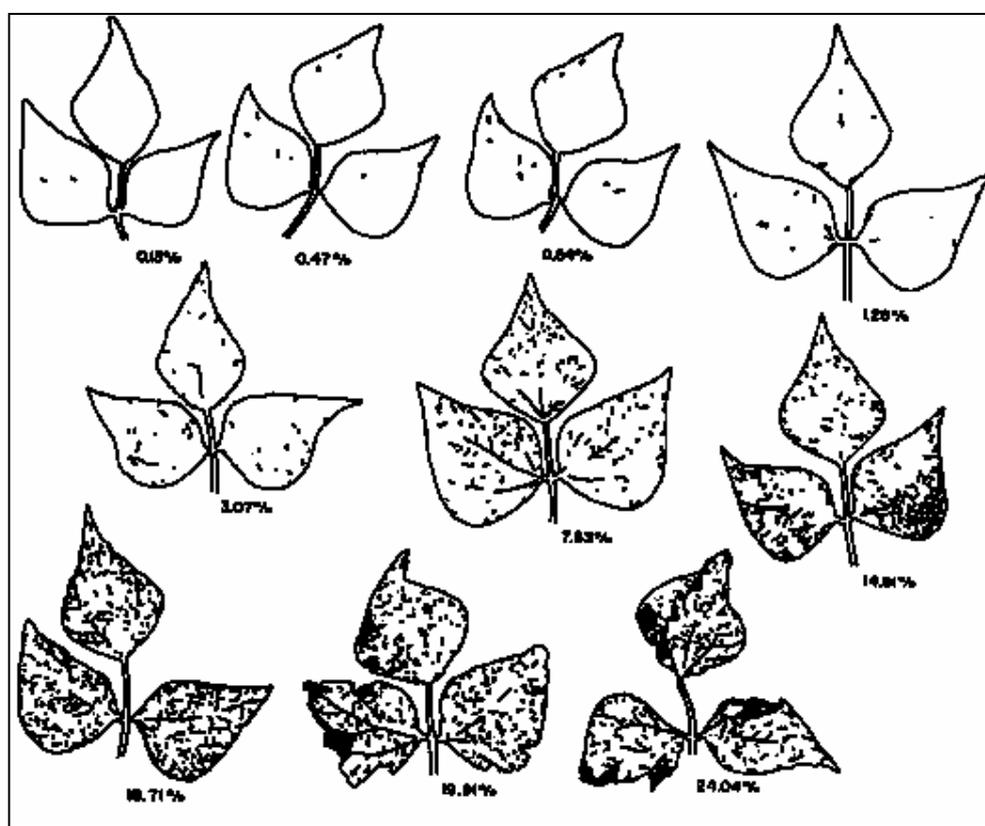


Figura 8. Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amorim e Canteri (1999).

Os percentuais de área lesionada foram utilizados para elaborar a curva de progresso da doença e calcular a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) de acordo com a equação adaptada de Shaner e Finney (1977) onde $AACPD = \sum \left[\left(\frac{Y_1 + Y_2 + 1}{2} \right) \times (T_2 - T_1) \right]$.

3.4.2 Coleta e Armazenamento das Amostras de Tecido Vegetal

Para as avaliações anatômicas, foram realizadas coletas de porções da raiz, caule e folhas (folíolo) do feijoeiro de todas as parcelas experimentais. As coletas ocorreram nos tempos de tempo de 0 horas e 168 horas após a inoculação do patógeno (a.i). O material vegetal coletado foi fixado em FAA 50 (formaldeído, ácido acético, álcool etílico 50%; 2:1:18, v/v) por 24 horas, posteriormente transferidos para etanol 60% por 24 horas, sendo então, armazenados em etanol 70% a 4 °C (JOHANSEN, 1940).

Para a determinação dos teores de lignina e compostos fenólicos, folhas de feijoeiro completamente expandidas foram coletadas das plantas de cada tratamento nos dois tempos, no tempo 0 horas e 168 horas após inoculação com o patógeno. As amostras coletadas em ambos os tempos, foram embaladas em papel alumínio e acondicionadas em caixa térmica contendo gelo e posteriormente foram transportadas para o laboratório e armazenadas em freezer (-20 °C) para posterior análise.

3.4.3 Análises morfoanatômicas

Para as análises morfométricas e anatômicas do feijoeiro frente à indução de resistência, os tecidos da folha, raiz e caule coletados conforme descrito no item 3.4.2 foram processados para microscopia e analisados utilizando o microscópio de luz Olympus CX31. As imagens foram capturadas usando Câmera Biotika 5.0 e a morfometria foi realizada utilizando o software ISCapture.

3.4.3.1 Aspectos anatômicos da folha

Para a caracterização anatômica e histológica da lâmina foliar, foram coletadas porções da região mediana do folíolo central (Figura 9) (próximo à borda do folíolo) de plantas de feijoeiro, nos tempos já mencionados. Estas foram fixadas em FAA, conforme descrito no item 3.4.2.

O material coletado foi processado e montado como lâminas semipermanentes. Para a preparação das lâminas semipermanente, foram realizadas secções transversais das porções foliolares coletadas com o auxílio de micrótomo de mesa, com espessura aproximada de 13-20 µm. As secções do material vegetal foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 25% por 5-10 minutos (o tempo varia de acordo com o tipo de tecido vegetal) e lavadas em água

destilada por quatro vezes, sendo posteriormente submetidas à dupla coloração com azul de alcian 1% em ácido tartárico e safranina aquosa 0,1%. Para tanto, as porções do folíolo já clarificadas foram lavadas em álcool 50% e mergulhadas em corante azul de alcian por 30-50 segundos. Com o auxílio de um pincel, o material vegetal foi transferido para uma lâmina de vidro, o excesso de corante foi retirado e o material foi lavado em etanol 99,8%. Posteriormente o material recebeu algumas gotas do corante safranina, garantindo que o mesmo fosse completamente coberto pelo corante, permanecendo por 10-20 segundos. Após este período o material foi lavado em etanol 50%, para retirar o excesso do corante; depois em etanol 70% e 100% por 1 minuto para desidratação do material (LUQUE; SOUSA; KRAUS, 1996).

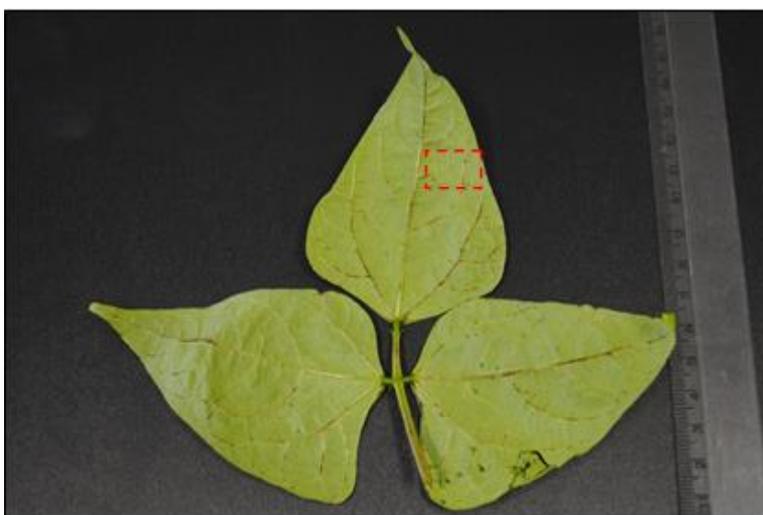


Figura 9. Folha do feijoeiro com sintomas de antracnose. Em destaque a Região do trifólio central onde foi coletado o tecido para avaliação anatômica e histológica. Foto: Eliana P. Pereira Figueira (2016).

Em seguida as secções foram montadas em lâmina e lamínula utilizando-se glicerina 50%. Após a confecção das lâminas o material foi analisado e fotografado e as imagens foram utilizadas para a realização da morfometria e análise anatômica. No caso do folíolo do feijoeiro, as mensurações realizadas foram: espessura do parênquima paliádico, espessura do parênquima lacunoso, espessura da epiderme das faces adaxial e abaxial da lâmina foliolar.

A amostragem foi constituída de porções de folíolos oriundos de duas plantas diferentes presentes no mesmo vaso, sendo cada vaso considerado uma parcela. De cada vaso foram efetuados dois cortes histológicos, onde foram realizadas as mensurações dos tecidos da lâmina foliolar. Dessa forma, sendo os tratamentos dispostos em 5 blocos, para cada

tratamento analisado foram efetuados 10 cortes histológicos. Para cada corte, foram padronizadas de 20 - 30 mensurações dependendo do parâmetro analisado (variável), totalizando 200 - 300 mensurações por tratamento em cada tempo analisado.

3.4.3.2 Aspectos anatômicos da raiz

Porções da raiz primária ou principal do feijoeiro, um centímetro abaixo da região do colo da raiz (Figura 10), foram coletadas no tempo 0 e 168 horas a.i. com o patógeno e fixadas em FAA conforme descrito no item 3.4.2.

Para a preparação das lâminas semipermanentes, foram realizadas secções transversais da raiz à mão livre e com o auxílio do micrótomo de mesa, com espessura aproximada de 13-20 μm . Os cortes da raiz seguiram o mesmo processamento e coloração já descritos para a folha, bem como a amostragem. O parâmetro analisado foi a medida do diâmetro dos vasos do xilema bem como a estrutura anatômica geral.



Figura 10. Sistema radicular do feijoeiro. A tesoura aponta a região onde foi coletado o tecido para avaliação anatômica e histológica. Foto: Eliana P. Pereira Figueira (2016).

3.4.3.3 Aspectos anatômicos do caule

Porções do caule (haste) do feijoeiro, um centímetro acima da região de inserção das raízes adventícias (Figura 11), foram coletadas no tempo de 0 horas e 168 horas a.i. com o patógeno e fixadas em FAA conforme descrito no item 3.4.2

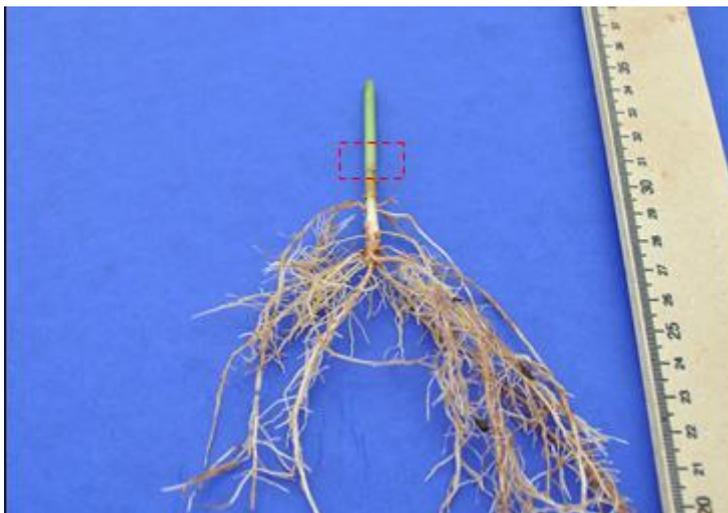


Figura 11. Sistema radicular do feijoeiro com parte do caule. A região em destaque refere-se ao local de coleta da porção do caule. Foto: Eliana P. Pereira Figueira (2016).

Para a preparação das lâminas semipermanentes foram realizadas secções transversais do caule a mão livre e com o auxílio de micrótomo de mesa, com espessura aproximada de 13-20 μm . Os cortes do caule seguiram o mesmo processamento e coloração já descritos para a folha, bem como a amostragem. As medidas realizadas foram do diâmetro dos vasos do xilema do caule e espessura do córtex.

3.4.4 Determinação dos teores de fenóis totais

Amostras de tecido vegetal, inicialmente armazenadas foram liofilizadas através do liofilizador Liotop L-107, por cerca de 72 horas. Do material liofilizado, 30 mg foram transferidos para tubo “eppendorf” com capacidade de 2 mL e homogenizadas com 1,5 mL de metanol 80%. Após 15 horas de constante agitação em incubadora Shaker, protegido da luz e em temperatura ambiente, obteve-se o extrato metanólico. O extrato foi então centrifugado a 12.000g por 5 min e o sobrenadante foi transferido para novo tubo “eppendorf” para determinação dos compostos fenólicos. O pelet (resíduo) proveniente da centrifugação foi seco e armazenado, para posterior determinação de lignina.

Os procedimentos para obtenção dos valores fenóis totais foram realizados conforme descrito por Kunh e Pascholati (2010). A absorbância foi plotada em curva padrão para fenóis totais com base em pirocatecol (Sigma-Aldrich c 9510) ($y = 0,0167x + 0,0369$), onde y é a absorbância a 725 nm e x a concentração do catecol (μg) (Figura 12). Os valores calculados a partir da curva foram expressos em mg de catecol por grama de tecido seco.

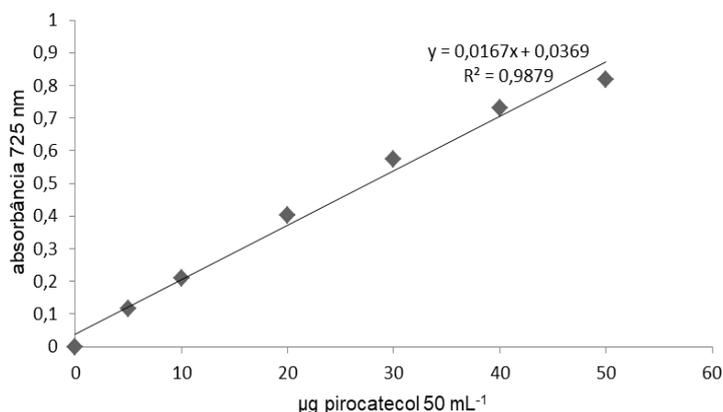


Figura 12. Curva padrão para cálculo base do teor de fenóis a partir da absorvância.

3.4.5 Determinação de teores de lignina

O resíduo obtido do extrato metanólico (pelet residual), proveniente da determinação dos compostos fenólicos conforme item 3.4.4, foi utilizado para quantificação de lignina e polímeros semelhantes. Ao resíduo foram adicionados 1,5 mL de água destilada, depois foi realizada a homogeneização e o conteúdo foi centrifugado a 12.000g por 5 minutos. Este resíduo seco foi utilizado para determinação da lignina conforme metodologia descrita por Kunh e Pascholati (2010).

A absorvância foi plotada em curva padrão para lignina com base em lignina (Sigma-Aldrich c 471003) ($y = 0,0112x + 0,0135$), onde y é a absorvância a 280 nm e x a concentração da lignina (μg) (Figura 13). Os valores calculados a partir da curva foram expressos em mg de lignina por grama de tecido seco.

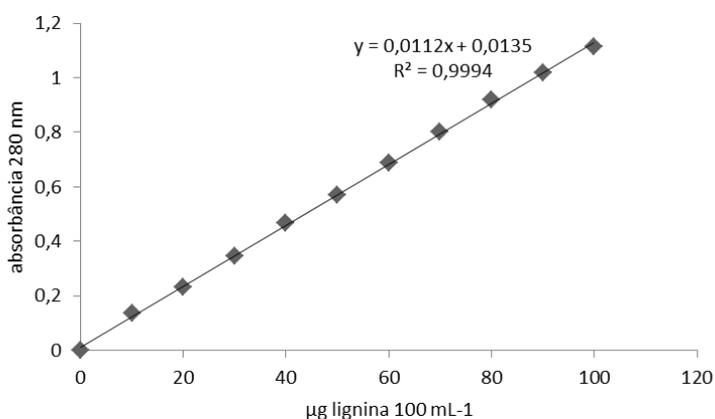


Figura 13. Curva padrão para cálculo base do teor de lignina a partir da absorvância.

3.4.6 Trocas Gasosas

As avaliações da taxa de assimilação líquida de CO₂ (A) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração foliar (E) ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e condutância estomática (g) ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), foram realizadas utilizando analisador portátil de fotossíntese por radiação infravermelha (*Infra Red Gas Analyser* – IRGA, modelo Li-6400XT, LiCor Inc., Lincoln, NE). Adotou-se como padrão fluxo de fótons fotossinteticamente ativos de $700 \pm 0,52 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e concentração ambiental de dióxido de carbono de $400 \pm 0,11 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. As avaliações foram realizadas 15 dias após a inoculação do patógeno, no estádio fenológico V4. A leitura foi realizada em folíolos centrais totalmente expandidos, expostas à luz solar direta, no período das 9 e 11 horas da manhã. A temperatura foliar máxima e a mínima durante a avaliação foi de 28,7 °C e 32,7 °C respectivamente, já a temperatura do ar interno da câmara foliar variou de 29,2 °C a 32,3 °C e a temperatura do bloco da câmara foliar variou entre a mínima de 28,4 °C a máxima de 32,2 °C. Durante a avaliação, a média da umidade relativa do ar de referência foi de 55,18%. Os dados foram registrados pelo IRGA com o coeficiente de variação abaixo de 1%.

3.5 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA MEDIADA POR *Trichoderma* spp. e FOSFITO DE POTÁSSIO EM HIPOCÓTILO DE FEIJOEIRO

O cultivo *in vivo* do hipocótilo feijoeiro foi realizado em caixas plásticas contendo areia. As sementes utilizadas do cultivar IPR-Tangará foram tratadas com os mesmos tratamentos do item 3.3 porém, somente o tratamento controle foi exposto as duas condições: na presença e ausência do patógeno. Os outros tratamentos foram condicionados somente à presença do patógeno.

A semeadura ocorreu em caixas plásticas, previamente desinfestadas contendo areia autoclavada e umedecida com água destilada estéril. Em cada bandeja foram semeadas vinte sementes de feijão cultivar IPR Tangará, sendo duas bandejas para cada tratamento. Neste caso, não houve tratamento foliar com fosfito de K como ocorreu nas plantas cultivadas em vaso. Dessa forma, o fosfito de K foi adicionado somente às sementes mediante tratamento já mencionado.

Após o início do alongamento do hipocótilo, quando o mesmo sobressaiu a camada superficial de areia, foi realizada a inoculação do patógeno. Para tanto, a suspensão contendo esporos ajustada para $1,0 \times 10^6$ conídios mL^{-1} foi aplicada pelo processo de aspersão sob

os hipocótilos com o auxílio de um borrifador. A aspersão foi realizada de forma uniforme por todo hipocótilo. Após a inoculação do patógeno, as bandejas contendo os hipocótilos foram mantidas em câmara úmida por 24 horas e em temperatura de aproximadamente 22 °C (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003). Em seguida, deixadas em temperatura ambiente para posterior coleta e coloração histoquímica.

As coletas foram realizadas nos tempos 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas após inoculação com o patógeno, observando-se a sequência de alterações morfológicas nas células sob a microgota de suspensão de conídios, mediante técnicas histoquímicas.

3.5.1 Localização de H₂O₂ *in situ*

Porções do hipocótilo cultivados e tratados conforme item 3.5 foram imersos em solução contendo 1 mg mL⁻¹ de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em água destilada e pH ajustado para 5,6 com KOH. Estes permaneceram expostos à infiltração por uma hora usando bomba a vácuo (90 mm Hg). Em seguida foram clarificados em álcool 96% e montadas em glicerina 50%. As células que mostraram acúmulo de H₂O₂ apresentaram coloração marrom (THORDAL-CHRISTENSEN et al.,1997) e foram analisados utilizando o microscópio de luz Olympus CX31. As imagens foram capturadas usando Câmera Biotika 5.0. Foram avaliados vinte campos microscópicos por tratamento em cada tempo de coleta.

3.5.2 Deposição de lignina

Os hipocótilos extraídos em cada um dos tratamentos e nos tempos mencionados no item 3.5, foram fixados em FAA (formol:ácido acético:etanol 50%, 5:5:90, v/v/v), lavados em álcool 70% e armazenados em geladeira para posterior coloração histoquímica. Para observação da deposição de Lignina porções do hipocótilo foram imersos em solução de fluoroglucinol 2% em etanol a 95% durante 2 horas (NIRANJAN RAJ et al., 2012). Após este período, foi adicionado uma gota de HCl a 35% e aquecido sobre uma chama baixa até que as nervuras atingissem a coloração vermelho-púrpura. As células foram observadas em microscópio de luz Olympus CX31 e monitoradas para a intensidade de coloração. Foram avaliados vinte campos microscópicos por tratamento.

3.5.3 Ocorrência de reação de hipersensibilidade (RH)

Porções epidérmicas do hipocótilo do feijão, tratadas e cultivadas em caixas plásticas com areia foram coletadas nos tempos já mencionados no item 3.5 e foi avaliada ocorrência de RH pela presença de manchas necróticas e observação de células mortas (NIRANJAN RAJ et al., 2012). Para isso, pequenas porções epidérmicas do hipocótilo foram imersas numa solução de vermelho neutro a 0,2% preparado por dissolução em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,6) contendo 0,5 M de sacarose. Essas porções receberão o corante e após 10 minutos, foram observados em microscópio de luz (KUMUDINI; VASANTHI; SHETTY, 2001). As células que apresentaram plasmólise são consideradas células viáveis e as que acumularam corante sem qualquer alteração osmótica foram consideradas mortas. As imagens foram capturadas usando Câmera Biotika 5.0. Foram avaliados vinte campos microscópicos por tratamento.

3.6 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E COMPONENTES DE PRODUÇÃO

Ao final de 72 dias após o plantio, foi realizada a coleta das plantas que permaneceram nos vasos após as análises anatômicas e de teor de lignina e fenóis. O material vegetal para análise dos parâmetros agronômicos foi coletado em casa de vegetação, pesado com auxílio de balança analítica e acondicionado em sacos de papel kraft, secos em estufa de circulação forçada de ar, a 60 °C, até peso constante. As variáveis analisadas foram: volume da raiz, diâmetro do caule (haste), altura da planta, número de vagens por plantas, número de grãos por vagem e massa de cem grãos. O diâmetro do caule foi obtido com o auxílio de paquímetro digital, a altura da planta com auxílio de uma régua e as massas com auxílio de balança analítica.

No caso das raízes, as mesmas foram removidas cuidadosamente do solo, lavadas, pesadas em balança analítica e então avaliado o volume de raiz com auxílio de proveta. Após foram acondicionadas em sacos de papel kraft e procedeu-se a secagem em estufa de circulação forçada de ar, a 60 °C, até peso constante, então novamente pesadas (ANDRADE et al., 2009).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados obtidos através dos ensaios realizados foram submetidos a análise de distribuição normal e homeogeneidade das variâncias pelo teste de Lilliefords. Após os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) pelo teste F e comparação de médias pelo teste Tukey, com níveis de 5% de significância. Para todas as análises utilizou-se o programa estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

Os dois experimentos de severidade foram analisados por análise conjunta, através do software SAS (SAS Institute, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CULTIVO DO FEIJOEIRO INDUZIDO POR *Trichoderma* spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

As plantas de feijoeiro, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os indutores: *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K; e o controle água, foram avaliadas quanto uma série de parâmetros cujos resultados estão apresentados nos subitens abaixo. Cabe destacar que além dos tratamentos, as plantas foram analisadas sob duas condições, presença e ausência de *C. lindemuthianum*, constituindo o esquema fatorial proposto no presente trabalho.

4.1.1 Severidade da doença

Para a avaliação da severidade da antracnose, as plantas de feijoeiro cultivadas em casa de vegetação foram avaliadas periodicamente, conforme descrito no item 3.4.1., obtendo-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

As médias da AACPD, obtidas nos dois experimentos realizados, foram submetidas à análise conjunta e os resultados apresentados na Tabela 2. Conforme observado, houve significância quanto à severidade da antracnose no feijoeiro, onde todos os tratamentos testados reduziram as médias da AACPD, diferindo estatisticamente do tratamento controle.

Tabela 2. Análise conjunta da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para antracnose no feijoeiro comum, cultivados em casa de vegetação e tratados com *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* + fosfito de K, *Trichoderma virens* + fosfito de K e o controle água.

Tratamentos	AACPD
<i>T. harzianum</i>	30,35 b
<i>T. virens</i>	23,99 bc
Fosfito de K	15,15 cd
<i>T. harzianum</i> +fosfito de K	18,68 bcd
<i>T. virens</i> +fosfito de K	8,20 d
Controle	53,00 a
Média Geral	24,89
CV (%)	38,03

*Médias seguidas pela mesma letra, dentro da mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Dentre os tratamentos testados, a menor média da AACPD observada foi para o tratamento com *T. virens* + fosfito de K, diferindo dos tratamentos onde *T. virens* e *T. harzianum* foram aplicados isoladamente. Conforme observado, a associação do isolado de *Trichoderma* (TM4) com o fosfito de K conduziu à um controle mais eficiente da antracnose no feijoeiro.

O uso de *Trichoderma* spp. tem sido relatado por diversos autores como excelente indutor de resistência em plantas à fitopatógenos. Pedro et al. (2012) utilizando espécies *T. harzianum*, *T. strigosum* e *T. theobromicola* obtiveram eficiência na proteção do feijoeiro contra a antracnose, causada por *C. lindemuthianum*, onde observaram a redução de até 97,54% na severidade da doença. No presente trabalho, o uso de *Trichoderma* spp. como tratamento isolado, embora tenha reduzido a severidade da doença, não foi o mais eficiente se comparado aos outros tratamentos realizados.

Essa diferença pode estar relacionada a capacidade que determinados isolados de *Trichoderma* spp. têm em estabelecer associação com a planta e ativar seus mecanismos de defesa. Walters, Ratsep e Havis (2013), atribuem o efeito indutor de resistência por *Trichoderma* spp. como uma característica genótipo-dependente, tanto da cultura quanto os isolados de *Trichoderma*. Singh et al. (2018), afirmam que *Trichoderma* spp. ao colonizar as raízes do feijoeiro, estabelece comunicação química e sistêmica sendo capaz de ativar vias metabólicas como do AS, AJ/ET, a partir da indução de resistência sistêmica. Assim, existe uma comunicação cruzada entre SA, JA/ET e alguns hormônios vegetais que induzem as diferentes respostas dependendo das características do eliciador.

Quanto ao uso de fosfito de K como tratamento, embora não tenha apresentado a menor média da AACPD, a redução na severidade mediante a presença do fosfito no presente trabalho, seja isolado ou associado ao *Trichoderma* spp., é notória. Estudos recentes tem demonstrado a eficiência do fosfito na redução da severidade e no controle de doenças. Gadaga et al. (2017), utilizando fosfito de K e Mn, obtiveram a menor média na área abaixo da curva de progresso da antracnose em plantas de feijoeiro. Silva J. et al. (2015) relataram que o fosfito de K reduziu a gravidade da antracnose em feijoeiro em 60,4%, assim como a inibição do crescimento micelial e emissão do tubo germinativo de *C. lindemuthianum* por sua ação direta. Recentemente Costa et al. (2017), obtiveram resultados semelhantes, onde formulações de fosfito de K reduziram a severidade da antracnose do feijoeiro em 55,6%, sendo conjuntamente observado o aumento da atividade de várias enzimas de defesa, bem como de lignina e compostos fenólicos.

Neste mesmo trabalho, os autores detectaram a presença de resíduos de fosfito nos tecidos foliares nas concentrações de 1 e 3 mm sete dias após a pulverização. Essas mesmas concentrações de fosfitos reduziram crescimento micelial de *C. lindemuthianum in vitro*, sugerindo que o tratamento com fosfito levou ao controle da antracnose do feijoeiro de duas maneiras, atuando diretamente sobre *C. lindemuthianum* e induzindo respostas de defesa na planta.

Quanto ao modo de ação do fosfito, apesar de complexo e ainda pouco conhecido, vários estudos têm sugerido que o fosfito age basicamente de duas formas: diretamente sobre o patógeno pela inibição do seu crescimento, como resultado de fosfito acumulado no tecido vegetal; indiretamente pela indução de resistência nas plantas (COSTA et al., 2017; DANIEL; GUEST, 2006). A aplicação do fosfito em plantas está associado a vários mecanismos como aumento da transcrição de genes envolvidos nas vias de sinalização do ácido salicílico (AS) e do ácido jasmônico (AJ)/etileno (ET) (ESHRAHGI et al., 2011); a ativação de proteínas de defesa, acúmulo de fitoalexinas (MELO et al., 2017; GÓMEZ-MERINO; TREJO-TÉLLEZ, 2015), inibidores de hidrolase do patógeno e até mesmo o fortalecimento das barreiras teciduais naturais, através da produção aumentada de lignina (DALIO et al., 2012; ESHRAHGI et al., 2011).

Por outro lado, o fosfito de K, por ser uma molécula derivada da união de dois compostos, o potássio também pode interferir de forma positiva na indução. Dordas (2008) ressalva que o suprimento de potássio nas plantas pode levar ao aumento da resistência das plantas à doença, isto tem sido atribuído a vários mecanismos de ação do potássio, como por exemplo, sua atividade como cofator enzimático, na síntese de proteínas e na diminuição da permeabilidade celular.

Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo mostram que a associação do fosfito de K ao *Trichoderma* pode ter conduzido a um efeito aditivo, incrementando a resposta da planta ao fitopatógeno e reduzindo a severidade da doença no feijoeiro (Figura 14). Esse efeito aditivo pode ter sido alcançado pelas diversas formas de controle fornecidas pelos indutores, seja pela ação direta através do acúmulo residual de fosfito de K nos tecidos vegetais ou pela a modulação entre as vias de sinalização dependente do AS ou JA/ET de ambos indutores, o que geraria uma resposta rápida e intensa.

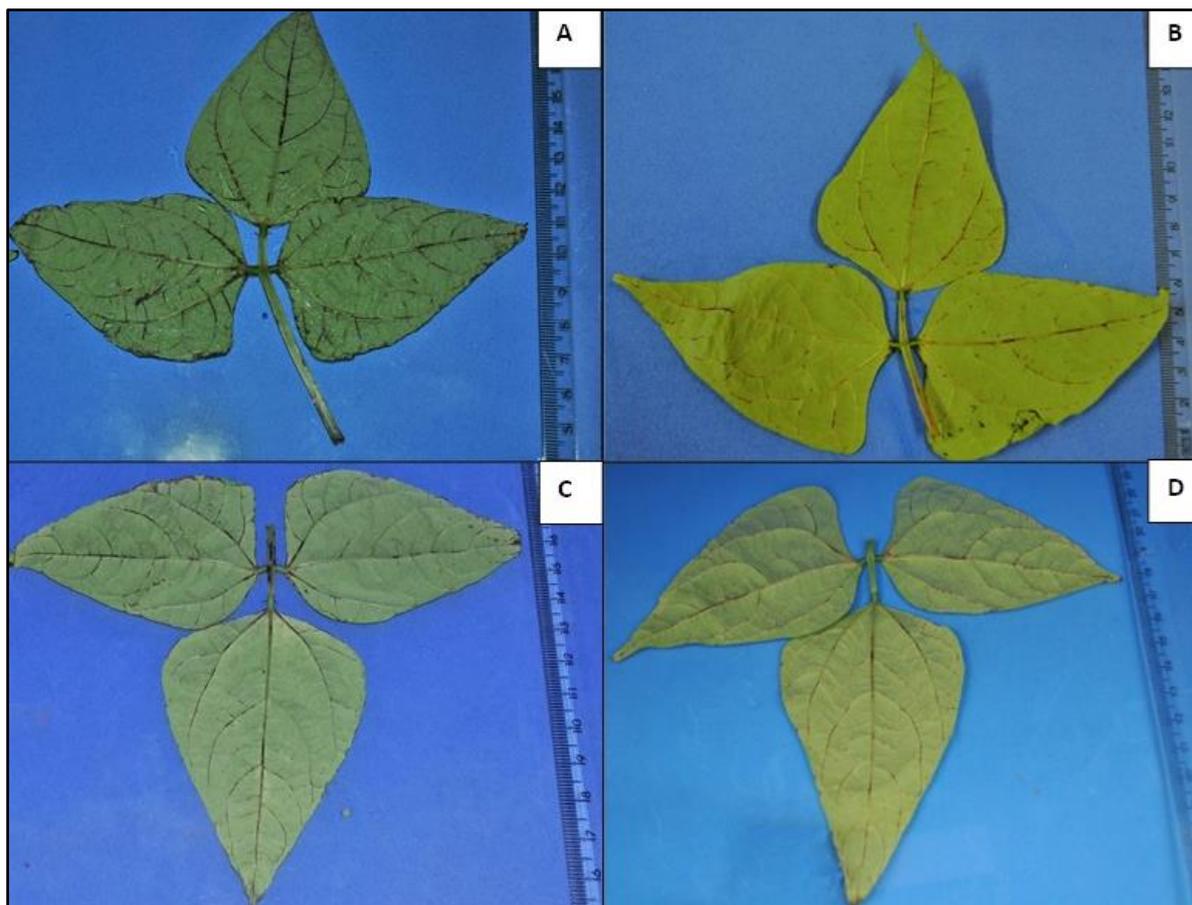


Figura 14. Folhas de feijoeiro, cultivar IPR-Tangará, com sintomas típicos de antracnose. A figura mostra a diferença na severidade da doença mediante os tratamentos indutores. Em **A**: Tratamento controle; **B**: Tratamento com *Trichoderma harzianum* + fosfito de K; **C**: Tratamento com Fosfito de K; **D**: Tratamento com *Trichoderma virens* + fosfito de K.

4.1.2 Análises morfoanatômicas

4.1.2.1 Aspectos anatômicos da folha

Através da análise da anatomia e pela morfometria, realizadas a partir dos cortes transversais do folíolo central do feijoeiro, foram observadas alterações na espessura dos diferentes tecidos que compõe a lâmina foliolar (Tabelas 3, 4 e 5). Essas alterações ocorreram para os diferentes tratamentos indutores testados (descritos no item 3.3), bem como para o fator ausência/presença do patógeno.

No parênquima paliçádico, um dos tecidos que compõe a lâmina foliolar, foi observado um aumento em sua espessura nas plantas de feijoeiro que receberam os tratamentos *T. virens* + fosfito de K, *T. harzianum* + fosfito de K e *T. virens*, quando

comparados ao tratamento controle (Tabela 3). Os tratamentos com *T. virens* + fosfito de K e *T. harzianum* + fosfito de K foram os que promoveram o maior aumento de espessura para essa variável, nos dois tempos analisados, não havendo diferença estatística entre os dois tratamentos.

Tabela 3. Espessura do parênquima paliçádico (μm) do folíolo central de plantas de feijoeiro, no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Tempo 1 ¹	Tempo 2 ²	
		Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	47,34 ab	50,17 cd A	46,57 c A
<i>T. virens</i>	47,90 ab	53,89 bc A	58,89 b A
Fosfito de K	45,70 ab	50,75 cd A	53,64 bc A
<i>T. harzianum</i> +fosfito de K	46,67 ab	65,80 a B	72,05 a A
<i>T. virens</i> +fosfito de K	52,80 a	59,99 ab B	73,09 a A
Controle	44,07 b	46,70 d A	47,87 c A
Médias Gerais	47,42	54,55	58,68
CV (%)	16,50	10,51	

1 - Coleta realizada logo após a inoculação do patógeno – Tempo 0 horas a.i..

2 - Coleta realizada sete dias após a inoculação do patógeno – Tempo 168 horas a.i.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) e maiúscula dentro da mesma linha (entre ausência e presença), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O tratamento com *T. virens* também promoveu o aumento na espessura do parênquima paliçádico, porém se comparado aos tratamentos acima mencionados, foi o que apresentou menor efeito sobre a variável.

Na presença do patógeno, o aumento na espessura do parênquima paliçádico para os tratamentos com *T. virens* + fosfito de K e *T. harzianum* + fosfito de K, foi ainda mais expressivo, caracterizando uma resposta rápida e de magnitude aumentada. Neste caso, a presença do patógeno constituiu um estímulo para a resposta em potencial.

Esses resultados mostram que as plantas de feijoeiro tratadas com os indutores descritos, possivelmente desenvolveram um estado de sensibilização onde, o ataque subsequente pelo patógeno promoveu uma ativação mais rápida e eficiente das respostas de defesa do feijoeiro, promovendo o aumento na espessura do parênquima paliçádico. Este estado de sensibilização é conhecido como *priming*. De acordo com Conrath (2011), o estado de *priming* é uma alternativa à ativação da resistência induzida de longa duração e seus

mecanismos baseiam-se em mudanças epigenéticas ou no armazenamento de sinais químicos intracelulares, entre outros.

Mauch-Mani et al. (2017) afirmam que o estado de *priming* pode ser alcançado pelo tratamento com microrganismos benéficos ou por compostos químicos sintéticos ou naturais. O ergosterol, contido nas membranas celulares dos fungos do gênero *Trichoderma*, é um exemplo clássico de eliciador que induz o estado de *priming* nas plantas. Já Massoud et al. (2012) estudando a indução em *Arabidopsis*, relatam que o *priming* é uma das respostas induzidas pelo fosfito.

Quanto à organização tecidual não foram observados alterações, sendo que o aumento da espessura do parênquima paliçádico ocorreu mediante alongamento celular, já que não foi observado aumento no número de camadas celulares (Figura 15). Apesar dos estudos envolvendo alterações anatômicas em plantas tratadas com indutores serem escassos, Mussury et al. (2012), estudando alterações de folhas de soja, inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* e tratadas com extratos vegetais, também observaram o aumento da espessura deste tecido, no patossistema relatado. De acordo com os autores, o aumento na espessura do parênquima paliçádico, bem como da epiderme, ocorreu mediante alongamento celular resultante da deposição de produtos de defesa. Os autores afirmam que essas alterações constituem um dos mecanismos de resistência das plantas contra o patógeno.

Silva, Alquini e Cavallet (2005) afirmam que cultivares da mesma espécie podem apresentar densidade, compactação e espessura da parede das células do parênquima paliçádico diferenciadas, resultando em diferenças quanto à resistência aos microrganismos. Segundo os autores, cultivares com maior número e tamanho de células, maior índice de compactação e/ou células com paredes mais espessas têm demonstrado serem mais resistentes aos fitopatógenos.

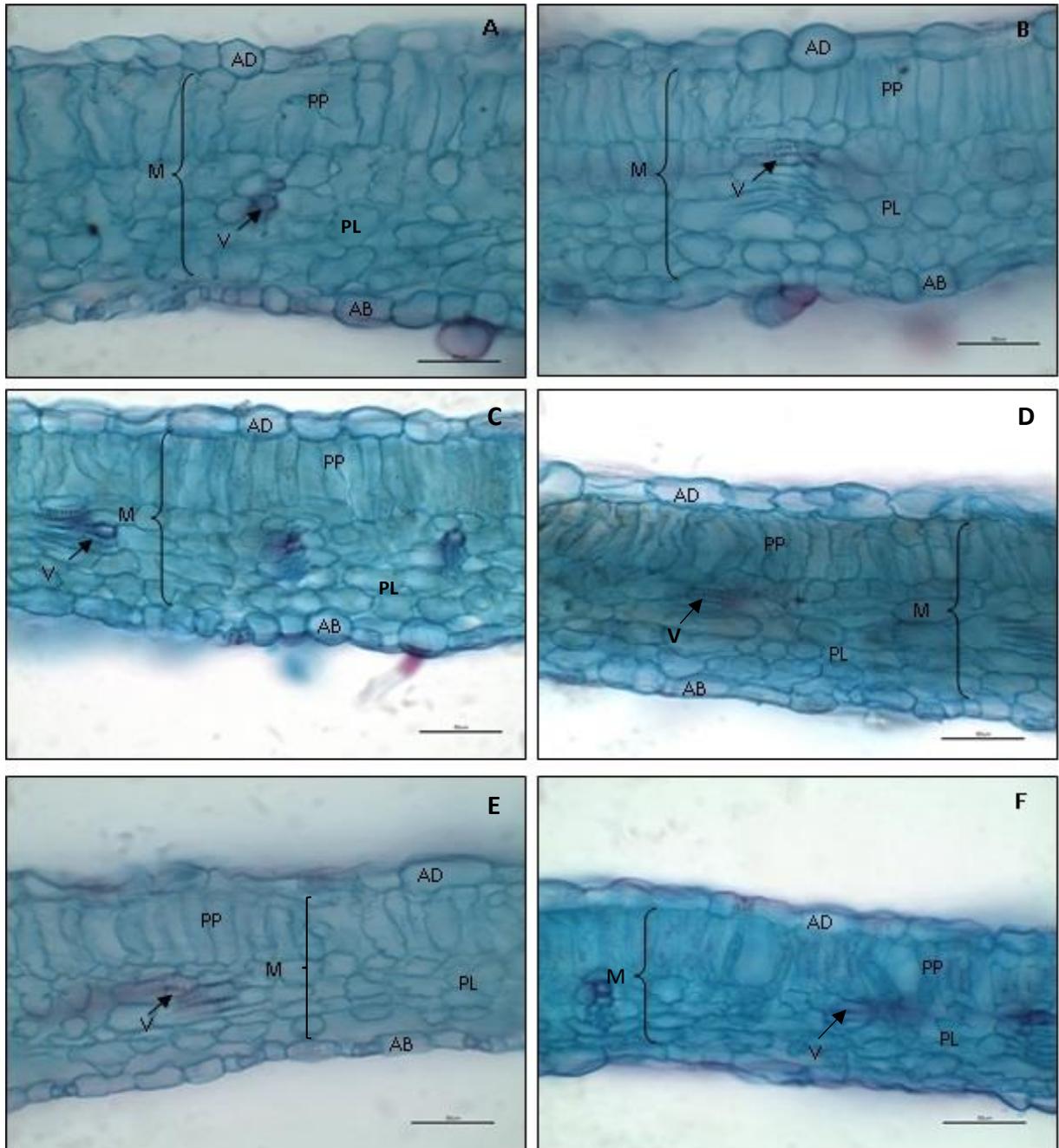


Figura 15. Secções transversais da região mediana do folíolo central de *Phaseolus vulgaris* no estágio V4, submetido aos diferentes tratamentos indutores e ao tratamento controle. **A:** Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam o tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K; **B:** Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam o tratamento com *T. virens* + fosfito de K; **C:** Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam o tratamento com *T. virens*; **D:** Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam os tratamentos com fosfito de K; **E e F:** Corte transversal de folíolos de feijoeiro que receberam o tratamento controle, **E:** ausência do Patógeno, **F:** presença do patógeno. PP: parênquima paliádico; PL: parênquima lacunoso; AD: epiderme adaxial; AB: epiderme abaxial; M: mesófilo; V: vasos condutores. Coloração: azul de alcian e safranina.

Outro tecido foliolar que apresentou diferença em sua espessura, mediante os tratamentos indutores realizados, foi o parênquima lacunoso (Tabela 4). Para este tecido, os tratamentos que promoveram o aumento na espessura foram praticamente os mesmos observados para o parênquima paliçádico, com adição do tratamento fosfito de K que também promoveu efeito para esta variável.

Como para o parênquima paliçádico, o aumento ocorreu mesmo antes da exposição ao patógeno e permaneceu com essa tendência quando a planta foi exposta ao *C. lindemuthianum*, diferenciando estatisticamente o fator ausência/presença. Cabe destacar que novamente os tratamentos com *T. virens* + fosfito de K e *T. harzianum* + fosfito de K promoveram o aumento da espessura na presença do patógeno, conforme observado para o parênquima paliçádico.

Tabela 4. Espessura do parênquima lacunoso (μm) do folíolo central de plantas de feijoeiro, no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Tempo 1 ¹	Tempo 2 ²	
		Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	75,89 ab	76,84 bc A	81,76 cd A
<i>T. virens</i>	79,27 ab	84,38 ab A	92,01 bc A
Fosfito de K	84,31 a	96,05 a A	103,66 ab A
<i>T. harzianum</i> +fosfito de K	83,31 a	94,11 a B	104,16 a A
<i>T. virens</i> +fosfito de K	80,31 ab	91,72 a B	103,77 ab A
Controle	73,50 b	72,00 c A	78,31 d A
Médias Gerais	79,43	85,85	93,94
CV (%)	13,07		10,13

1 - Coleta realizada logo após a inoculação do patógeno – Tempo 0 horas a.i.

2 - Coleta realizada sete dias após a inoculação do patógeno – Tempo 168 horas a.i.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) e maiúscula dentro da mesma linha (entre ausência e presença), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

De forma geral, houve o aumento na espessura do mesófilo quando o feijoeiro recebeu os tratamentos com *T. harzianum* + fosfito de K, *T. virens* + fosfito de K, fosfito de K e *T. virens* (Figura 15). Resultados semelhantes foram obtidos por Moreira (2014) utilizando diferentes isolados de *Trichoderma*, onde a autora observou o aumento significativo do mesófilo de folhas de feijoeiro, atribuindo este aumento à interação planta-*Trichoderma*. De acordo com a autora, aumento na espessura do mesófilo pode ter relação com uma série de mecanismos da planta. Contudo, a autora não realizou o desafio com patógenos.

No presente trabalho, além do aumento do mesófilo da lamina foliolar do feijoeiro, também foi observado um aumento na espessura da epiderme abaxial e adaxial, mediante os diferentes tratamentos indutores utilizados, contudo, não houve interação entre os fatores para estas variáveis (Tabela 5).

Tabela 5. Espessura da epiderme abaxial e adaxial (μm) do folíolo central de plantas de feijoeiro no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Epiderme abaxial				Epiderme adaxial			
	Tempo (1) ¹	Tempo (2) ²		Tempo (1) ¹	Tempo (2) ²			
		Ausência	Presença		Ausência	Presença		
<i>T. harzianum</i>	10,94 b	11,75 b A	12,07 b A	13,37 c	12,83 b A	14,33 c A		
<i>T. virens</i>	12,58 ab	12,99 ab B	17,23 a A	15,36 bc	19,20 a A	21,71 a A		
Fosfito de K	11,57 b	13,61 ab A	11,18 b A	14,53 bc	17,09 ab A	15,40 bc A		
<i>T. harzianum</i> + Fosfito de K	13,61 ab	14,12 ab A	12,09 b A	17,76 ab	16,10 ab A	15,77 bc A		
<i>T. virens</i> + Fosfito de K	15,19 a	15,77 a A	17,96 a A	18,71 a	19,05 a A	19,33 ab A		
Controle	11,23 b	10,34 b A	10,72 b A	13,27 c	13,64 b A	11,73 c A		
Médias Gerais	12,53	13,09	13,54	15,50	16,32	16,37		
CV (%)	26,25	23,03		23,34	21,49			

1 - Coleta realizada logo após a inoculação do patógeno – Tempo 0 horas a.i.

2 - Coleta realizada sete dias após a inoculação do patógeno – Tempo 168 horas a.i.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) e maiúscula dentro da mesma linha (entre ausência e presença), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Conforme demonstrado na Tabela 5, a epiderme abaxial sofreu aumento na sua espessura nos dois tempos analisados. No tempo de 0 hora a.i. o aumento ocorreu nas plantas que receberam os tratamentos com *T. virens* + fosfito de K e *T. virens*. O aumento induzido pelo tratamento com *T. virens* + fosfito de K ocorreu de forma independente da presença do patógeno e também foi observado no tempo de 168 horas a.i., sendo a maior espessura observada. Já o tratamento com *T. virens*, foi mais expressivo no tempo de 168 horas, quando as plantas foram expostas ao patógeno desafiador, caracterizando uma resposta rápida e dependente da interação com o patógeno (*priming*).

Na epiderme adaxial, o aumento na espessura ocorreu de forma semelhante ao observado para a abaxial, onde os tratamentos com *T. virens* e *T. virens* + fosfito de K foram

os que apresentaram a maior espessura quando comparado ao controle. Porém, no caso da epiderme adaxial, o aumento ocorreu de forma independente do patógeno em todos os tratamentos testados. Resultados semelhantes foram obtidos por Mussury et al. (2012) onde observaram o aumento na espessura das epidermes da folha de soja inoculadas com *Phakopsora pachyrhizi* e tratadas com extratos vegetais. Segundo os autores, alterações na espessura da lâmina foliar constitui um mecanismo de defesa da planta, já que para uma gama de patógenos, o processo de infecção inicia-se pela folha.

Embora ambas as epidermes tenham apresentado aumento em sua espessura, no caso da epiderme abaxial houve diferença significativa para o fator presença/ausência do patógeno para o tratamento com *T. virens*, o que caracteriza uma possível tentativa de impedir a entrada do patógeno. Cabe destacar que a face abaxial das folhas do feijoeiro, além de constituir um ambiente favorável ao desenvolvimento do patógeno (pois a interferência de fatores como radiação solar, ressecamento, vento entre outros, neste microambiente é menor), apresenta maior número de estômatos quando comparadas à adaxial (VOLTAN et al., 1991). Dessa forma, o estômato sendo uma abertura natural, constitui um possível local de entrada para determinados patógenos (STANGARLIN et al., 2011). Apesar do mecanismo de penetração por *C. lindemuthianum* frequentemente ocorrer através da formação do apressório (penetração direta), Jeffries et al. (1990) afirmam que determinadas espécies de *Colletotrichum* podem penetrar na planta hospedeira através de feridas ou aberturas naturais como os estômatos, o que justificaria o aumento da espessura da epiderme do feijoeiro no presente trabalho.

Na análise geral dos resultados obtidos para os tecidos que formam a lâmina foliolar do feijoeiro, foi observado um aumento na espessura do folíolo do feijoeiro quando tratado pelos indutores *Trichoderma* e fosfito de K, principalmente quando estes indutores foram combinados como tratamento. Conforme observado, esse aumento está associado à interação entre os indutores testados e a planta de feijoeiro, já que o mesmo ocorreu antes da exposição ao patógeno. Essas alterações promovidas pelos indutores configuram-se como uma forma sensibilização das plantas de feijoeiro, onde a planta se prepara para se defender de uma possível infecção futura.

O aumento observado na espessura dos tecidos foliolares provavelmente foi decorrente do alongamento celular associado ao espessamento das paredes celulares, e no caso do parênquima lacunoso, além do aumento no volume celular pode ter ocorrido aumento nos espaços intercelulares, tendo em vista que não foi observado aumento no número de camadas celulares. Resultados semelhantes foram obtidos por Farouk e Osman (2011),

observando o efeito dos eliciadores AS e metil jasmonato (MeJA) no crescimento e rendimento do feijoeiro atacados ou não por ácaros, verificando que a aplicação dos indutores levou ao aumento da espessura da lâmina foliolar com aumento na espessura do parênquima paliçádico, parênquima lacunoso, epidermes, bem como a dimensão dos feixes vasculares, quando comparação com plantas saudáveis e infestadas que não receberam os tratamentos.

Segundo os autores, os resultados indicam que os eliciadores podem ter atuado com um efeito estimulador na produção de metabólitos secundários especialmente o AS, estimulando o acúmulo de compostos fenólicos solúveis nas folhas de feijoeiro. Os resultados também provaram que a aplicação de ambos os elicitores aumentou significativamente o conteúdo de íons como N, P, K e Ca na parte aérea, refletindo no aumento do crescimento das plantas e na resistência das plantas devido ao papel dos íons no metabolismo, promovendo o desenvolvimento de paredes externas, tornando-as mais espessas e atuando na estabilidade da membrana vegetal das células epidérmicas, prevenindo assim o ataque de pragas.

Dessa forma, no presente trabalho, o aumento na espessura da lâmina foliolar do feijoeiro pode ter relação com vários eventos. Entre eles destacam-se os mecanismos de defesa, onde o aumento da espessura dos tecidos podem ter ocorrido mediante acúmulo de substâncias de defesa (MUSSURY et al., 2012), ou mesmo o acúmulo de fosfito de K nas folhas, já comprovados em outros trabalhos (COSTA et al., 2017; MUSSURY et al., 2012; SILVA et al., 2015); e/ou por ações do metabolismo primário, como a fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2009), já que alguns autores (GOTOH et al., 2018; KLICH, 2000; SMITH et al., 1997), afirmam que o aumento no volume de células do mesófilo pode resultar em um aumento da eficiência fotossintética, pois além de uma maior fixação de CO₂, esse aumento pode ter uma função diferenciada na captação da luz (TAIZ; ZEIGER, 2009). Dessa forma, o aumento da eficiência fotossintética geraria um balanço positivo de carbono mantendo a homeostase, principalmente quando a planta é exposta ao stress, o que de certa forma, fornece suporte para as diferentes respostas metabólicas das plantas. De acordo com Mazid, Khan e Mohammad (2011) a habilidade das plantas de conter a infecção por patógenos depende do quão rápido é a produção dos metabólitos secundários, o que, pelo menos em parte, depende diretamente da agilidade de mobilização de fontes de carbono para o local da infecção.

Apesar do aumento na espessura dos tecidos analisados, não foi observado no presente trabalho, alterações na organização estrutural dos tecidos quando comparado ao controle. Dessa forma, a epiderme manteve-se uniseriada e apresentando células das faces adaxial e abaxial com formas e tamanhos variados; o mesófilo manteve a organização

dorsiventral, sendo o parênquima paliçádico constituído por uma camada de células e o parênquima lacunoso variando de quatro à cinco camadas (Figura 15).

Embora não se tenha observado alterações na organização tecidual do folíolo nos tratamentos testados, em determinados pontos da estrutura foliolar foi observado uma leve constrição da epiderme abaxial e do parênquima lacunoso com coloração avermelhada obtida pela reação positiva com a safranina pela coloração histoquímica (Figura 16). A coloração com safranina permite verificar-se se o material vegetal apresenta ou não lignificação. Luque, Sousa e Kraus (1996) afirmam que a dupla coloração histoquímica de azul de alcian com a safranina permite a diferenciação com base na afinidade dos corantes por compostos químicos presentes em maior quantidade nos tecidos. Dessa forma, o azul de alcian apresenta afinidade com a celulose e é incorporado dentro das fibras somente na ausência de lignina, ao passo que a safranina reage com a lignina independente da presença de celulose. Com base na afinidade descrita, acredita-se que os pontos observados sejam regiões onde o patógeno iniciou a penetração nos tecidos do folíolo e a planta reagiu com uma maior lignificação. De acordo com Mott et al. (2014), a planta se prepara para lutar contra a invasão e responde ao detectar um ataque. Uma vez que o patógeno foi detectado pelo sistema imune, a planta responde com moléculas que limitam o seu crescimento e/ou preparam partes distais da planta para a infecção futura através da deposição de substâncias em suas paredes celulares.

Dessa forma, por ser um órgão primário de síntese, a folha é o órgão que apresenta maior plasticidade e o que mais responde, estruturalmente, ao estresse sofrido pela planta. Através do aumento da espessura dos folíolos pode-se inferir que as plantas podem responder ao estresse sofrido de várias formas, seja por alterações químicas ou estruturais visando a formação de barreiras à entrada dos fitopatógenos (COSTA et al., 2017; MUSSURY et al., 2012; SILVA et al., 2015).

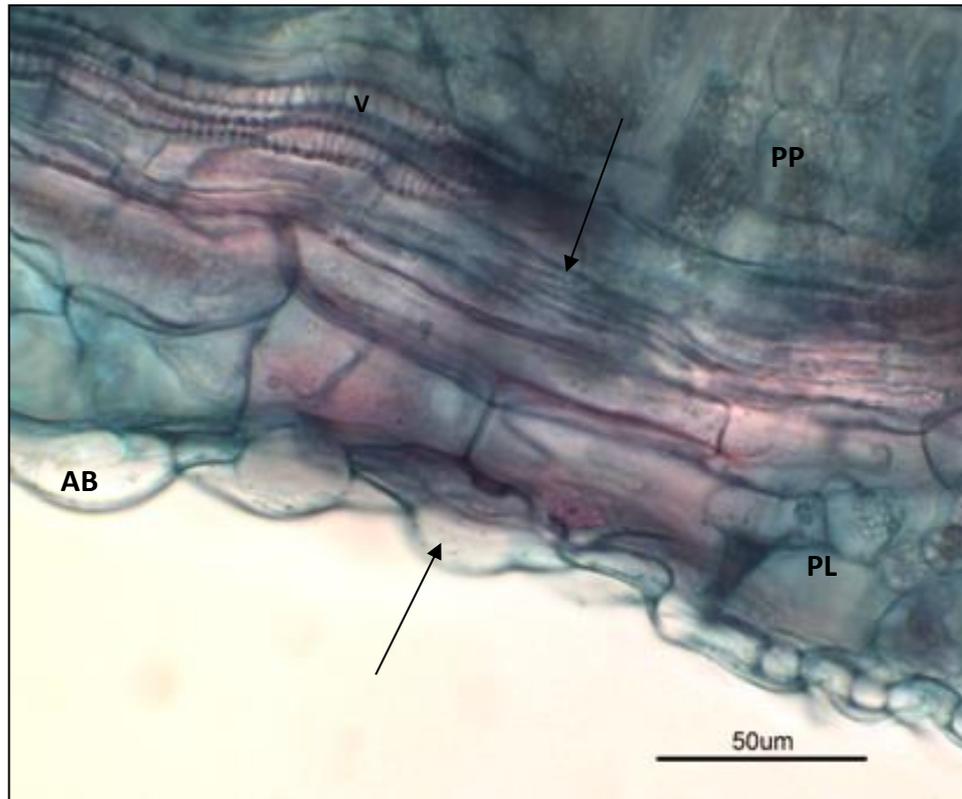


Figura 16. Detalhe da lâmina foliar, evidenciando a porção inferior do mesófilo e a epideme abaxial. As setas indicam a região do parenquima lacunoso onde é observada leve constrição de coloração avermelhada no tecido. PP: parênquima paliçádico; PL: parênquima lacunoso; AB: epiderme abaxial; M: mesófilo; V: vasos condutores. Coloração: azul de alcian e safranina.

4.1.2.2 Aspectos anatômicos da raiz

Nas análises morfométricas realizadas nas porções das raízes primárias do feijoeiro, foi possível observar alterações no diâmetro dos vasos do xilema em plantas tratadas com os indutores propostos (Tabela 6). Não houve interação significativa entre os fatores presença e ausência do patógeno para esta variável.

No tempo de 0 horas a.i., o tratamento com *T. virens* foi o que mais elevou o diâmetro do xilema, porém foi estatisticamente semelhante aos demais tratamentos, diferindo somente do tratamento controle. O mesmo tratamento também promoveu o aumento do diâmetro, no tempo de 168 horas a.i., porém na presença do patógeno não manteve a diferença estatística com relação aos outros tratamentos.

No tempo de 168 horas a.i., o tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K, foi semelhante estatisticamente ao *T. virens*, porém após a exposição ao patógeno, *T. harzianum* + fosfito de K foi o único a manter a diferença estatística. Os tratamentos *T. virens* + fosfito

de K e fosfito de K também apresentaram diferença com relação ao controle no tempo analisado, na ausência do patógeno.

Tabela 6. Diâmetro dos vasos do xilema (μm) da raiz primária de plantas de feijoeiro, no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamentos	Tempo (1) ¹		Tempo (2) ²	
			Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	33,26	ab	34,80 bc A	32,91 ab A
<i>T. virens</i>	36,14	a	41,37 a A	36,35 ab A
Fosfito de K	32,55	ab	37,91 ab A	35,04 ab A
<i>T. harzianum</i> +fosfito de K	33,63	ab	41,51 a A	40,04 a A
<i>T. virens</i> +fosfito de K	32,81	ab	40,55 ab A	39,23 ab A
Controle	29,20	b	30,24 c A	29,20 b A
Médias Gerais	32,93		37,73	35,46
CV (%)	21,93		23,85	

1 - Coleta realizada logo após a inoculação do patógeno - Tempo 0 horas a.i.

2 - Coleta realizada sete dias após a inoculação do patógeno - Tempo 168 horas a.i.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) e maiúscula dentro da mesma linha (entre ausência e presença), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Quanto à organização anatômica, a epiderme da raiz manteve-se uniestratificada com células de tamanhos irregulares; o córtex caracterizou-se pela presença de várias camadas de células, delimitada por poucos e pequenos espaços intercelulares ocupando a maior parte da raiz conforme descrito por Moraes-Dallaqua, Beltrati e Rodrigues (2000) (Figura 17).

A maioria das plantas que receberam os tratamentos com *T. harzianum* + fosfito *T. virens*, *T. virens*+ fosfito de K e fosfito de K, apresentaram cilindro vascular em crescimento secundário mais desenvolvido, enquanto que o controle apresentou crescimento secundário incipiente (Figura 17), com cilindro vascular radial do tipo tetarca, intercalado por quatro grupos de floema.

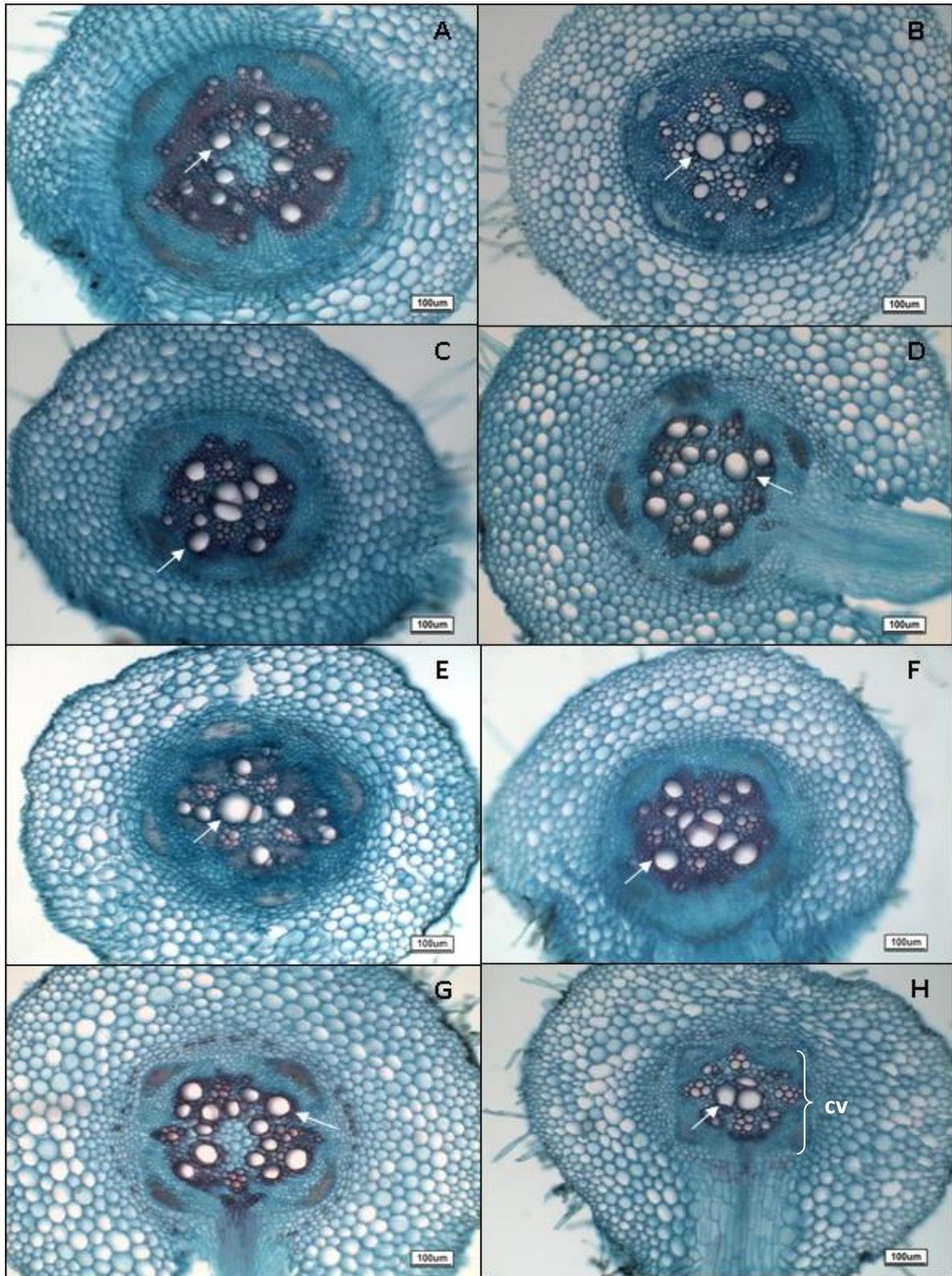


Figura 17. Secções transversais da raiz primária de *Phaseolus vulgaris* no estágio V4, submetido aos diferentes tratamentos indutores. **A e B:** Tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K; **C e D:** Tratamento com *T. virens*; **E e F:** Tratamento com *T. virens* + fosfito de K; **G:** Tratamento com fosfito de K; **H:** tratamento controle. Cilindro vascular (CV); Setas indicam os vasos do xilema. Coloração: safranina e azul de alcian.

Esse desenvolvimento acelerado evidenciando o início do crescimento secundário do cilindro vascular pode ter sido promovido pela interação da planta aos isolados de *Trichoderma* spp. Moreira (2014) avaliando a atividade de isolados de *Trichoderma* spp. no crescimento do feijoeiro, também observou o crescimento secundário mais desenvolvido em plantas de feijoeiro no estágio V4. A autora sugere que *Trichoderma* spp. influencia no desenvolvimento da estrutura secundária por ser capaz de produzir substâncias análogas à auxina. Já Singh et al. (2018) relatam que espécies de *Trichoderma* spp. são capazes de produzir auxinas como ácido indol acético (IAA), 3-indol- acetaldeído (IAAld) e indol-3-etanol (IET), atuando no crescimento e desenvolvimento das raízes das plantas.

Estudos mostram que *Trichoderma* acelera processos de desenvolvimento da estrutura secundária no cilindro vascular e, principalmente, o xilema secundário cujas células possuem paredes lignificadas. A lignina confere suporte mecânico às plantas e por ser hidrofóbica contribui para evitar a perda de água, além de apresentar importante função de defesa contra patógenos e outras formas de estresse. Observações feitas por Harman et al., (2012) relataram que a interação do *Trichoderma* spp. com plantas leva a produção de uma proteína rica em cisteína pelo *Trichoderma* spp. capaz de mudar a arquitetura da raiz, a resistência à patógenos e a eficiência fotossintética da planta.

Em contra partida, o fosfito também pode atuar como um bioestimulante e melhorar o rendimento, a qualidade e a resistência da planta ao estresse. Contudo seu mecanismo de ação na planta ainda não está claro (ACHARY et al., 2017). Tambascio et al. (2014) estudando o desenvolvimento de plantas de batata, observaram que a aplicação de fosfito de K reduziu o intervalo de duração entre o plantio e a emergência de plantas e aumentou a área foliar, o peso seco bem como o conteúdo de clorofila. Embora não se conheça os detalhes, estudos apontam que o fosfito pode interferir positivamente no metabolismo primário (metabolismo dos polissacarídeos, dos lipídios e dos aminoácidos) e secundário, principalmente em processos relacionados ao desenvolvimento, à diferenciação de tecidos, formação de parede celular e a ativação dos processos de defesa.

Dessa forma, considerando a estrutura anatômica da raiz de feijoeiro tratado com indutores e os trabalhos relatados, sugere-se uma contribuição efetiva dos isolados de *Trichoderma* na condução do desenvolvimento secundário e mudança na estrutura da raiz, mas não descarta a ação do fosfito como bioestimulante e indutor de defesas nas plantas de feijoeiro, já que mais uma vez o tratamento que apresentou maior influência foi aquele em que o isolado de *Trichoderma* esteve associado ao fosfito de K. Sugere-se ainda que o avanço

no desenvolvimento da raiz seja uma forma de proteger a planta, já que os tecidos primários são menos lignificados.

4.1.2.3 Aspectos anatômicos do caule

Os dados referentes aos valores médios do diâmetro do xilema do caule do feijoeiro, tratados mediante indutores já descritos, estão apresentados na Tabela 7. Para os dados analisados, não houve interação entre tratamento e o fator ausência/presença do patógeno. Contudo, houve diferença significativa para os tratamentos testados e para o fator ausência/presença do patógeno, sem haver a interação entre eles.

No tempo de 0 horas a.i., o tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K promoveu o aumento do diâmetro do xilema do caule, quando comparado ao tratamento controle. No tempo de 168 horas a.i., o maior aumento observado foi para o mesmo tratamento, seguido do tratamento com *T. virens* + fosfito de K, todos diferindo do tratamento controle, tanto na ausência quanto na presença do patógeno.

Tabela 7. Diâmetro dos vasos do xilema (μm) do caule de plantas de feijoeiro, no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Tempo (1) ¹	Tempo (2) ²	
		Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	29,10 b	32,73 ab A	30,43 ab A
<i>T. virens</i>	31,69 ab	33,45 ab A	32,06 ab A
Fosfito de K	33,80 ab	34,86 ab A	32,77 ab A
<i>T. harzianum</i> +fosfito de K	34,17 a	37,52 a A	34,68 a A
<i>T. virens</i> +fosfito de K	30,53 ab	36,99 a A	34,48 a A
Controle	30,29 ab	30,03 b A	26,55 b A
Médias Gerais	31,59	34,26	31,82
CV (%)	11,09	10,13	

1 - Coleta realizada logo após a inoculação do patógeno – Tempo 0 horas a.i.

2 - Coleta realizada sete dias após a inoculação do patógeno – Tempo 168 horas a.i.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) e maiúscula dentro da mesma linha (entre ausência e presença), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

No caule do feijoeiro, outra variável analisada foi a espessura do córtex caulinar, onde foi observado a redução mediante os tratamentos realizados. No tempo de 0 hora a.i., todos os tratamentos efetuados diferiram do tratamento controle, sendo o tratamento com

Trichoderma virens + fosfito de K o que apresentou menor média. Para o tempo de 168 horas a.i. foi observado a redução significativa para o tratamento com fosfito de K, isso na ausência do patógeno. Já na presença do patógeno, todos os tratamentos diferiram do controle, apresentado espessura reduzida do córtex caulinar (Tabela 8).

Tabela 8. Diâmetro do córtex (μm) caulinar de plantas de feijoeiro no início do estágio V4, cultivadas em casa de vegetação e tratadas com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Tempo (1) ¹	Tempo (2) ²	
		Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	296,50 bc	311,50 ab A	323,60 b A
<i>T. virens</i>	294,50 bc	279,10 ab A	269,50 c A
Fosfito de K	317,80 b	267,80 b A	279,10 bc A
<i>T. harzianum</i> +fosfito de K	284,70 bc	279,20 ab A	280,20 bc A
<i>T. virens</i> +fosfito de K	260,11 c	290,80 ab A	292,20 bc A
Controle	379,20 a	318,70 a B	379,70 a A
Médias Gerais	305,47	291,18	304,05
CV (%)	12,30	12,12	

1- Coleta realizada logo após a inoculação do patógeno – Tempo 0 horas a.i.

2- Coleta realizada sete dias após a inoculação do patógeno – Tempo 168 horas a.i.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) e maiúscula dentro da mesma linha (entre ausência e presença), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O tratamento controle apresentou diferença estatística para o fator presença/ausência do patógeno, sendo que na sua presença a espessura foi maior que a observada na ausência. No desenvolvimento normal de plantas como o feijoeiro, à medida que a espessura do caule aumenta, os tecidos vão se diferenciando e adentram no desenvolvimento secundário. Nestas condições, conforme ocorre o crescimento do cilindro vascular, o córtex primário vai sendo comprimido e como consequência ocorre a redução na sua espessura (NASSAR; BOGHDADY; AHMED, 2010; SAJO; CASTRO, 2006). Dessa forma, os resultados observados condizem com os apresentados pela raiz onde os indutores possivelmente tenham estimulado as plantas e acelerado seu desenvolvimento, permitindo que adquiram maior resistência estrutural mediante a lignificação dos tecidos. No caso observado para o tratamento controle, sugere-se que o patógeno tenha interferido no metabolismo da planta e interferido negativamente no desenvolvimento caulinar, diferente do observado para as plantas que receberam os tratamentos indutores.

Quanto à organização tecidual, o caule apresentou poucas alterações em relação ao controle. A epiderme se manteve com células cúbicas, cobertas com uma fina camada de cutícula. Na superfície externa da epiderme foram observados tricomas; o córtex manteve-se estratificado com aproximadamente seis camadas celulares. Os feixes vasculares mantiveram um sistema de cordões isolados ao redor da medula dispostos em anel, separados por células do parênquima formando o parênquima interfascicular. A medula manteve sua organização com várias camadas de células parenquimáticas volumosas (Figura 18). Para os tratamentos com *T. harzianum* + fosfito de K, *T. virens* e *T. virens* + fosfito de K, foi observado a presença da faixa cambial com células lignificadas através da coloração com a safranina, assim como fibras do periciclo, estruturas características do início do desenvolvimento secundário do caule, enquanto o tratamento controle apresentou o desenvolvimento secundário incipiente, da mesma forma como observado no cilindro vascular da raiz (Figuras 18 e 19).

O início do desenvolvimento secundário do caule, observado a partir do avanço na formação da faixa cambial com células esclerificadas bem como o aumento do diâmetro dos vasos do xilema e a redução no córtex caulinar, nas condições observadas no presente trabalho, evidencia que os tratamentos aplicados podem ter conduzido ao avanço no desenvolvimento, já que estes ocorreram antes do contato com o patógeno.

Até o presente trabalho, verificou-se escassez de estudos que relacionem alterações como o aumento do diâmetro do xilema caulinar do feijoeiro aos mecanismos de defesa da planta. Contudo, pode-se inferir que os vasos do xilema, principal rota de fluxo de água e nutrientes na planta, tiveram seu diâmetro alterado como consequência do avanço no desenvolvimento, porém com intuito de se preparar para o ataque do patógeno, visto que o xilema secundário apresenta uma maior lignificação, o que diretamente evitaria a perda de água e como consequência influenciaria na condutância estomática, na concentração de CO₂, transpiração foliar e a eficiência do uso da água, regulando os processos fotossintéticos e promovendo a manutenção da homeostase da planta bem como o crescimento (COCHARD, 2006; HUBBARD et al., 2001). De acordo com Stangarlin et al. (2011) uma maior lignificação dos vasos condutores influenciaria na realização da fotossíntese, pois além de funcionarem conduzindo fluxo de seiva, os vasos condutores possuem a função estrutural de sustentação da parte aérea, mantendo as folhas em posição adequada para captação de energia solar.

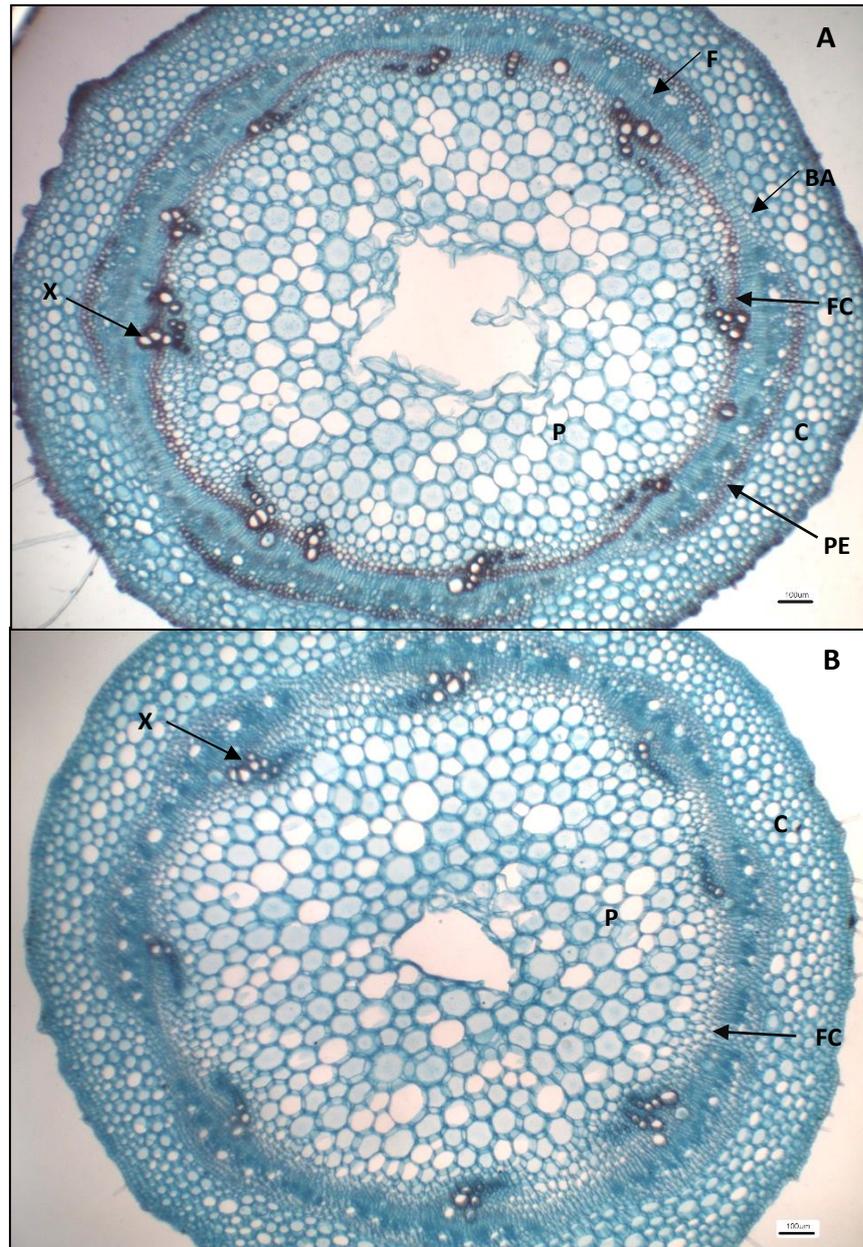


Figura 18. Secções transversais de parte do caule de *Phaseolus vulgaris*, no estágio V4, que foram submetidos aos diferentes tratamentos indutores e tratamento controle. **A;** Tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K; **B:** Tratamento controle. X: feixes de xilema; FC: faixa cambial; PE: periciclo; P: parênquima medular; C: córtex. Coloração: safranina e azul de alcian.

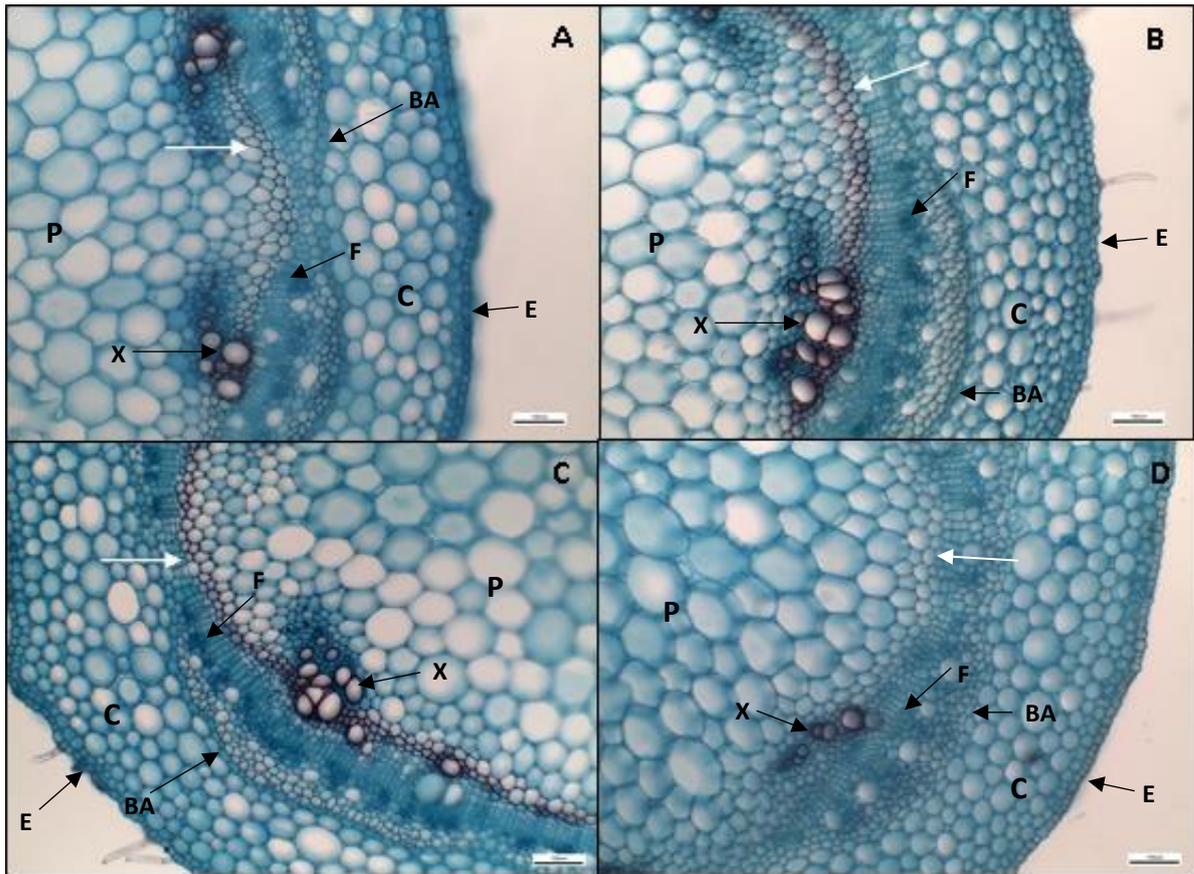


Figura 19. Secções transversais de parte do caule de *Phaseolus vulgaris*, no estágio V4, que foram submetidos aos diferentes tratamentos indutores e tratamento controle. **A:** Tratamento com *T. virens*; **B:** Tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K; **C:** Tratamento com *T. virens* + fosfito de K; **D:** Tratamento controle. Seta branca indica a faixa cambial; P: parênquima medular; C: córtex; BA: bainha amilífera; E: epiderme; F: feixes de floema; X: feixes de xilema. Coloração: safranina e azul de alcian.

4.1.3 Teor de fenóis totais

Os valores do teor de fenóis totais obtidos para os diferentes tratamentos, bem como as condições nas quais as plantas de feijoeiro foram expostas, são apresentados na Tabela 9. Nos dois tempos analisados, os tratamentos não diferiram estatisticamente do tratamento controle. Embora não tenha apresentado diferença estatística, a aplicação de *T. virens* + fosfito de K e *T. virens* exibiu uma tendência na redução do teor de fenóis totais.

De forma inversa, os tratamentos com *T. harzianum* e fosfito de K promoveram uma tendência ao incremento nos teores de fenóis totais, de forma independente da presença do patógeno, porém não diferindo estatisticamente do tratamento controle.

Tabela 9. Teor de fenóis totais (mg de catecol g⁻¹ de tecido seco) em tecido foliar do feijoeiro no início do estágio V4, cultivados em casa de vegetação e tratados com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Tempo (1) ¹	Tempo (2) ²	
		Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	2,15 a	2,30 a A	2,26 b A
<i>T. virens</i>	1,76 a	2,01 a A	1,86 ab A
Fosfito de K	1,98 a	2,02 a A	2,18 ab A
<i>T. harzianum</i> + fosfito de K	1,87 a	1,88 a A	2,05 ab A
<i>T. virens</i> +fosfito de K	1,84 a	1,71 a A	1,69 a A
Controle	2,02 a	1,99 a A	2,12 ab A
Médias Gerais	1,94	1,99	1,98
CV (%)	16,62	17,36	

1- Coleta realizada logo após a inoculação do patógeno – Tempo 0 horas a.i.

2- Coleta realizada sete dias após a inoculação do patógeno – Tempo 168 horas a.i.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) e maiúscula dentro da mesma linha (entre ausência e presença), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Considerando que os compostos fenólicos podem ser tóxicos aos microrganismos e são considerados como uma estratégia de defesa da planta conforme relatado por Stangarlin et al. (2010), a tendência ao aumento nos fenóis para os indutores *T. harzianum* e fosfito de K poderia estar associada à redução da severidade da doença e consequente resistência ao patógeno. Apesar da tendência de aumento no teor de fenóis observado para estes tratamentos, somente o tratamento com fosfito de K reduziu a da severidade da antracnose (veja item 4.1.1). Gadaga et al. (2017) observaram um incremento de com fenóis solúveis em plantas de feijão comum tratadas com os fosfitos de K e Mn, controlando a antracnose. Rajeswari (2014) obteve o mesmo resultado ao avaliar os efeitos dos filtrados de cultura de *T. virens*, *T. harzianum* e *Pseudomonas fluorescens* em *Arachish hypogaea* (amendoim-comum) infectada com *Fusarium oxysporum*, agente causal da fusariose, observou um aumento considerável de compostos fenólicos em relação ao controle, sendo eficiente no controle da doença.

Com relação ao *T. harzianum*, pode-se concluir que essa tendência de aumento no teor de compostos fenólicos observada, seja uma resposta da planta ao microrganismo indutor, já que não se observou efeito no controle da antracnose.

Já a tendência à redução dos compostos fenólicos, observada para alguns tratamentos, como relatado anteriormente, possivelmente tenha relação com a interação entre o indutor e a planta. Dessa forma, pode-se inferir que a tendência à redução provém da oxidação dos compostos fenólicos por enzimas produzidas pelas plantas, gerando subprodutos

que podem ser ainda mais tóxicos que os compostos fenólicos não oxidados (KULBAT, 2016). Outro aspecto a ser considerado é que os compostos fenólicos podem ser substratos para a síntese de lignina e suberina que reforçam mecanicamente as paredes das células, e a utilização destes para a lignificação poderia levar a redução no seu teor, a menos que houvesse um incremento na síntese de compostos (KULBAT, 2016; KUHN; PASCHOLATI, 2010).

Dessa forma, se o tratamento indutor causar uma maior lignificação, isso poderia resultar na redução dos teores de fenóis. Isso explicaria a tendência de redução observada para alguns dos tratamentos utilizados neste trabalho. Esses resultados foram obtidos por Kuhn e Pascholati (2010), onde utilizando *Bacillus cereus* e ASM no controle de *X. axonopodis pv. phaseoli* no feijoeiro, obtiveram uma tendência a redução dos compostos fenólicos, porém não significativa.

4.1.4 Teor de Lignina

Os valores do teor de lignina, obtidos de plantas de feijoeiro a partir dos diferentes tratamentos indutores, são apresentados na Tabela 10.

Para esta variável, foi observado um aumento nos teores de lignina em plantas de feijoeiro que receberam o tratamento *T. virens* + fosfito de K, diferindo estatisticamente do tratamento controle. Para este tratamento a maior deposição de lignina ocorreu mediante a presença do patógeno.

A lignina é uma molécula fenólica bastante complexa, juntamente com a celulose e hemicelulose, confere suporte mecânico às plantas e por ser hidrofóbica contribui para evitar perda de água (COCHARD, 2006). Constitui uma barreira de defesa física e química, dificultando a penetração e o avanço dos microrganismos no tecido vegetal. A formação de lignina ao redor das estruturas do patógeno, como as hifas, impedem seu avanço, isolando-a e impedindo seu desenvolvimento no tecido vegetal (STANGARLIN et al., 2010).

O fungo *C. lindemuthianum* é capaz de infectar folhas, caule, ramos, vagens e sementes de plantas de feijoeiro em todos os estágios de desenvolvimento. Plantas jovens geralmente são mais suscetíveis à infecção pelo patógeno do que as plantas adultas por possuírem tecidos menos lignificados (CRUZ et al., 2014).

Tabela 10. Teor de lignina (mg de lignina g⁻¹ de tecido seco) em tecido foliar do feijoeiro no início do estágio V4, cultivados em casa de vegetação e tratados com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamento	Tempo (1) ¹	Tempo (2) ²	
		Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	8,69 a	9,99 a A	9,76 ab A
<i>T. virens</i>	8,72 a	9,45 a A	10,30 ab A
Fosfito de K	8,99 a	9,93 a A	10,92 ab A
<i>T. harzianum</i> + fosfito de K	9,06 a	9,89 a A	10,99 ab A
<i>T. virens</i> +fosfito de K	9,18 a	10,12 a B	11,88 a A
Controle	8,77 a	9,88 a A	9,01 b A
Médias Gerais	8,90	9,87	10,48
CV (%)	7,82	11,79	

1 - Coleta realizada logo após a inoculação do patógeno – Tempo 0 horas a.i.

2 - Coleta realizada sete dias após a inoculação do patógeno – Tempo 168 horas a.i.

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma coluna (entre tratamentos) e maiúscula dentro da mesma linha (entre ausência e presença), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

No presente trabalho o tratamento combinado de *T. virens* + fosfito de K induziu a um maior teor de lignina sendo possivelmente um dos mecanismos que promoveu o controle e redução da severidade da antracnose no feijoeiro para este tratamento. Esses resultados reforçam os obtidos por Costa et al. (2017) que observaram um aumento tanto no teor de compostos fenólicos quanto de lignina no tecido foliar de feijoeiro tratado com fosfito de K, reduzindo a severidade da antracnose. Ribeiro-Júnior et al. (2006) observaram que o tratamento de mudas cacaueiras com o fosfito de K induziu incrementos na concentração de lignina dessas plantas promovendo o controle da doença causada pelo *Verticillium dahliae* no cacaueiro.

Usando *Trichoderma* spp. também foi possível verificar o acúmulo de lignina nas plantas, conforme relatam El-Rahman e Mohamed (2014) ao testarem indutores de resistência abióticos e bióticos (*T. harzianum*), verificaram que nas plantas tratadas, após a exposição com o patógeno, houve um incremento no teor de lignina e pectina na parede celular, quando comparado ao tratamento controle.

4.1.5 Trocas Gasosas

Os valores da taxa de assimilação líquida de CO₂ (fotossíntese), transpiração e condutância estomática estão representados na Tabela 11. Cabe destacar que os resultados

apresentados são referentes aos obtidos de plantas que receberam os tratamentos e foram desafiadas com *C. lindemuthianum*.

Tabela 11. Valores das trocas gasosas do tecido foliolar do feijoeiro no início do estágio V4, cultivados em casa de vegetação e tratados com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos, na presença de *C. lindemuthianum*.

Tratamentos	Taxa de fotossíntese líquida ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Condutância estomática ($\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
<i>T. harzianum</i>	12,02 ab	0,24 a	2,54 a
<i>T. virens</i>	12,68 ab	0,32 a	3,48 a
Fosfito de K	13,02 ab	0,30 a	2,46 a
<i>T. harzianum</i> + fosfito de K	17,74 a	0,27 a	2,93 a
<i>T. virens</i> + fosfito de K	14,51 ab	0,41 a	3,41 a
Controle	10,47 b	0,19 a	2,48 a
Médias Gerais	13,40	0,29	2,83
CV (%)	27,58	12,58	24,45

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Com relação à fotossíntese, dos tratamentos avaliados somente o tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K apresentou diferença significativa quando comparado ao controle. Para este tratamento foi observado o aumento da taxa fotossintética das plantas tratadas e inoculadas com o patógeno. Quanto à transpiração e condutância estomática não houve diferença significativa para estas variáveis nos tratamentos testados.

Diversos estudos relatam a influência positiva tanto do fosfito quanto de *Trichoderma* spp. na fotossíntese de plantas que receberam tratamentos indutores. De acordo com Shores e Harman (2008), análises de proteoma da interação pepino e *T. asperellum* mostraram que genes e proteínas envolvidas no metabolismo energético e fotossíntese tiveram expressão aumentada, bem como os produtos de resposta de defesa.

Diferentemente do observado acima, plantas infectadas por fungos, bactérias e vírus normalmente exibem redução na taxa fotossintética, essa redução normalmente está associada à diminuição da fosforilação fotossintética, reações fotoquímicas e assimilação do dióxido de carbono (BERGER, SINHA, ROITSCH, 2007). No feijoeiro infectado, o impacto da infecção por *C. lindemuthianum* na fotossíntese está associado com a fase necrotrófica do patógeno em que não ocorre inibição na assimilação líquida do CO_2 nos tecidos necrosados, mas sim diminuição na atividade fotossintética da área verde em torno do sítio de infecção,

fechamento dos estômatos, redução da transpiração e da atividade da rubisco (MEYER et al., 2001).

Dessa forma, no presente trabalho, o aumento da fotossíntese para o tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K, possivelmente ocorreu pela combinação de um conjunto de alterações mediadas pelos dois indutores presentes. As alterações observadas na anatomia do feijoeiro como o aumento da espessura do mesófilo; aumento no diâmetro dos vasos do xilema na raiz e aumento no diâmetro dos vasos do xilema do caule podem ter conduzido a uma maior atividade fotossintética no feijoeiro infectado com *C. lindemuthianum*. Associado a isto, está a ação dos tratamentos no controle da doença, minimizando as necroses sobre a folha, que permite a melhor captação luminosa. Klich (2000) afirma que o maior volume de células paliçádicas no mesófilo pode implicar em um aumento da eficiência fotossintética, pois além da sua contribuição na troca de CO₂, podem ter também uma função diferenciada na captação da luz.

No que tange a este aspecto, Smith et al. (1997) afirmam que células paliçádicas mais colunares agem como condutoras de luz propagando mais profundamente no mesófilo distribuindo a luz mais uniformemente por toda a folha. Já as células mesófilas esponjosas e os espaços intercelulares geram grandes quantidades de luz dispersa, aumentando a absorção de luz pelos cloroplastos dentro do mesófilo. Além disso, a maior espessura dos tecidos foliares contribui para a maior absorção de dióxido de carbono e gera maior eficiência no uso da água, devido ao impacto substancialmente maior na absorção de dióxido de carbono do que na perda de água por transpiração (GOTOH et al., 2018). Dessa forma, o aumento da eficiência fotossintética propicia a permanência de um balanço positivo de carbono, mantendo a homeostase principalmente quando a planta é exposta ao stress (ROJAS et al., 2014).

Com relação ao aumento do diâmetro do xilema, sabe-se que a condutância estomática esta diretamente ligada a condutância hidráulica, alterações no diâmetro do xilema da raiz bem como o caulinar possibilitou que a planta realizasse um fluxo eficiente de água e minerais para suprir a demanda fotossintética bem como às ações para defesa vegetal.

Outro parâmetro a ser considerado seria que esta melhor captação de luz, promovida pela mudança anatômica na folha do feijoeiro, além de influenciar na fotossíntese, conforme descrito, atuaria diretamente na defesa da planta contra os fitopatógenos. Pois de acordo com Kangasjarvi et al. (2012) a melhor captação da luz além de influenciar no desenvolvimento da planta, influencia na resposta de defesa, visto que em *Arabidopsis* foi observado que, quando inoculadas no escuro com uma forma virulenta de *Pseudomonas syringae*, a planta não é

capaz de acumular ácido salicílico e ocorre falha na indução da expressão da via dos fenilpropanóides e da enzima fenilalanina amônia-liase, mostrando a forte relação do cloroplasto e da luz na defesa da planta.

4.2 ANÁLISES HISTOQUÍMICAS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA MEDIADA POR *Trichoderma* spp. E FOSFITO DE POTÁSSIO EM HIPOCÓTILO DE FEIJOEIRO

Nos ensaios realizados com hipocótilo do feijoeiro, cultivar IPR Tangará, três parâmetros foram avaliados: a localização de H_2O_2 *in situ*, deposição de lignina e a resposta de hipersensibilidade na epiderme do hipocótilo, conforme subitens abaixo. Neste ensaio as plantas de feijoeiro foram tratadas com os mesmos indutores já descritos.

4.2.1 Localização de H_2O_2 *in situ*

Nas avaliações das porções epidérmicas do hipocótilo, foi verificado, através da técnica de coloração com DAB (3,3'-diaminobenzidina), grupos de células contendo reações para H_2O_2 em alguns dos tratamentos testados. Nestes grupos de células, observou-se uma coloração amarelo escura ocorrendo principalmente nas células onde as hifas do fungo estavam associadas.

No tratamento com *T. harzianum* + fosfito de K as reações foram observadas a partir de 24 horas a.i. com o patógeno, sendo localizadas nas células epidérmicas ao redor dos estômatos (Figuras 20 e 21). Para os outros tratamentos, as reações foram observadas em tempos diferentes. Nos hipocótilos que receberam os tratamentos *T. virens* + fosfito de K, a reação foi observada 48 horas a.i. (Figuras 22 e 23); com *T. virens* e Fosfito de K a reação ocorreu no tempo de 96 horas a.i. (Figuras 24). Para o tratamento controle e com *T. harzianum*, não foi observado reação nos tempos analisados.

Nirajan Raj et al. (2012) estudando o coleótilo do milheto, também observaram a presença de H_2O_2 *in situ* através de técnicas histoquímicas. Os autores relatam que 12 horas a.i. com o patógeno já foi possível observar a deposição de H_2O_2 no tecido epidérmico do milheto, e essa rapidez na formação de EROs é que permitiu maior resistência das plantas de milheto induzidas com *Bacillus pumilus*.

No feijoeiro, outros trabalhos utilizando a mesma técnica também relatam a ocorrência de H_2O_2 no tecido vegetal, mediante a indução de resistência. Baldo et al. (2011) estudando a epideme foliar observaram a presença de H_2O_2 48 horas a.i. em plantas de feijoeiro que

receberam os extratos de basidiocarpo de *Pycnoporus sanguineus* e foram inoculadas com *C. lindemuthianum*.

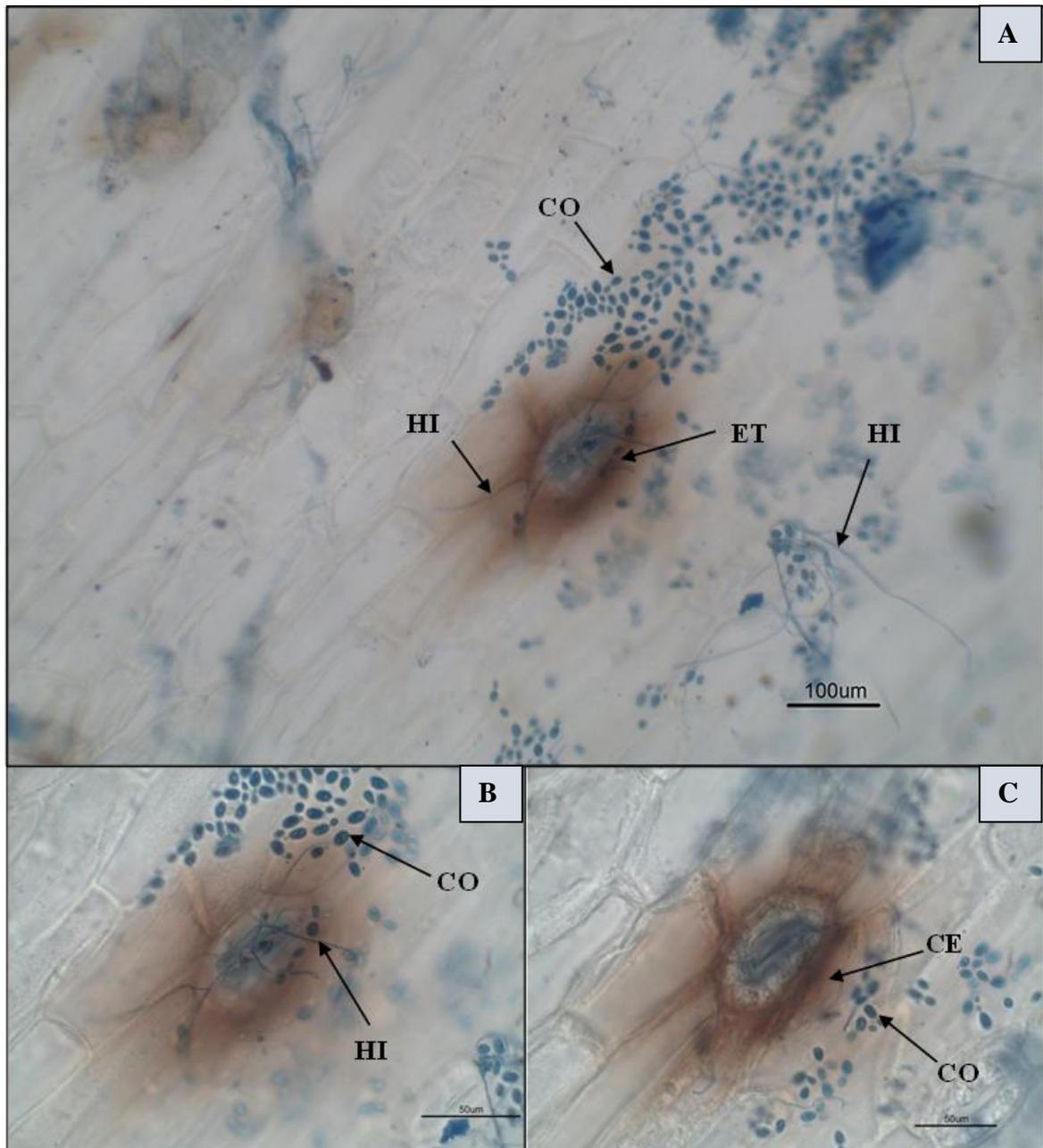


Figura 20. Localização H_2O_2 *in situ* no hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma harzianum* + fosfito de K e inoculados com *Colletotrichum lindemuthianum*. **A, B e C:** Fotomicrografia da epiderme do hipocótilo com detecção de H_2O_2 no tempo de 24 horas a.i. nas células da epiderme ao redor dos estômatos. CO: conídio de *Colletotrichum lindemuthianum*; HI: hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; ET: estômato; CE : célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão.

De acordo com Duran-Flores e Heil (2014), o principal local para a formação de H_2O_2 ou de outro tipo de EROs, durante as respostas ao estresse das plantas, são a parede celular e a membrana da planta. A geração de EROs dentro da parede celular e sua liberação fora da célula parece ser intencional, permitindo seu efeito tóxico direto sobre os patógenos, contribuindo para a redução da infecção. EROs promovem a oxidação de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, comprometendo os componentes celulares resultando no comprometimento de sua função, eventualmente levando à morte do patógeno.

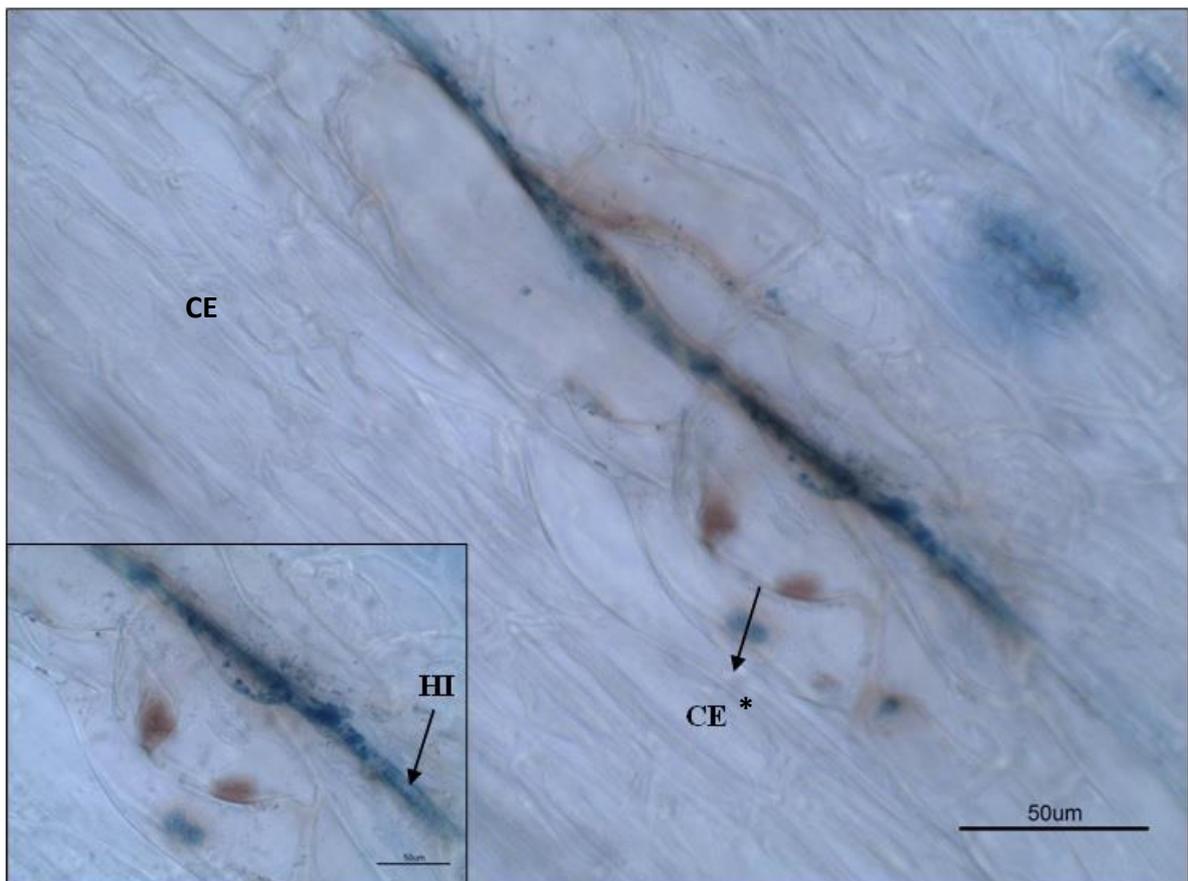


Figura 21. Localização de H_2O_2 *in situ* no hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichiderma harzianum* + fosfito de K, no tempo de 48 horas a.i. **A, B e C:** Fotomicrografia de porções da epiderme do hipocótilo com detecção de H_2O_2 nas células. **HI** : hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; **CE** : célula da epiderme; **CE***: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão.

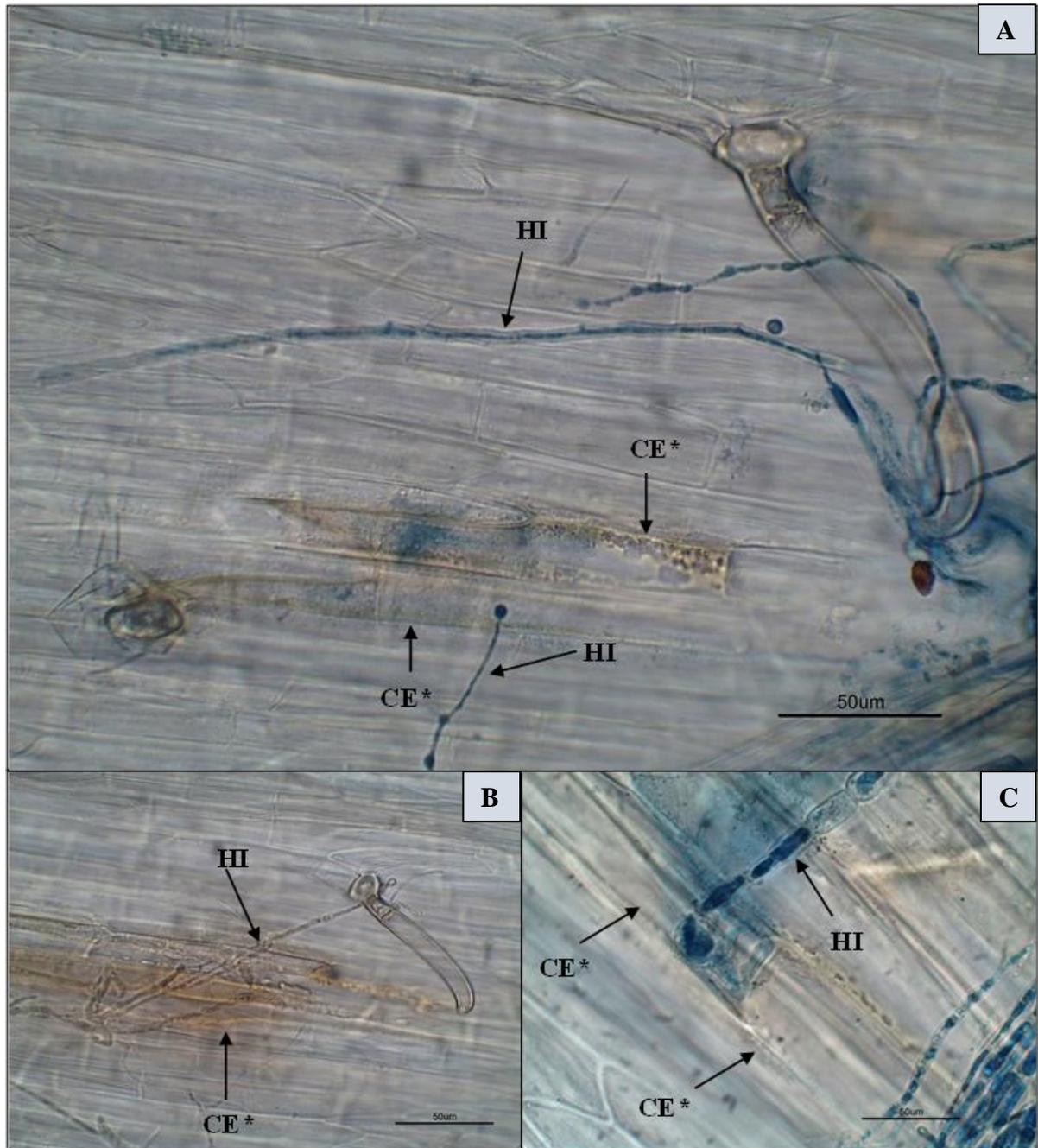


Figura 22. Localização de H_2O_2 *in situ* no hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma virens* + fosfito de K, no tempo de 48 horas a.i. **A, B e C:** Fotomicrografia da epiderme do hipocótilo com detecção de H_2O_2 . CO: conídio de *Colletotrichum lindemuthianum*; HI: hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; ET: estômato; CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão.

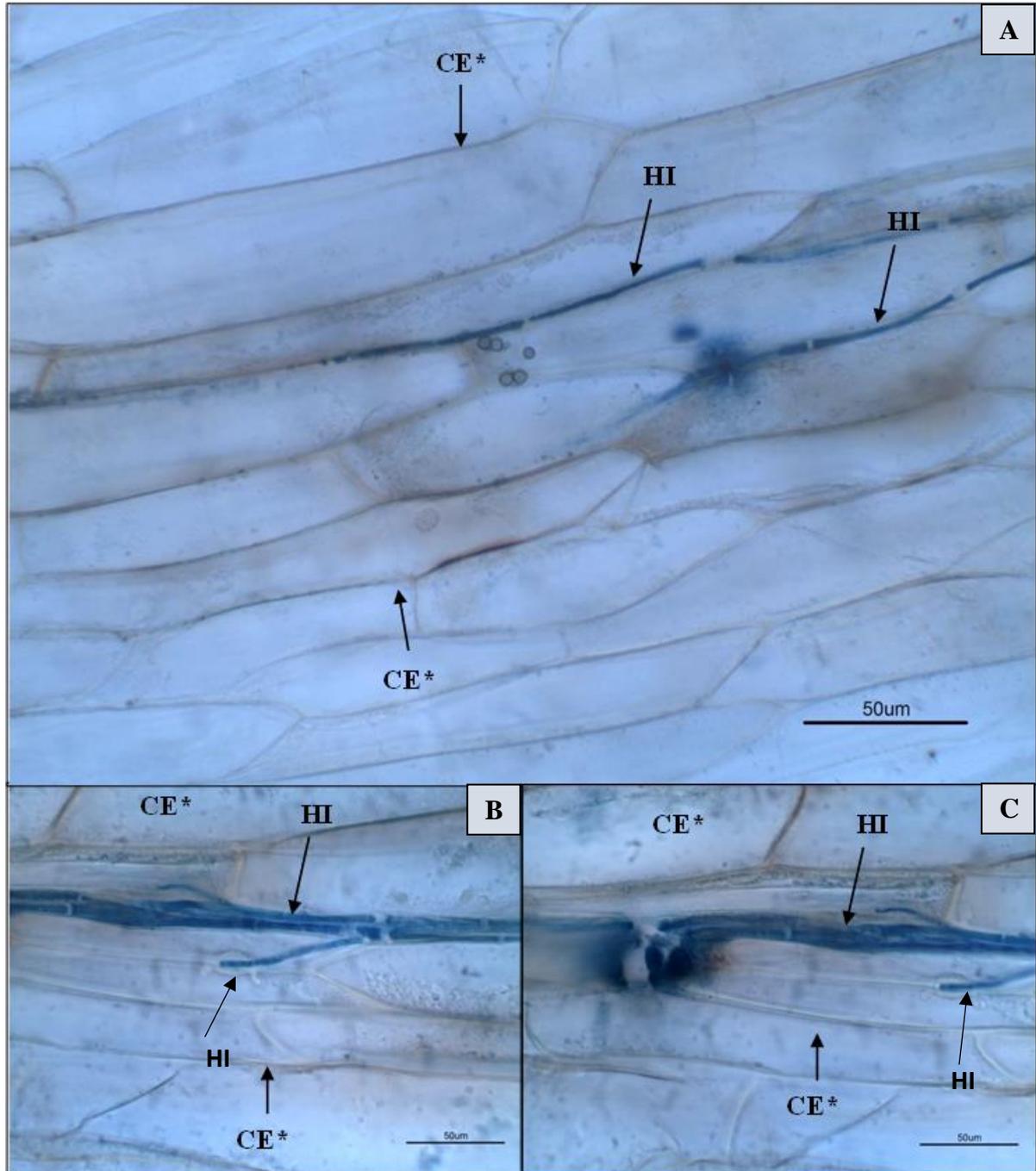


Figura 23. Localização de H_2O_2 *in situ* no hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma virens* + fosfito de K, no tempo de 48 horas a.i. **A B e C:** Fotomicrografia da epiderme do hipocótilo com detecção de H_2O_2 . CO: conídio de *Colletotrichum lindemuthianum*; HI: hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; ET: estômato; CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão.

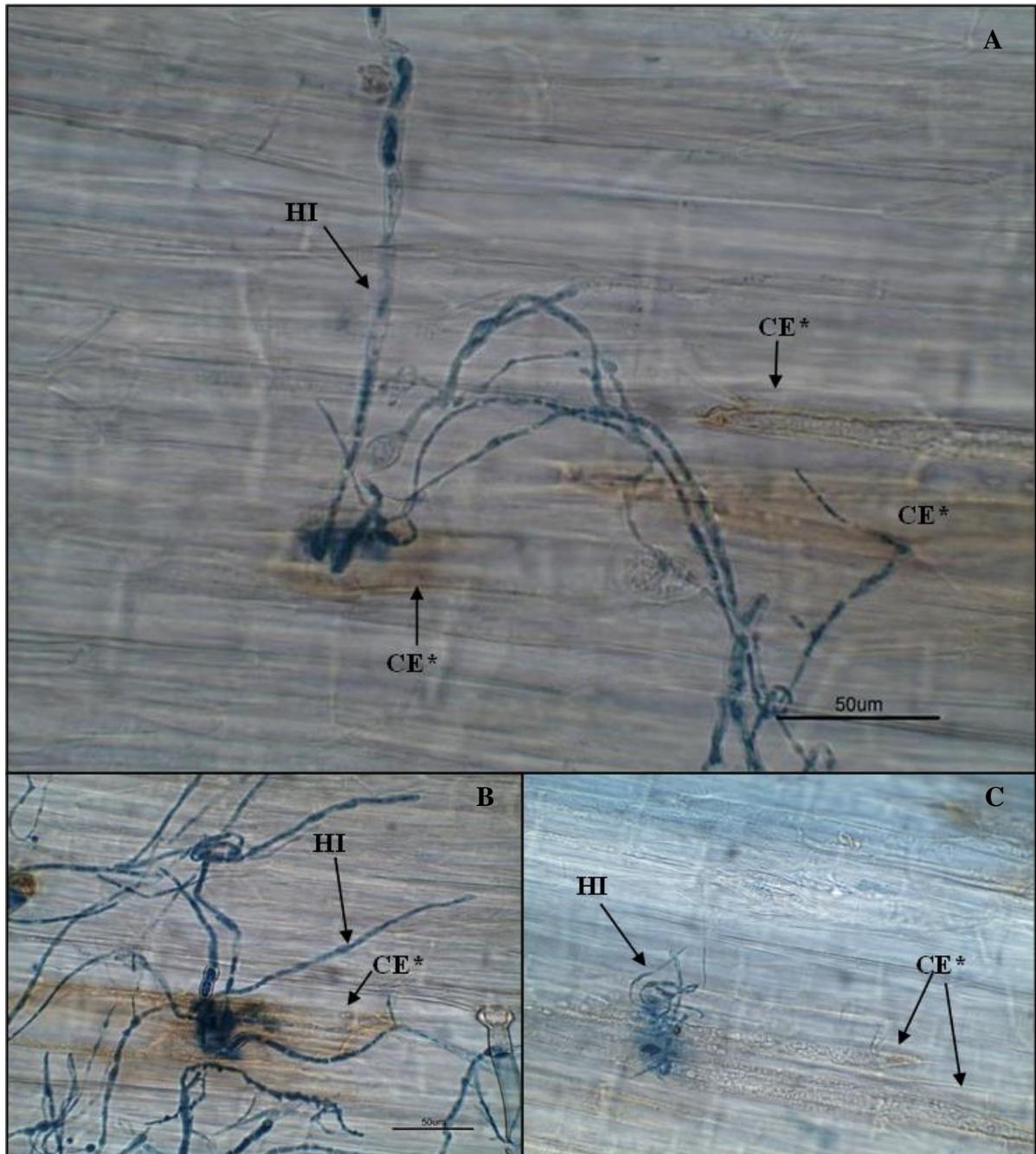


Figura 24. Localização de H_2O_2 *in situ* na epiderme do hypocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com o indutor *Trichoderma virens* e fosfito de K, no tempo de 96 horas a.i. **A e B:** Tratamento com *Trichoderma virens*; **C:** Tratamento com fosfito de K. CO: conídio de *Colletotrichum lindemuthianum*; HI: hifa de *Colletotrichum lindemuthianum*; ET: estômato; CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme apresentando reação H_2O_2 . As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão.

4.2.2 Deposição de Lignina

Nas avaliações de detecção de lignina nos tecidos epidérmicos do hipocótilo do feijoeiro, foi verificado, através da técnica de coloração com fluoroglucinol, regiões contendo coloração morrom avermelhada. Nestes locais a lignina depositada no interior das células reagiu com o fluoroglucinol formando a coloração característica.

Dessa forma, nos hipocótilos de feijoeiro que receberam o tratamento com *T. virens* + fosfito de K, a reação histoquímica foi inicialmente observada no tempo de 48 horas a.i. (Figuras 25 e 26). No tempo de 72 horas foi identificado a deposição de lignina para os tratamentos com e *T. harzianum* + fosfito de K, fosfito de K e *T. virens*. No tempo de 96 horas foi observada a deposição para os *T. harzianum* e tratamento controle (Figura 26).

Cabe destacar, que os resultados obtidos a partir do hipocótilo condizem com os obtidos na avaliação dos teores de lignina realizados nas folhas de feijoeiro (conforme item 4.1.3), onde o tratamento com *T. virens* + fosfito de K foi o que apresentou maior teor de lignina quando comparado ao controle. Dessa forma, no presente estudo, pode-se pressupor que a deposição de lignina pode ter contribuído para redução da doença, visto que os tratamentos que reduziram a AACPD apresentaram deposição de lignina no início da germinação dos esporos do fungo (Figura 26 F e G).

De acordo com Silva et al. (2005), as paredes de células em torno dos ferimentos podem receber a deposição de substâncias como lignina, suberina e/ou ácidos fenólicos. Esses depósitos proporcionam um aumento na resistência das paredes à ação de enzimas degradadoras, impedindo a difusão de toxinas do patógeno em direção ao hospedeiro ou de nutrientes da planta hospedeira em direção ao patógeno, restringindo a colonização dos patógenos. Neste sentido, órgãos com menor lignificação tendem a maior susceptibilidade durante a infecção por *C. lindemuthianum* (CRUZ et al., 2014).

A deposição de lignina foi também verificada por Nirajan Raj et al. (2012), estudando o coleóptilo do milho, onde observaram deposição de lignina no tecido vegetal iniciando 12 horas pós inoculação na cultivar resistente e 24 horas a.i. na susceptível, o que permitiu maior eficiência na resistência às plantas de milho induzidas com *Bacillus pumilus*. Os autores correlacionam o aumento da lignina com o controle do patógeno.

De acordo com Stangarlin et al. (2010) a lignificação de uma célula ou parte do tecido, torna as paredes mais resistentes à penetração e pode resultar na lignificação das hifas do patógeno, isolando do hospedeiro e dificultando o trânsito de água e nutrientes do

hospedeiro para o fungo e o trânsito de toxinas e enzimas do patógeno para o hospedeiro. Silva, Alquini e Cavallet (2005) afirmam que o depósito de lignina no interior dos tecidos vegetais, é característica anatômica decorrente do mecanismo de defesa da planta.

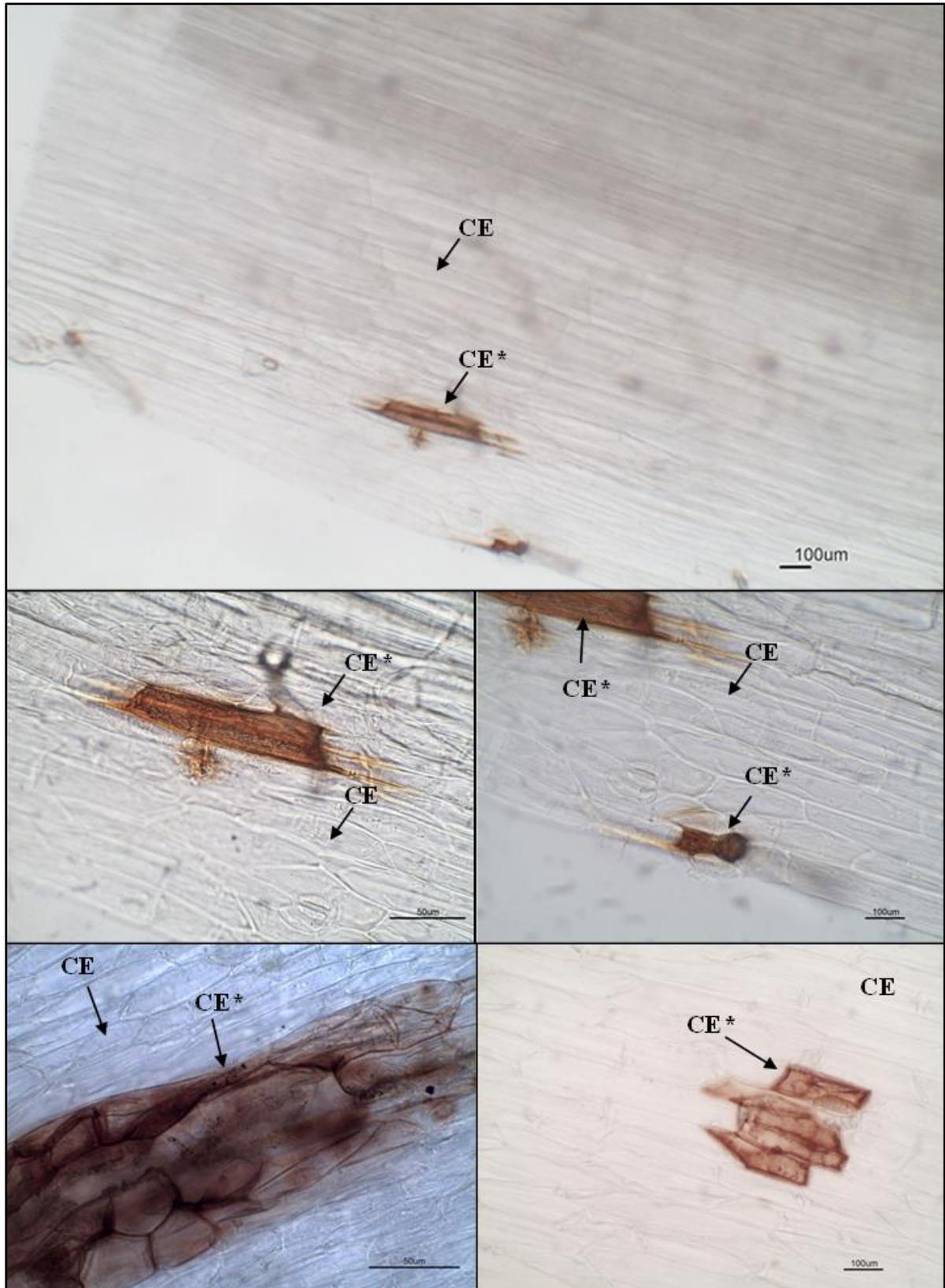


Figura 25. Deposição de lignina na epiderme em hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com *Trichoderma virens* + fosfito de K 48 horas a.i. CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme com deposição de lignina.

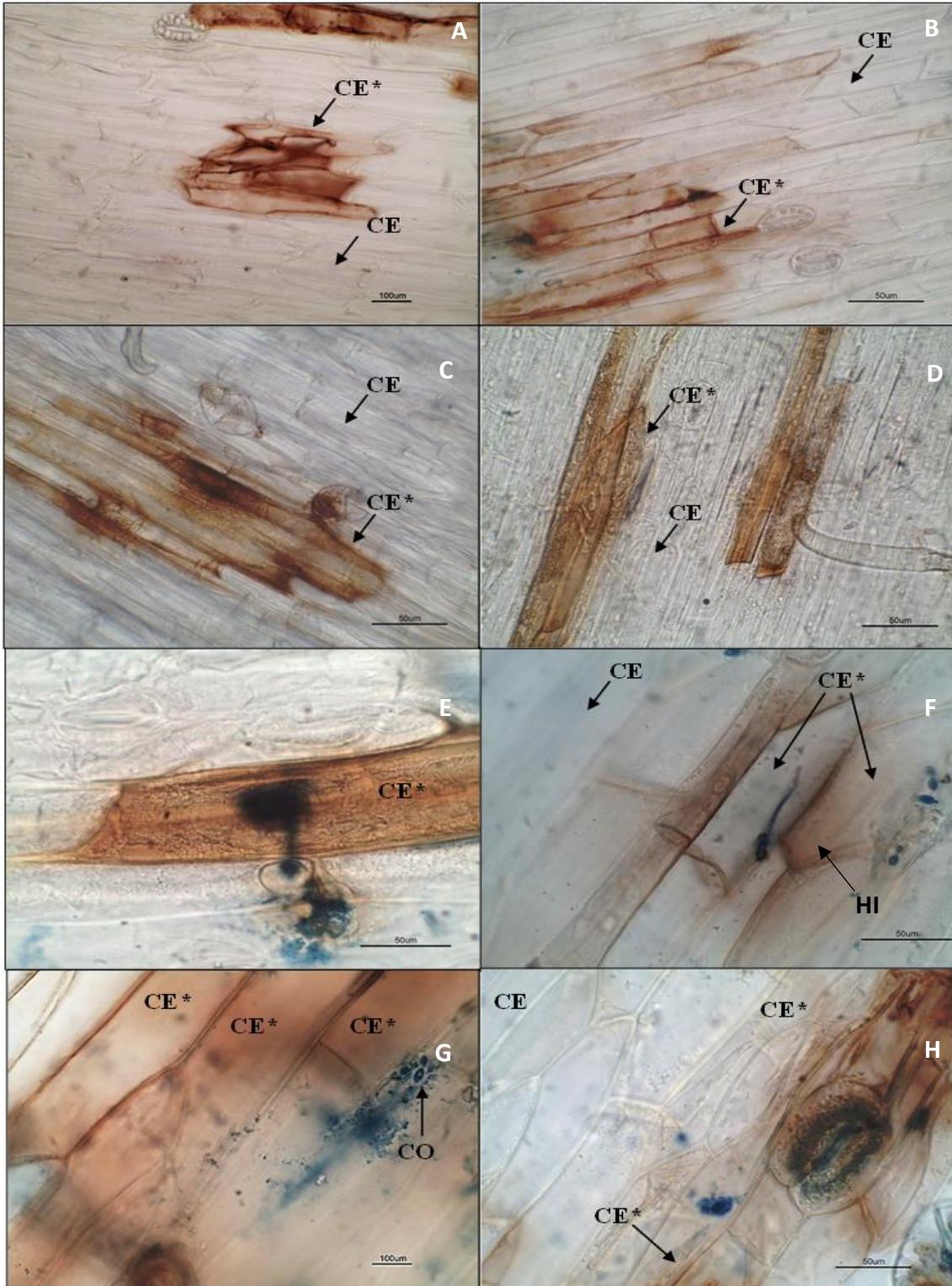


Figura 26. Deposição de lignina na epiderme do hypocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com diferentes tratamentos indutores e inoculados com *C. lindemuthianum*. **A:** controle (96 horas a.i.) **B:** *Trichoderma harzianum* (96 horas a.i.); **C** fosfito de K- 72 horas a.i.; **D:** *Trichoderma virens* (72 horas a.i.); **E e F:** *Trichoderma harzianum* + fosfito de K (72 horas a.i.); **G e H:** *Trichoderma virens* + fosfito de K (48 horas a.i.). CE: célula da epiderme; CE*: célula da epiderme com deposição de lignina. As hifas e conídios foram corados com lactofenol azul de algodão.

4.2.3 Resposta de hipersensibilidade

Os hipocótilos após serem inoculados com *C. lindemuthianum* foram avaliados nos tempos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas a.i. Para análise da reação de hipersensibilidade, foi avaliada a resposta de plasmólise de células epidérmicas do hipocótilo do feijoeiro imersas de uma solução de vermelho neutro a 0,2%, preparado por dissolução em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,6) contendo 0,5 M de sacarose.

Por ser um corante vital, o vermelho neutro, presente na solução, se acumula no vacúolo e as células que não estão comprometidas, ou seja, que não estão sofrendo a resposta de hipersensibilidade (RH), sofrem a reação de plasmólise. Dessa forma, a membrana plasmática se retrai e se distancia da parede celular se aproximando do tonoplasto do vacúolo, formando uma vesícula com coloração avermelhada (Figuras 27 e 28).

De acordo com O'Connell, Bailey e Richmond (1985), a perda da capacidade do tonoplasto em contrair e do vermelho neutro se acumular no vacúolo é considerado como indicativo da morte celular. Dessa forma, nas células mortas através da RH, não há plasmólise e o vermelho neutro não se acumula no vacúolo.

No presente trabalho, foram observados dois padrões de células em RH: um onde as células não apresentaram plasmólise e não acumularam vermelho neutro no vacúolo; e outro onde as células não apresentaram plasmólise, porém, se coraram de vermelho intenso (Figura 28). Esses resultados foram semelhantes aos observados por O'Connell, Bailey e Richmond (1985), onde também observaram células em reação de hipersensibilidade que não se coraram e as que se coraram fortemente de vermelho, ambas sem a ocorrência de plasmólise. De acordo com os autores, ambas as células estão mortas, porém o corante vermelho neutro pode reagir com células que apresentam acúmulo de algum tipo de compostos fenólicos, resultando em uma coloração vermelho escura.

Dessa forma, dos diferentes tratamentos testados no trabalho, a RH somente foi observada para os tratamentos onde os indutores foram combinados, iniciando 48 horas a.i. com o patógeno (Figura 28). Cabe destacar que as células em RH que apresentaram coloração vermelha intensa, apresentaram o citoplasma desorganizado, com distribuição irregular do corante.

Vários estudos já foram realizados evidenciando a resposta de hipersensibilidade em plantas tratadas com indutores. No coleótilo do milho tratado com indutor *Bacillus pumilus* INR-7, RH foi observada na grande maioria dos coleótilos analisados 24 horas após a inoculação com o patógeno, diferentemente do observado no milho resistente à doença onde

RH foi observada antes de 12 horas após a inoculação com o *Sclerospora graminicola* (NIRANJAN RAJ et al., 2012).

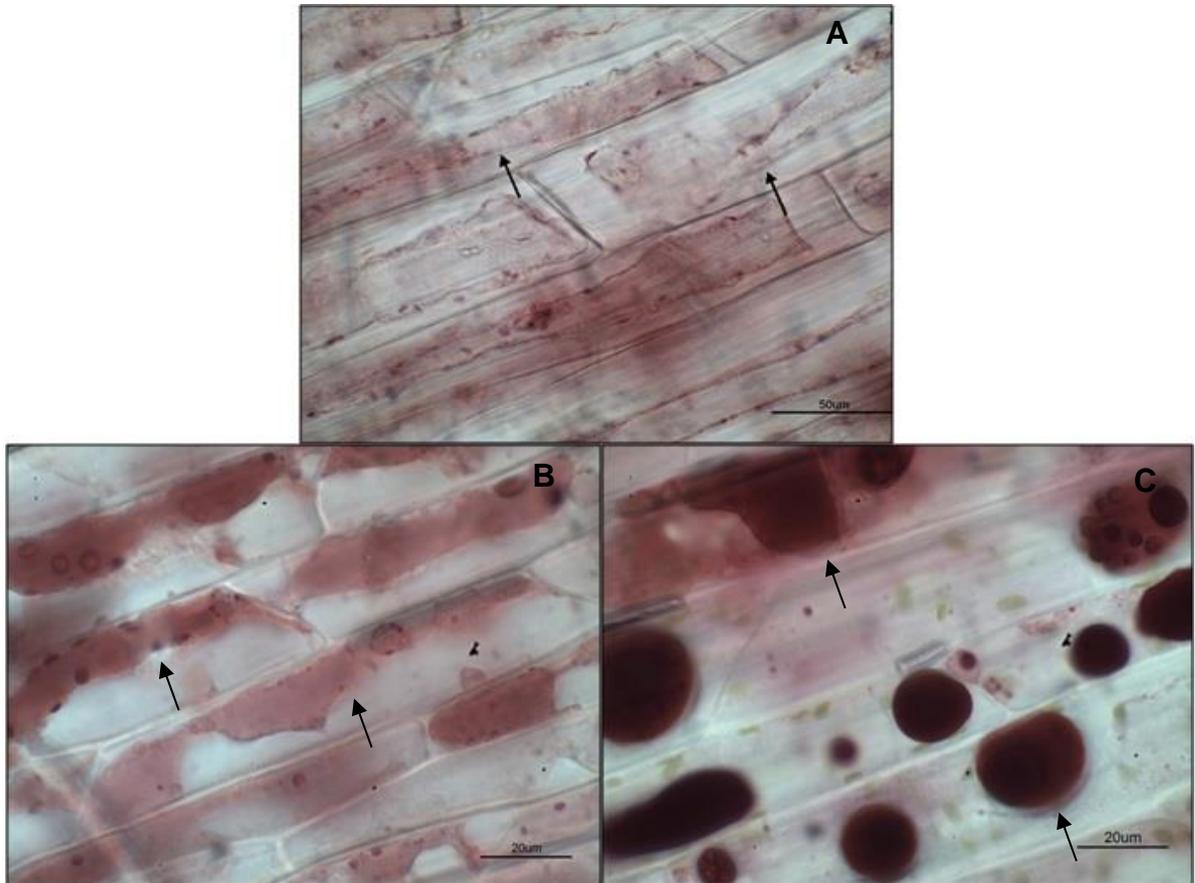


Figura 27. Células da epiderme do hipocótilo de *Phaseolus vulgaris* controle na ausência de *Colletotrichum lindemuthianum*, mostrando a resposta do tecido sadio à coloração com vermelho neutro em tampão fosfato de K (pH 7,6) e sacarose. **A:** porção da epiderme 5 minutos após a imersão em solução com vermelho neutro, mostrando células em plasmólise inicial. **B:** porção a epiderme 7 minutos após ter recebido a solução com o corante, sendo observado o avanço do processo de plasmólise. **C:** porção da epiderme controle 10 minutos após ter recebido a solução com o corante. Seta indica a retração da membrana plasmática com o conteúdo celular de algumas das células que sofreram plasmólise.

Nas folhas de feijoeiro foi observada a reação de hipersensibilidade 48 horas após a inoculação com o *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas tratadas com o indutor Ulvana (FREITAS; STADNIK, 2012). Os autores deste trabalho relataram ser a primeira vez que ocorre resposta de hipersensibilidade em uma cultivar de feijão altamente suscetível a uma raça compatível de *C. lindemuthianum*.

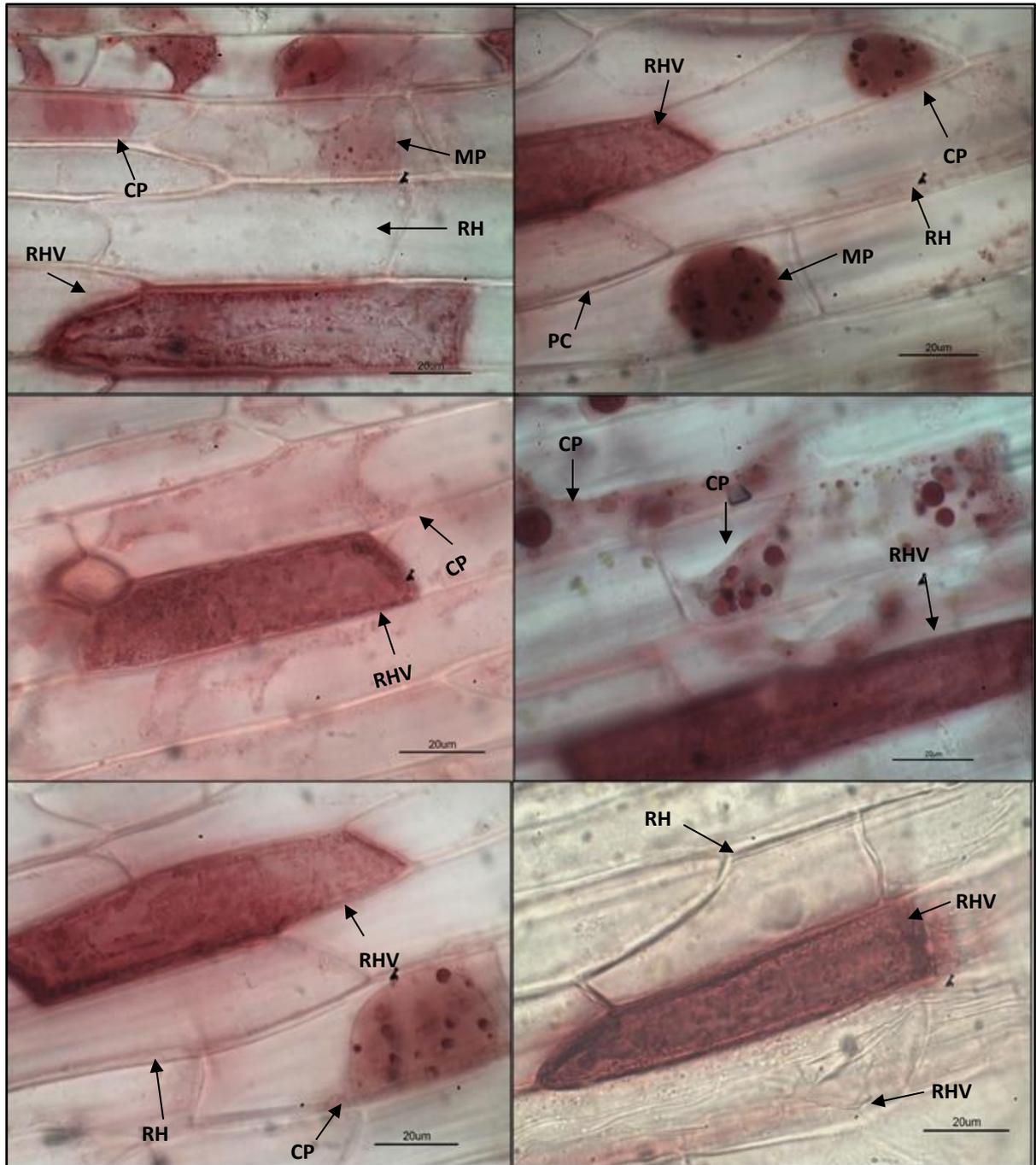


Figura 28. Resposta de hipersensibilidade em células epiderme do hypocótilo de *Phaseolus vulgaris* tratados com diferentes tratamentos indutores e inoculadas com *Colletotrichum lindemuthianum*. As imagens apresentam porções da epiderme coradas com a solução de vermelho neutro. Nas imagens observam-se células epidermais com três os tipos de respostas observadas para os tratamentos com *Trichoderma harzianum* + fosfito de K e *T. virens* + fosfito de K. (CP): células vivas plasmolisadas (sem a ocorrência de resposta de hipersensibilidade); (RH): células em RH que não plasmolisaram e não reteram o corante; (RHV): células que não plasmolisaram, mas coraram fortemente de vermelho, devido à presença de compostos fenólicos. As RHV apresentam citoplasma desorganizado com distribuição irregular do corante. MP: membrana plasmática, PC: parede celular.

Dessa forma, a resposta de hipersensibilidade consiste na formação de barreiras químicas ocorrendo no ponto de penetração do patógeno e envolve sucessivos eventos e sinais que compreendem desde o reconhecimento entre o patógeno e o hospedeiro até o colapso celular vegetal localizado, impedindo o desenvolvimento da infecção pelo patógeno, correspondendo à primeira etapa da resposta de defesa da planta (NIRANJAN RAJ et al., 2012). De acordo com Costa et al. (2017) após o tratamento com fosfito, as células infectadas são submetidas a mudanças rápidas que incluem morte celular por HR, ativação das rotas biossintéticas relacionadas a defesa, que podem acumular níveis elevados de fitoalexinas, e depósito de barreiras físicas ao redor das células infectadas.

4.3 CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS E COMPONENTES DE PRODUÇÃO

As análises dos parâmetros morfométricos e componentes de produção foram realizadas ao final de 72 dias após o plantio do feijoeiro IPR-Tangará em casa de vegetação e tratados com os diferentes indutores. As variáveis foram analisadas pelo desdobramento do fatorial duplo (6 tratamentos e 2 fatores: ausência ou presença do patógeno), onde foram avaliados o volume da raiz, diâmetro do caule (haste), altura da planta, número de vagens por plantas, número de grãos por vagem e massa de cem grãos.

A tabela 12 apresenta os valores médios das variáveis: volume da raiz, diâmetro do caule e altura da planta. Para estas variáveis, não houve diferença estatística entre os tratamentos testados e o tratamento controle e não foi observada a interação entre os tratamentos e a presença/ausência do patógeno. Contudo, foi observado diferença estatística quando estas variáveis foram analisadas na ausência e na presença do patógeno, independente do tratamento testado. Esses resultados mostram que os tratamentos não influenciaram no volume da raiz, o diâmetro do caule e altura da planta, porém a presença do patógeno influenciou negativamente no desenvolvimento da planta. Neste caso, pode-se afirmar também que *C. lindemuthianum* interfere negativamente no desenvolvimento da planta, com maior ou menor magnitude, dependendo do tratamento testado.

Tabela 12. Valores médios do volume da raiz, diâmetro do caule e altura da planta do feijoeiro IPR- Tangará, aos 72 dias após o plantio, cultivado em casa de vegetação e tratado com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias gerais obtidas nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Volume da raiz		Diâmetro do caule		Altura da Planta	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	9,00 a	10,00 a	7,27 a	7,13 a	77,40 a	74,20 a
<i>T. virens</i>	11,40 a	10,40 a	7,76 a	7,15 a	73,40 a	80,20 a
Fosfito de K	13,40 a	9,00 a	7,94 a	7,30 a	80,00 a	70,60 a
<i>T. harzianum</i> + fosfito de K	11,20 a	9,80 a	7,98 a	7,73 a	80,60 a	74,60 a
<i>T. virens</i> + fosfito de K	11,20 a	9,20 a	7,25 a	6,99 a	69,80 a	83,20 a
Controle	11,00 a	10,20 a	7,89 a	6,99 a	70,80 a	76,80 a
Médias Gerais	11,20	9,76	7,68	7,22	70,80	76,80
CV (%)	23,73		11,57		17,57	

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Quanto aos componentes de produção, foram observadas diferenças significativas para as variáveis: número de vagens por planta e a massa de cem grãos, quando comparado ao tratamento controle, conforme apresentado na Tabela 13. O tratamento que apresentou o melhor resultado foi o *T. harzianum* + fosfito de K, que resultou em uma melhor produção para as plantas de feijoeiro cultivadas em casa de vegetação. A presença do patógeno também influenciou negativamente na produção, onde na presença de *C. lindemuthianum* houve redução significativa no número de vagens por planta e na massa de cem grãos. Para estas variáveis, não foi observada interação entre os tratamentos e o fator ausência/presença do patógeno.

Com base nestes resultados, podemos considerar que as mudanças anatômicas e histológicas causadas por alguns dos tratamentos testados, as quais foram anteriormente discutidas, além de ter contribuído para a defesa da planta, possivelmente tenha favorecido uma melhor absorção e melhor aproveitamento dos nutrientes disponíveis no solo. Além disso, as alterações anatômicas das folhas e do xilema possivelmente favoreceram o processo

fotossintético no feijoeiro o que promoveu a permanência de um balanço positivo de carbono, mantendo a homeostase, principalmente quando a planta foi exposta ao stresse.

Tabela 13. Valores médios do número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de cem grãos obtidas do feijoeiro IPR- Tangará, aos 72 dias após o plantio, cultivado em casa de vegetação e tratado com os isolados de *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela apresenta as médias obtidas nos diferentes tratamentos na presença e na ausência de *C. lindemuthianum*.

Tratamentos	Número de Vagens		Número de grãos por vagem		Massa de cem grãos (g)	
	Ausência	Presença	Ausência	Presença	Ausência	Presença
<i>T. harzianum</i>	11,40 ab	9,00 ab	3,12 a	3,14 a	22,87 b	22,60 ab
<i>T. virens</i>	12,00 ab	10,60 ab	3,91 a	3,63 a	24,97 ab	24,12 ab
Fosfito de K	11,80 ab	9,60 ab	3,73 a	3,53 a	24,71 ab	23,63 ab
<i>T. harzianum</i> + fosfito de K	15,80 a	12,20 a	3,85 a	4,07 a	30,31 a	28,60 a
<i>T. virens</i> + fosfito de K	13,00 ab	11,80 ab	4,45 a	3,41 a	25,61 ab	23,73 ab
Controle	10,80 b	7,40 b	3,71 a	3,33 a	23,55 b	18,90 b
Médias Gerais	12,46	10,10	3,80	3,52	25,47	23,40
CV (%)	11,28		24,52		13,03	

*Médias seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Porém, quando se trata de mecanismo de resistência, existe um custo energético associado, assim quando uma planta é exposta ao estresse, parte dos recursos energéticos da planta é desviado para ser utilizados na produção de mecanismos de defesa (KUHN; PASCHOLATI, 2010; ROJAS et al., 2014). De acordo com Rojas et al. (2014), as repostas de defesa impõe custos devido a ativação de cascatas de sinalização, produção de metabólitos de defesa e a reorganização geral do metabolismo primário. Essas alterações metabólicas levam a perdas de energia e recursos que, de outra forma, estariam disponíveis para o crescimento e reprodução sob condições não estressantes.

Assim, dependendo do mecanismo de defesa ativado, o custo para esta resposta poderá causar um desbalanço, o que poderá onerar um gasto energético grande, desfavorecendo o crescimento da planta (KUHN; PASCHOLATI, 2010). No presente trabalho, apesar de se observar que um processo de *priming* estava em curso, onde o indutor prepara a planta de

forma sutil para a defesa à um menor custo, determinados tratamentos resultaram em defesas que apresentam um custo metabólico alto. É o caso do tratamento com *T. virens*+ fosfito de K que foi muito efetivo no controle da doença, porém não favoreceu o melhor desempenho agrônômico nas plantas de feijoeiro. Possivelmente essa diferença tenha relação como o tipo de resposta induzida. Como exemplo a produção de lignina, para este tratamento houve maior produção, o que possivelmente gerou um gasto energético grande, diferente do observado para o *T. harzianum* + fosfito de K, onde os mecanismos envolvidos na indução tenham gerado menor custo para a planta, o que resultou em uma maior produção (Tabela 14).

Dessa forma, para alguns tratamentos indutores, a alteração no metabolismo da planta, para investir em defesas, gera um custo metabólico alto o que acaba sendo compensado aos custos da redução do crescimento e desenvolvimento da planta.

Com relação aos isolados de *Trichoderma* spp., conforme já observado para outras variáveis, para a massa de cem grãos o isolado de *T. virens* e *T. harzianum* apresentaram um padrão de resposta bastante diferenciado, onde *T. harzianum* apresentou respostas mais próximas ao padrão observado para o tratamento controle, diferente do observado para *T. virens* ou mesmo quando *T. harzianum* foi combinado com fosfito de K.

Dessa forma, quando se relaciona ao comportamento dos isolados de *Trichoderma* spp. na combinação com fosfito de K, foram observadas duas situações diferentes no decorrer deste trabalho, uma onde pode-se inferir que o isolado de *T. virens* teve seu padrão de resposta potencializado na presença do fosfito de K, e outra onde *T. harzianum* só passou a ativar uma resposta efetiva na presença do fosfito de K, uma vez que seu padrão de resposta apresenta-se muito semelhante ao controle. Possivelmente os mecanismos envolvidos nesta interação sejam diferentes para os dois isolados de *Trichoderma*, confirmando o que foi exposto por Walters, Ratsep e Havis (2013), que atribui o efeito indutor de resistência por *Trichoderma* spp. como uma característica genótipo-dependente, tanto da cultura quanto dos isolados de *Trichoderma*.

Tabela 14. Correlação entre os tratamentos indutores aplicados no feijoeiro e as alterações observadas (variáveis analisadas). Os valores apresentados na tabela correspondem aos valores médios da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD); da espessura do parênquima paliçádico (μm), do parênquima lacunoso (μm), da epiderme abaxial e epiderme adaxial (μm); do diâmetro dos vasos do xilema da raiz e do caule (μm); do teor de lignina (mg de lignina g^{-1} de tecido seco); da taxa fotossintética ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); do número de vagens por planta e da massa de cem grãos (g), obtidos do feijoeiro cultivar IPR-Tangará, cultivado em casa de vegetação. Os seis tratamentos indutores utilizados no trabalho foram: *Trichoderma harzianum* (TOD1), *Trichoderma virens* (TM4), fosfito de K, *Trichoderma harzianum* (TOD1) + fosfito de K, *Trichoderma virens* (TM4) + fosfito de K e o controle água. A tabela correlaciona as médias obtidas nas variáveis em cada tratamento na presença de *C. lindemuthianum*

Variáveis	Tratamentos					
	<i>T. harzianum</i>	<i>T. virens</i>	Fosfito de K	<i>T. harzianum</i> + fosfito de K	<i>T. virens</i> + fosfito de K	Controle
AACPD – Severidade	30,35 b	23,99 bc	15,15 cd	18,68 bcd	8,20 d	53,00 a
Parênquima paliçádico	46,57 c	58,89 b	53,64 bc	72,05 a	73,09 a	47,87 c
Parênquima lacunoso	81,76 cd	92,01 bc	103,66 ab	104,16 a	103,77 ab	78,31 d
Epiderme abaxial	12,07 b	17,23 a	11,18 b	12,09 b	17,96 a	10,72 b
Epiderme adaxial	14,33 c	21,71 a	15,40 bc	15,77 bc	19,33 ab	11,73 c
Xilema Raiz	32,91 ab	36,35 ab	35,04 ab	40,04 a	39,23 ab	29,2 b
Xilema Caule	30,43 ab	32,06 ab	32,77 ab	34,68 a	34,48 a	26,55 b
Teor de Lignina	9,76 ab	10,30 ab	10,92 ab	10,99 ab	11,88 a	9,01 b
Taxa Fotossintética	12,02 ab	12,68 ab	13,02 ab	17,74 a	14,51 ab	10,47 b
Número de vagens por planta	9,00 ab	10,60 ab	9,60 ab	12,20 a	11,80 ab	7,40 b
Massa de cem grãos (g)	22,60 ab	24,12 ab	23,63 ab	28,60 a	23,73 ab	18,90 b

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro da mesma linha (entre tratamentos), não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância

5 CONCLUSÕES

A combinação dos isolados de *Trichoderma* spp. e fosfito de potássio promoveu alterações anatômicas, fisiológicas e produtivas no feijoeiro bem como a redução da severidade da antracnose.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. *Trichoderma harzianum* combinado com fosfito de potássio acelera o processo de reação de hipersensibilidade e acúmulo de H_2O_2 no local de penetração do patógeno;
2. *Trichoderma virens* combinado com fosfito de potássio aumenta o teor de lignina da folha;
3. *Trichoderma harzianum* combinado com fosfito de potássio aumenta a fotossíntese do feijoeiro;
4. *Trichoderma virens* e *Trichoderma harzianum* associado a fosfito de potássio aumentam a espessura do folíolo, aumentam o diâmetro do xilema e aceleram o desenvolvimento do feijoeiro;
5. *Trichoderma harzianum* combinado com fosfito de potássio favoreceu a melhoria dos aspectos agronômicos.
6. Fosfito de potássio e as combinações de *Trichoderma virens* e *Trichoderma harzianum* com fosfito de potássio reduzem a severidade da doença;

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARY, V. M. M.; RAM, B.; MANNA, M.; DATTA, D.; BHATT, A.; REDDY, M. K.; AGRAWAL, P. K. Phosphite: a novel P fertilizer for weed management and pathogen control. **Plant Biotechnology Journal**, Hoboken, v. 15, n. 12, p. 1493–1508, 2017.

ADAIR, H.; KLUTHCOUSKI, J. Realidade versus sustentabilidade na produção do feijoeiro comum. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; ADAIR, H. (Eds.). **Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. cap. 1, p. 21-34.

AKKER, M. G.; MANTER, D. K.; SHEFLIN A. M.; WEIR T. L.; VIVANCO J. M. Harnessing the rhizosphere microbiome through plant breeding and agricultural management. **Plant and Soil**, Haia, v. 360, p. 1-13, 2012.

ALVES, G. C. S.; SANTOS, J. M.; SOARES, P. L. M.; JESUS, F. G.; ALMEIDA, E. J. THULER, R. T. Avaliação *in vitro* do efeito de rizobactérias sobre *Meloidogyne incognita*, *M. javanica* e *Pratylenchus zaeae*. **Revista Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.4, p. 557-564, 2011.

ANDRADE, C. A. B.; SCAPIM, C. A.; BRACCINI, A. L.; MARTORELLI, D. T. Produtividade, crescimento e partição de matéria seca em duas cultivares de feijão. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 4, p. 683-688, 2009.

ANDRADE, M. J. B.; OLIVEIRA, D. P.; FIGUEIREDO, M. A.; MARTINS, F. A. D. Exigências Edafoclimáticas. In: CARNEIRO, J.E.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão do plantio à colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. cap. 3, p.38-66.

ARAÚJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

ARAÚJO, J. L.; FAQUIN, V.; ÁVILA, F. W.; PEDROSO, T. Q. Crescimento e acúmulo de fósforo pelo feijoeiro tratado com fosfato e fosfito via foliar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 2381-2394, 2014.

ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, n.1, p. 054-059, 2010.

ARORA, D.; JAIN, P.; SING, N.; KAUR, H.; BHATLA, S. C. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants, **Free Radical Research**, Yverdon, v. 50, n. 3, p. 291-303, 2016.

ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. **Photosynthetica**, Praga, v. 51, n. 2, p. 163-190, 2013.

AUDENAERT, K.; PATTERY, T.; CORNELIS, P.; HÖFTE, M. Induction of Systemic Resistance to *Botrytis cinerea* in Tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: Role of Salicylic Acid, Pyochelin, and Pyocyanin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Sant Paul, v. 15, n. 11, p. 1147–1156, 2002.

BALDO, M.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Detecção *in situ* de espécies reativas de oxigênio em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnoporus sanguineus* e inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 4, p. 174-179, 2011.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012, 247p.

BARBOSA, J. Z.; CONSALTER, R.; VEZZANI, F. M.; MOTTA, A. C. V. Bactérias e fungos benéficos na endosfera das plantas. **Revista Agrogeoambiental**, Pouso Alegre, v. 7, n. 3, p. 99-116, 2015.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.

BAXTER, H. L.; STEWART, C. N. Effects of altered lignin biosynthesis on phenylpropanoid metabolism and plant stress. **Biofuels**, London, v. 4, p. 635–650, 2013.

BECKERS, G. J.; JASKIEWICZ, M.; LIU, Y.; UNDERWOOD, W. R.; HE, S.Y.; ZHANG, S.; CONRATH, U. Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full *priming* of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 3, p. 44–53, 2009.

BEDENDO, I. P.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 17, p. 367-388.

BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, Lacaster, v. 58, n. 16, p. 4019 - 4026, 2007.

BERNARDES, T. G.; SILVEIRA, P. M.; MESQUITA, M. A. M. Regulador de crescimento e *Trichoderma harzianum* aplicados em sementes de feijoeiro cultivado em sucessão a culturas de cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 40, n. 4, p. 439-446, 2010.

BHATTACHARYA, A.; SOOD, P.; CITOVSKY, V. The roles of plant phenolics in defence and communication during *Agrobacterium* and *Rhizobium* infection. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 11, n. 5, p. 705–719, 2010.

BHATTACHARYYA, D.; YU, S. M.; LEE, Y. H. Volatile compounds from *Alcaligenes faecalis* JBCS1294 confer salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* through the auxin and gibberellin pathways and differential modulation of gene expression in root and shoot tissues. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 75, p. 297–306, 2015.

BOLLER T.; FELIX, G. A. Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 60, p. 379 - 406, 2009.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. In: CARNEIRO, J. E. S.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds.) **Feijão do plantio a colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. cap. 1, p. 9-15.

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C.S., PELLEGRINI, J. B. R.; ZANELLA, R.; COPETTI, A. C. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 4, p. 881-887, 2006.

BOUGHTON, A. J.; HOOVER, K.; FELTON, G.W. Methyl jasmonate application induces increased densities of glandular trichomes on tomato, *Lycopersicon esculentum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, p. 2211 - 2216, 2005.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p. 839-851, 2001.

BRACKMANN, A.; GIEHL, R. F. H.; SESTARI, I.; STEFFENS, C. A. Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs ‘Fuji’ durante o armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1039-1042, 2004.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH A. Metabolic potential of endophytic bactéria. **Current Opinion in Biotechnology**, Geneva, v. 27, p. 30-37, 2014.

BRAGA, R. M.; DOURADO, M. N.; ARAÚJO, W.L. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 86-98, 2016.

BROOKER, N.; WINDORSKI, J.; BLUMI, E. Halogenated coumarins derivatives as novel seed protectants. **Communication in Agriculture and Applied Biological Sciences**, Gent, v. 73, n. 2, p. 81-89, 2008.

BROTMAN, Y.; LANDAU, U.; CUADROS-INOSTROZA, A.; TAKAYUKI, T.; FERNIE, A. R.; CHET, I.; VITERBO, A.; WILLMITZER, L. *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. **PLOS Pathogens**, Berkeley, v. 9, n. 3, 2013.

BRUCE, T. J. A.; MATTHES, M. C.; NAPIER, J. A.; PICKETT, J. A. Stressful “memories” of plants: evidence and possible mechanisms. **Plant Science**, Watsonville, v. 173, p. 603–608, 2007.

BURRA, D. D.; BERKOWITZ, O.; HEDLEY, P. E. MORRIS, J.; RESJÖ, S.; LEVANDER, F.; LILJEROTH, E.; ANDREASSON, E.; ALEXANDERSSON, E. Phosphite-induced changes of the transcriptome and secretome in *Solanum tuberosum* leading to resistance against *Phytophthora infestans*. **BMC Plant Biology**, London, v. 14, n. 254, p.3-17, 2014.

CAMPOS, A. D. **Considerações sobre indução de resistência a patógenos em plantas.** Embrapa Clima Temperado, Pelotas, 2009, 28 p.

CARVALHO, N. L. Resistência genética induzida em plantas cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 7, n. 7, p. 1379-1390, 2012.

CESARINO, I.; ARAÚJO, P.; DOMINGUES JÚNIOR, A. P.; MAZZAFERA, P. An overview of lignin metabolism and its effect on biomass recalcitrance. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 35, p.303-311, 2012.

CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, Cassilândia, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.

CHAKRABORTY, S.; TIEDEMANN, A.V.; TENG, P. S. C. Climate change: potencial impact on plant diseases. **Environmental Pollution**, Barking, v. 108, p. 317-326. 2000.

CHAVERRI, P.; SAMUELS, G. J. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. **Studies in Mycology**, Utrecht, v. 48, p. 1-36, 2003.

CHIORATO, A. F.; CARBONELL, S. A. M.; MOURA, R. R.; ITO, M. F.; COLOMBO, C. A. Co-evolução entre raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* e feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 65, p. 381-388, 2006.

CHOUDHARY, D. K.; PRAKASH A.; JOHRI, B. N. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. **Indian Journal Microbiology**, New Delhi, v. 47, p. 289-297, 2007.

COCHARD, H. Cavitation in tree. **Centre de la Recherche Physique**, Bourdeaux, v. 7, p. 1018- 1026, 2006.

COELHO, J. D. Produção de Grãos: feijão, milho e soja. **Caderno setorial Etene**, Fortaleza, v. 2, n. 19, p. 8-13, 2017.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Compêndio de Estudos Conab: Evolução dos custos de produção e rentabilidade do feijão, safra 2010/2011 a 2015/2016**, Brasília, v. 1, 2016. Disponível on line <http://www.conab.gov.br>, acesso em: 23 de jan. de 2018.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra de grãos SAFRA 2016/17: Décimo segundo levantamento, Setembro 2017**. Brasília, v. 4, n. 12, 2017. Disponível on line <https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/graos>, acesso em: 05 de dez. de 2017.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra de grãos SAFRA 2017/18: Sétimo levantamento, abril 2018**. Brasília, v. 5, n. 7, p. 1-139, 2018. Disponível on line <https://www.conab.gov.br/index.php/info-agro/safras/graos>, acesso em: 09 de maio de 2018.

CONRATH, U. Molecular aspects of defence *priming*. **Trends in Plant Science**, Londres, v. 16, n. 10, p. 524-531, 2011.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACIAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 149, p. 1579–1592, 2009.

COSTA, B. H. G.; RESENDE, M. L. V.; JÚNIOR, P. M. M.; BOTELHO, D. M. S.; SILVA, B. M. Potassium phosphites in the protection of common bean plants against anthracnose and biochemical defence responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 166, n. 2, p. 1-8, 2017.

CRUZ, M. F. A.; ARAUJO, L.; POLANCO, L. R.; RODRIGUES, F. A. Aspectos microscópicos da interação feijoeiro *Colletotrichum lindemuthianum* mediados pelo silício. **Bragantia**, Campinas, v. 73, p. 284–291, 2014.

DALIO, R. J. D.; FLEISCHMANN, F.; HUMEZ, M.; OSSWALD, W. Phosphite Protects *Fagus sylvatica* Seedlings towards *Phytophthora plurivora* via Local Toxicity, Priming and Facilitation of Pathogen Recognition. **PLOS One**, v. 9, n. 1, 2014.

DALIO, R. J. D.; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, A. C.; BLUMER, S.; PEREIRA, V. F.; OSWALD, W.; PASCHOLATI, S. F. O triplo modo de ação dos fosfitos em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 20, p. 206-243, 2012.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação de componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 401-407, 2003.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; CANTERI, M. G. Métodos de avaliação das doenças. In: CANTERI, M. G.; DALLA-PRIA, M.; SILVA, O. D. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**. Ponta Grossa: UEPG, 1999, p. 53-64, 1999.

DANIEL, R.; GUEST, D. I. Phosphite induces defence responses in *Arabidopsis thaliana* challenged with *Phytophthora palmivora*. **Phytopathology**, Ithaca, v. 96, n. 16, p.28–38, 2006.

DANNER, M. A.; SASSO, S. A. Z.; MEDEIROS, J. G. S.; MARCHESE, J. A.; MAZARO, S. M. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 793-799, 2008.

DANTAS, J. S.; SOUZA, A. P.; FARIAS, M. F.; NOGUEIRA, V. F. B. Interações entre grupos de microorganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, Guarapuava, v. 2, n. 2, p. 213-218, 2009.

DIANESE, A. C.; BLUM, L. E. B.; DUTRA, J. B.; LOPES, L. F. Aplicação de fosfito de potássio, cálcio ou magnésio para a redução da podridão-do-pé do mamoeiro em casa de vegetação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2309-2314, 2009.

DILDEY, O. D. F. **Interação *Trichoderma*-feijoeiro e seus efeitos na fisiologia e indução de resistência contra antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*)**. 2014, 76 f.. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Candido Rondon, 2014.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 32, p. 1682–1694, 2009.

DINESH, R.; PRATEEKSHA, M. A review on interactions of *Trichoderma* with Plant and Pathogens. **Research Journal of Agriculture and Forestry Sciences**, Indore, v. 3, n. 2, 2015.

DINIZ, C. A. **Considerações sobre indução de resistência a patógenos em plantas**, Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2009, 28 p.

DORDAS, C. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture. A review **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 28, n. 1, p. 33-46, 2008.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ B. A.; KENERLEY C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 16, n. 9, p.749-59, 2011.

DURAN-FLORES, D.; HEIL, M. Damaged-self recognition in common bean (*Phaseolus vulgaris*) shows taxonomic specificity and triggers signaling via reactive oxygen species (ROS). **Frontiers in Plant Science**, Rockville, v. 5, n. 585, p. 1-11, 2014.

EL-RAHMAN, S. S. A.; MOHAMED, H. I. Application of benzothiadiazole and *Trichoderma harzianum* to control faba bean chocolate spot disease and their effect on some physiological and biochemical. **Acta Physiologia e Plantarum**, Cracóvia, v. 36, n. 2, p. 343-354, 2014.

ENRIGHT, A. M.; CUMBIE, B. G. Stem anatomy and internodal development in *Phaseolus vulgaris*. **American Journal of Botany**, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 915-922, 1973.

ESHRAHGI, L.; ANDERSON, J.; ARYAMANESH, N.; SHEARER, B.; McCOMB, J.; G. E.; HARDYA, S. J.; O'BRIENA, P. A. Phosphite primed defence responses and enhanced expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 60, p. 1086–1095, 2011.

FAROUK, S.; OSMAN, M.A. The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Sochi, v. 7, n. 3: p. 05-22, 2011.

FERRAZ, R. L. S.; MELO, A. S., SUASSUNA, J. F.; BRITO, M. E. B.; FERNADES, P. D. NUNES, E. S. J. Trocas gasosas e eficiência fotossintética em ecótipos de feijoeiro cultivados no semiárido. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 2, p. 181-188, 2012

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FERREIRA, R. B.; MONTEIRO, S.; FREITAS, R.; SANTOS, C. N.; CHEN, Z.; BATISTA, L. M.; DUARTE, J.; BORGES, A.; TEIXEIRA, A. R. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, p. 677-700, 2007.

FLEXAS, J.; RIBAS-CARBÓ, M. R.; DIAZ-ESPEJO, A., GALMÉS, J.; MEDRANO, H.. Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 31, p. 602–621, 2008.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. S.; GONÇALVES, M. G.; PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G.; PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 45-50, 2015.

FONTENELLE, A. D. B.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, Lincoln, v. 30, p. 1492-1500, 2011.

FORTES, F. O.; SILVA, A. C. F.; KURTZ, ALMANÇA, M. A. K.; TEDESCO, S. B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 2, p. 221-228, 2007.

FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 78, p. 8-13, 2012.

GADAGA, S. J. C.; ABREU, M. S.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M. Phosphites for the control of anthracnose in common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 52, n. 1, p. 36-44, 2017.

GERLACH, N.; SCHMITZ, J.; POLATAJKO, A.; SCHLUTER, U.; FAHNENSTICH, H.; WITT, S.; FERNIE, A. R.; UROIC, K.; SCHOLZ, U.; SONNEWALD, U.; BUCHER, M. An integrated functional approach to dissect systemic responses in maize to arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Cell & Environment**, Oxford, v. 38, p. 1591-612, 2015.

GILBERT, H. J. The biochemistry and structural biology of plant cell wall deconstruction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 153, p. 444–455, 2010.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GÓMEZ-MERINO, F.G.; TREJO-TÉLLEZ, L. I. Biostimulant activity of phosphite in horticulture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 196, n. 30, p. 82-90, 2015.

GOTOH, E.; SUETSUGU, N.; HIGA, T.; MATSUSHITA, T.; TSUKAYA, H.; WADA, M.. Palisade cell shape affects the light-induced chloroplast movements and leaf photosynthesis. **Scientific Reports**, London, v.8, n. 1472, p. 1-9, 2018.

HALLAK, A. M. G.; DAVIDE, L. C.; GAVILANES, M. L. G.; SOUZA, I. F. Efeito de exsudatos de raiz de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) sobre características anatômicas do caule do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 23, n. 2, p. 317-322, 1999.

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 79, p. 293–320, 2015.

HARMAN, G. E.; HERRERA-ESTRELLA, A. H.; HORWITZ, B. A.; LORITO, M. *Trichoderma* – from basic biology to biotechnology. **Microbiology**, New York, v. 158, p. 1-2, 2012.

HATFIELD, R. D.; MARITA, J. M.; FROST, K.; GRABBER, J.; RALPH, J.; LU, F.; KIM, H. Grass lignin acylation: p-coumaroyl transferase activity and cell wall characteristics of C3 and C4 grasses. **Planta**, Berlin, v. 229, n. 6, p.1253–1267, 2009.

HAYES, P. M.; OFFLER, C. E.; PATRICK, J. W. Cellular structures, plasma membrane surface areas and plasmodesmatal frequencies of the stem of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to radial photosynthate transfer. **Annals of Botany**, London, v. 56, n. 1, p. 125-138, 1985.

HEIL, M.; BOSTOCK, R. M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of Botany**, London, v. 89, n. 5, p. 503–512, 2002.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 158, p. 17-25, 2012.

HILKER, M.; SCHWACHTJE, J.; BAIER, M.; BALAZADEH, S.; AURLE, I. B.; GEISELHARDT, S.; HINCHA, D. K.; KUNZE, R.; ROEBER, R.; RILLIG, M. C.; ROLFF, J.; ROMEIS, T.; SCHMULLING, T.; STEPPUHN, A.; VAN DONGEN, L.; WHITCOMB, S. J.; WURST, S.; ZUTHER, E.; KOPKA, J. *Priming* and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 91, p. 1118-1133, 2016.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de algus fitopatógenos fúngicos in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

HOITINK, H. J. A.; MADDEN, L. V.; DORRANCE, A. E. Systemic resistance induced by *Trichoderma* spp.: interactions between the host, the pathogen, the biocontrol agent, and soil organic matter quality. **Phytopathology**, Ithaca, v. 96, n. 2, p. 186-189, 2006.

HUBBARD, R. M.; RYAN, M. G.; STILLER, V.; SPERRY, J. S. Stomatal conductance and photosynthesis vary linearly with plant hydraulic conductance in ponderosa pine. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, p. 113-121, 2001.

IAPAR – Instituto Agronômico do Paraná. Principais características das cultivares de feijão com sementes disponíveis no mercado. Disponível no site: <http://www.iapar.br/pagina-1363.html>. Acesso em: 15 setembro 2018.

JACKSON, T.J.; BURGESS, T.; COLQUHOUN, I.; HARDY, G.E. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v. 49, p. 147-154, 2000.

JAKAB, G.; TON, J.; FLORS, V.; ZIMMERLI, L.; MÉTRAUX, J. P.; MAUCH-MANI, B. Enhancing *Arabidopsis* Salt and Drought Stress Tolerance by Chemical *Priming* for Its Abscisic Acid Responses. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 139, n. 1, p. 267-274, 2005.

JEFFRIES, P.; DODD, J. C.; JEGER, M. J.; PLUMBLEY, R. A. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. **Plant Pathology**. London, v. 39, p. 343-366, 1990.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. Mc Graw Hill, New York: McGraw-Hill, 1940, 523 p.

JUNG H. W.; TSCHAPLINSKI T. J.; WANG L.; GLAZEBROOK J.; GREENBERG J. T. *Priming* in systemic plant immunity. **Science**, Washington, v. 324, n. 5923, p. 89-91, 2009.

JUSTYNA, P. K.; EWA, K. Induction of resistance against pathogens by b-aminobutyric acid. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 35, n. 6, p. 1735–1748, 2013

KANGASJARVI, S.; NEUKERMANS, J.; LI, S.; ARO, E. M.; NOCTOR, G. Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.63, p. 1619–1636, 2012.

KERSHA, W M. J.; TALBOT, N. J. Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 23, n. 1, p. 18-33, 1998.

KLICH, M. G. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 44, p. 171-183, 2000.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 107-114, 2010.

KULBAT, K. The role of phenolic compounds in plant resistance. **Biotechnology and Food Sciences**, Łódź, v. 80, n. 2, p. 97-108, 2016.

KUMAR, G.; MAHARSHI, A.; PATEL, J; MUKHERJEE, A.; SINGH, H. B.; SARMA, B. K. *Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases. **Satsa Annual Technical Issue**, Kolkata, v. 21, p. 206-218, 2017.

KUMUDINI, B. S.; VASANTHI, N. S.; SHETTY, H. S. Hypersensitive response, cell death and histochemical localization of hydrogen peroxide in host and non-host seedlings infected with the downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. **Annals of Applied Biology**, London, v. 139, p. 217–225, 2001.

KUREPIN, L. V.; PARK, M. J.; LAZAROVITS, G.; BERNARDS, M. A. Burkholderia phytofirmans-induced shoot and root growth promotion is associated with endogenous changes in plant growth hormone levels. **Plant Growth Regulation**, Heidelberg, v. 75, p. 199–207, 2015.

LATTANZIO, V.; LATTANZIO, V.M.T.; CARDINALI, A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plant against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in Research**, Kerala, v. 661, p. 23–67, 2006.

LI, Q.; SONG, J.; PENG, P.; WANG, J. P.; QU, G. Z.; SEDEROFF, R. R.; CHIANG, V. L. Plant biotechnology for lignocellulosic biofuel production. **Plant Biotechnology Journal**, Tokyo, v. 12, p. 1174–1192, 2014.

LLORENS, E.; GARCÍA-AGUSTÍN, P.; LAPEÑA, L. Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 74, n. 1, p. 90-100, 2017.

LOPES, M. N.; POMPEU, R. C. F. F.; SILVA, R. G.; REAGADAS FILHO, J. G. L.; BESERRA, L. T.; LACERDA, C. F. Trocas gasosas e índices de crescimento em capim-braquiária manejado sob lâminas de irrigação e idades de crescimento. **Revista Agro@mbiente**, Boa Vista, v. 7, p. 10-17, 2013.

LOOSLI, F. S.; SOLDÁ, R. B., SPÓSITO, T. H. N., MARTINS, F. B., ALVES, A. M., BAVARESCO, L. G., PINTO, L. E. V.; MELLO, P. R. M.; TEIXEIRA, W. F. Produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes doses de fertilizantes. **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 13, n. Especial, 2017.

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO-JUNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagônico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 145-149, 2009.

LOVATT, C. J.; MIKKELSEN, R. L. Phosphite fertilizers: what are they? can you use them? what can they do? **Better Crops**, Norcross, v. 90, n. 4, p. 11-13, 2006.

LUGTENBERG, B. J. J.; CARADUS, J. R.; JOHNSON, L. J. Fungal endophytes for sustainable crop production. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 92, n. 12, 2016.

LUQUE, R.; SOUSA, H. C.; KRAUS, J. E. Métodos de coloração de ROESER (1972) – modificado e KROPP (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alciano 8 Gs ou 8 Gx. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 199-2012, 1996

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MALINOVSKY, F. G.; FANGEL, J. U.; WILLATS, W. G. T. The role of the cell wall in plant immunity. **Frontiers in Plant Science**, Rockville, v. 5, n. 178, p. 1-12, 2014.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARTINI, L. C. P.; ROMÃO, A. L.; MOREIRA, P. A. B.; FRAGA, M. M. Uso da prescrição de agrotóxicos no Brasil: um estudo de caso na região de Tubarão – SC. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, Florianópolis, v. 13, n. 23, p.71-82, 2016.

MASSOUD, K.; BARCHIETTO, T.; LE RUDULIER, T.; PALLANDRE, L.; DIDIERLAURENT, L.; GARMIER, M.; AMBARD-BRETTEVILLE, F.; SENG, J. M.; SAINDRENAN, P. Dissecting Phosphite-Induced Priming in *Arabidopsis* Infected with *Hyaloperonospora arabidopsidis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 159, n. 1, p. 286–298, 2012.

MAUCH-MANI, B.; BACCELLI, I.; LUNA, E.; FLORS, V. Defense *Priming*: An Adaptive Part of Induced Resistance. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 68, n. 1, p. 485-512, 2017.

MAZID, M.; KHAN, T.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, Memphis, v. 3, n. 2, p: 232-249, 2011.

MELO, T. A.; ARAÚJO, M. U. P.; SERRA, I. M. R. S.; PASCHOLATI, S. F. Produtos naturais disponíveis comercialmente induzem o acúmulo de fitoalexinas em cotilédones de soja e mesocótilos de sorgo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 43, n. 3, p. 205-211, 2017.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, p. 170-179, 2006.

MEYER, S.; SACCARDY, K.; RIZZA, F.; GENTY, B. Inhibition of photosynthesis by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 24, p. 947-955, 2001.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MORAES, E. S.; MENELAU, A. S. Análise do mercado de feijão comum. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, n. 1, p. 81-92, 2017.

MORAES-DALLAQUA, M. A.; BELTRATI, C. M.; RODRIGUES, J. D. Anatomia de ápices radiculares de feijão cv. Carioca submetidos a níveis de boro em solução nutritiva. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 425-430, 2000.

MORAIS, T. P.; BRITO, C. H.; FERREIRA, A. S.; LUZ, J. M. Q. Aspectos morfofisiológicos de plantas de milho e bioquímico do solo em resposta à adubação

nitrogenada e à inoculação com *Azospirillum brasilense*. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 6, p. 589-596, 2015

MOREIRA, S. S. **Aspectos do desenvolvimento em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados com *Trichoderma* spp.** 2014. 85 p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MOTT, G. A.; MIDDLETON, M. A.; DESVEAUX, D.; GUTTMAN, D. S. Peptides and small molecules of the plant-pathogen apoplastic arena. **Frontiers in Plant Science**, Rockville, v. 5, n. 677, p. 1-12, 2014.

MOURA, A. D.; BRITO, L. M. Aspectos Socioeconômicos. In: CARNEIRO, J. E.; PAULA JUNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão do plantio a colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. cap. 2, p. 16-36.

MÜNCHA, S.; LINGNERB, U.; FLOSSA, D. S.; LUDWIGA, N.; SAUERB, N.; DEISINGA, H. B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, p. 41-51, 2008.

MUNDT, C. C. Durable resistance: A key to sustainable management of pathogens and pests. infection, genetics and evolution. **Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, p. 446-455, 2014.

MUNHOZ, L. D.; FONTEQUE, J. P.; SANTOS, I. M. O.; NAVARRO, M. O. P.; SIMIONATO, A. E. S; GOYA, E. T.; REZENDE, M. I.; BALBI-PENÑA, M. I.; OLIVEIRA, A. G; ANDRADE, G. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. **Cogent Food & Agriculture**, Lodon, v. 3, p. 1-16, 2017.

MUSSURY, R. M.; BETONI, R.; SILVA, M. A.; SCALON, S. P. Q. Anatomia foliar de soja infectada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow e tratadas com extratos vegetais **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 18-25, 2012.

NAFISI, M.; FIMOIGNARI L.; SAKURAGI, Y. Interplays between the cell wall and phytohormones in interaction between plants and necrotrophic pathogens. **Phytochemistry**, New York, v. 112, p. 63-71, 2015.

NASSAR, R. M. A.; AHMED, Y. M.; BOGHDADY, M. S. Botanical studies on *Phaseolus vulgaris* L. I-morphology of vegetative and reproductive growth. **Journal of Botany**, Baltimore, v. 6, n. 3, p. 323-333, 2010.

NASSAR, R. M. A.; BOGHDADY, M. S.; AHMED, Y. M. Botanical studies on *Phaseolus vulgaris* L. II-morphology of vegetative and reproductive organs. **Journal of American Science**, New York, v. 6, n. 12, p. 217-229, 2010.

NAVEA, C.; TERRAZAS, T.; DELGADO-SALINAS, A.; RAMÍREZ-VALLEJO, P. Foliar response of wild and domesticated *Phaseolus vulgaris* L. to water stress. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 49, n. 2, p. 125-132, 2002.

NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. **Biological Control**, San Diego, v. 67, p. 149-156, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**, 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, 1298 p.

NIRANJAN RAJ, A. S.; LAVANYA, A. S. N.; AMRUTHESH, A. K. N.; NIRANJANA, A. S. R.; REDDY, B. H. S. Histo-chemical changes induced by *PGPR* during induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. **Biological Control**, Orlando, v. 60, p. 90–102, 2012.

NOJOSA, G. B. R. A.; RESENDE, M. L. V.; BARGUIL, B. M.; MORAES, S. R. G.; VILAS BOAS, C. H. Efeito de indutores de resistência em cafeeiro contra a mancha de *Phoma*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 60-62, 2009.

NOZAKI, M. H.; KLIEMANN, O. A. Avaliação do uso de fosfito no controle da antracnose em feijoeiro comum. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 9, n. 31, p. 19-25, 2016.

O'BRIEN, P. A. Biological control of plant diseases. **Australasian Plant Pathology**, Calyton, v. 46, n. 4, p. 293-304, 2017.

O'CONNELL, K. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 27, n. 1, p. 75-98, 1985.

OLIVEIRA, D. M.; BISCHOFF, T. Z.; SILOCHI, S. M. Q.; SCHOENINGER, V.; COELHO, R. M. Considerações acerca da produção e qualidade de grãos de feijão. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v.3, n. Especial, p. 16-22, 2014.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FELIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, London, v. 15, p. 152–158, 2016.

PAIVA, A. S.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D.; TURCO, J. E. P. Condutância estomática em folhas de feijoeiro submetido a diferentes regimes de irrigação. **Engenharia Agrícola**, Piracicaba, v. 25, n. 1, p. 161-169, 2005

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro fino: Agronômica Ceres, 2018. cap. 29, p. 423 - 452.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 Ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. cap. 35, p. 593-636.

PASTOR, V.; LUNA, E.; MAUCH-MANI, B.; TON, J.; FLORS, V. Primed plants do not forget. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 94, p. 46–56, 2013.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; TEIXEIRA, H.; LOBO JUNIOR, M.; WENDLAND, A. Doenças do feijoeiro: estratégias integradas de manejo. In: CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds.) **Feijão do plantio a colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. cap.11, p. 270-299.

PEDRO, A. S.; HARAKAVA, R.; LUCON, C. M. M.; GUZZO, S. D. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma spp.* **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47, n. 11, p. 1589-1595, 2012.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PEÑA-VALDIVIA, C.; SÁNCHEZ-URDANETA, A.; MEZA, R. J.; JUÁREZ, M.; GARCÍA-NAVA, R.; CELIS, R. Anatomical root variations in response to water deficit: wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Biological Research**, v. 43, p. 417-427, 2010.

PEREIRA, G. C.; GRIS, D. J.; MARANGONI, T. M.; FRIGO, J. P.; AZEVEDO, K. D.; GRZESIUCK, A. E. Exigências Agroclimáticas para a Cultura do Feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, Curitiba, v. 3, p. 32-42, 2014.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupí, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, p. 186-198, 1999.

PINTO, D. G.; AGUILAR, M. A. G.; SOUZA, C. A. S.; SILVA, D. M. S.; SIQUEIRA, P. R.; JELBER CAO, R.; ZANETTI, L. V. Alterações fisiológicas após aplicação de silício em cacau e sua influência na preferência por pulgões. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n. 3, p. 360-367, 2012.

PINTO, M. S. T.; RIBEIRO, J. M.; OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 2, p. 241-248, 2011.

PIQUEREZ, S. J. M.; HARVEY, E. S.; BEYNON, J. L.; NTOUKAKIS, V. Improving crop disease resistance: lessons from research on *Arabidopsis* and tomato. **Frontiers in Plant Science**, Rockville, v. 3, p. 1-13, 2014.

POLLI, A.; NEVES, A. F.; GALO, F. R.; GAZARINI, J.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 7, n. 2, p. 82-89, 2012.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; NOGUEIRA, S. S. S.; MIRANDA, M. A. C. Aspectos da estrutura da raiz e do desenvolvimento de plantas de soja em solo compactados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 5 p. 929-938, 2000.

QUINTANA-RODRIGUEZ, E.; TOPILTZIN, A.; MOLINA-TORRES, J.; ALVAREZ, R.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; HEIL, M. Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 103, p. 250-260, 2014.

RAJESWARI, P. Role of phenols and antioxidant enzymes in biocontrol of *Fusarium oxysporum* causing fusarium wilt of *Arachis hypogaeae* L. (groundnut). **International Journal of Agricultural Science and Research**, Bhopal, v. 4, n. 6, p. 95-104, 2014.

RASHID, M. I.; MUJAWAR, L. H.; SHAHZAD, T.; ALMEELBI, T.; ISMAIL, I. M.; OVES, M. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. **Microbiological Research**, Jena, v. 183, p. 26-41, 2016.

RAVEN, P. H.; EVERT R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 829 p.

REMANS, R.; BEEBE, S.; BLAIR, M.; MANRIQUE, G.; TOVAR, E.; RAO, I.; CROONENBORGH, A.; TORRES-GUTIERREZ, R.; EL-HOWEITY, M.; MICHIELS, J. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Soil**, Crawley, v. 302, p. 149–161, 2008.

REZENDE, J. A. M.; MAZZOLA JR., N. S.; BEDENDO, I. P.; KRUGNER, T. L. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. cap. 34, p.543-591.

RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V.; PEREIRA, R. B.; CAVALCANTI, F. R.; AMARAL, D. R.; PÁDUA, M. A. Fosfito de potássio na indução de resistência à *Verticillium dahliae* Kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, p. 629-636, 2006.

ROJAS, C. M.; SENTHIL-KUMAR, M.; TZIN, V.; MYSORE, K. S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 17, p. 1–12, 2014.

ROOKES, J. E.; WRIGHT, M. L.; CAHILL, D. M. Elucidation of defence responses and signaling pathways induced in *Arabidopsis thaliana* following challenge with *Phytophthora cinnamomi*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, p. 151–161, 2008.

SABA, H.; VIBHASH, D.; MANISHA, M.; PRASHANT, K. S.; FARHAN, H.; TAUSEEF A. *Trichoderma* – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. **Mycosphere**, Guizhou, v. 3, n. 4, p. 524–531, 2012.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava, v. 2, n. 3, p. 203-208, 2009.

SAJO, M. G.; CASTRO, N. M. Caule. In: APEZZATO DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO GUERREIRO, S. M.(Eds.) **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2006. cap. 11. p. 283 - 302. .

SAMUELS, G. J. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, Ithaca, v. 87, p. 195-206, 2006.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L.; VIEIRA, R. F.; PINHEIRO, L. R. Botânica. In: CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds.). **Feijão do plantio a colheita**. Viçosa: Editora UFV, 2015. cap.3, p. 38-66.

SAS Institute. **SAS University Edition**. Users Guide. Cary, SAS Institute INC, 2014.

SASIDHARAN, R.; VOESENEK, L. A.; PIERIK, R. Cell wall modifying proteins mediate plant acclimatization to biotic and abiotic stresses. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 30, p. 548–562, 2011.

SATTLER, S. E.; FUNNELL-HARRIS, D. L. Modifying lignin to improve bioenergy feedstocks: strengthening the barrier against pathogens? **Frontiers in Plant Science**, Rockville, v. 4, p. 70, 2013.

SBALCHEIRO, C. C.; DENARDIN, N. D.; BRAMMER, S. P. Alterações de isoenzimas peroxidases em plantas de feijoeiro tratadas com biocontrolador do cretamento bacteriano comum. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 029-037, 2009.

SCHOSSLER, J. H.; MEERT, L.; RIZZARDI, D. A.; MICHALOVICZ, L. Componentes de rendimento e produtividade do feijoeiro comum submetido à inoculação e co-inoculação com estirpes de *Rhizobium tropici* e *Azospirillum brasilens*. **Revista Scientia Agraria**, Curitiba, v. 17, n. 1, p. 10-15, 2016.

SCHURT, D. A.; RODRIGUES, F. A. R.; COLODETTE, J. L., CARRÉ-MISSIO, V. Efeito do silício nas concentrações de lignina e de açúcares em bainhas de folhas de arroz infectadas por *Rhizoctonia solani*. **Bragantia**, Campinas, v. 72, n. 4, p.360-366, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Eds.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. cap. 6, p. 227-248.

SEWELAM, N.; KAZAN, K.; SCHENK, P. M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, n. 187, p. 1-21, 2016.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Sofia, v. 31, n. 3, p. 446–459, 2017.

SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, Ithaca, v. 67, p. 1051-1056, 1977.

SHARIFI, R.; LEE, S.; RYU, C. Microbe-induced plant volatiles. **New Phytologist**, Lancaster, v. 218, p. 1-8, 2017.

SHORESH, M.; HARMAN, G. E. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 147, p. 2147-2163, 2008.

SILVA, G. B. P.; HECKLER, L. I.; SANTOS, R. F.; DURIGON, M. R.; BLUME, E. Identificação e utilização de *Trichoderma* spp. armazenados e nativos no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 28, n. 4, p. 33-42, 2015.

SILVA, H., MARTINEZ, J. P.; BAGINSKY, C.; PINTO, M. Efecto del déficit hídrico en la anatomía foliar de seis cultivares de poroto *Phaseolus vulgaris*. **Revista Chilena de Historia Natural**, Santiago, v. 72, p. 219-235, 1999.

SILVA, H. T.; COSTA, A. O. **Caracterização botânica de espécies silvestres do gênero *Phaseolus* L. (Leguminosae)**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2003. 40 p. (Documentos/Embrapa Arroz e Feijão, 156).

SILVA, J. L.; SOUZA, P. E.; ALVES, E.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FREITAS, M. L. O.; RESENDE, M. L. V. Essential oil of *Cymbopogon flexuosus*, *Vernonia polyanthes* and potassium phosphite in control of bean anthracnose. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nsukka, v. 9, p. 243–253, 2015.

SILVA, L. M.; ALQUINI, Y.; CAVALLET, V. J. Inter-relações entre a anatomia vegetal e a produção vegetal. **Acta Botanica Brasílica**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 183-194, 2005.

SILVA, V. N.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.12, p.1609-1618, 2011.

SMITH, W. K.; VOGELMANN, T. C.; DELUCIA, E. H.; BELL, D. T.; SHEPHERD, K. A. Leaf form and Photosynthesis: do leaf structure and orientation interact to regulate internal light and carbon dioxide? **Bioscience**, Washington, v. 47, n. 11, p. 785-796, 1997.

SINGH, V. K.; UPADHYAY, R. S. The Hypersensitive Response: A case of cell death induction in Plants. **International Journal of Engineering Research & Technology**, Tumkuru, v. 2, n.3, 2013.

SINGH, A.; SHUKLA, N.; KABADWAL, B. C.; TEWARI, A. K.; KUMAR, J. Review on plant-*Trichoderma*-pathogen interaction. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Kancheepuram, v. 7, n. 2, p. 2382-2397, 2018.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadina, v. 1, p. 9-19, 2007.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. S. Uso de agrotóxicos e impactos econômicos sobre a saúde. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 46, n. 2. p. 209-17, 2012.

SOYLU, S.; BAYSAL, O.; SOYLU, E. M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis*

subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, Limerick, v. 165, p. 1069-1075, 2003.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; SCAPIM, C. A. S.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônomo de milho pipoca. **Bragantia**, Campinas v. 75, n. 1, p. 33-40, 2016.

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

STANGARLIN, J. R.; SCHULZ, D. G.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; KUHN, O. J. Indução de fitoalexinas em soja e sorgo por preparações de *Saccharomyces boulardii*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 1, p. 91-98, 2010.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M.H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 2, n. 11, p. 16-21, 1999.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, B. R.. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production, **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 1-30, 2010.

SUN, L.; YANG, D. L.; KONG, Y.; CHEN, Y.; LI, X. Z.; ZENG, L. J.; LI, Q.; WANG, E.; HE, Z. H. Sugar homeostasis mediated by cell wall invertase Grain Incomplete Filling 1 (GIF1) plays a role in pre-existing and induced defence in rice. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 161–173, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAMBASCIO, C.; COVACEVICH, F.; LOBATO, M. C.; DE LASA, C.; CALDIZ, D.; DOSIO, G.; ANDREU, A. The application of K phosphites to seed tubers enhanced emergence, early growth and mycorrhizal colonization in potato (*Solanum tuberosum*). **Journal Plant Science**, Limerick, v. 5, p. 132–137, 2014.

TAVARES, E. Q. P.; SOUZA, A. P., BUCKERIDGE, M. S. How endogenous plant cell-wall degradation mechanisms can help achieve higher efficiency in saccharification of biomass. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, p. 4133–4143, 2015.

TAVARES, G. M.; LARANJEIRA, D.; LUZ, E. D. M. N.; SILVA, T. R.; PIROVANI, C. P.; RESENDE, M. L. V.; JÚNIOR, P. M. R. Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1416-1423, 2009.

TEIXEIRA, H.; PAULA JUNIOR T. J.; VIEIRA, R. F., SILVA, M. B., FERRO, C. G., LEHNER, M. S. *Trichoderma* spp. decrease *Fusarium* root rot in common bean. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 38, n. 4, p. 334-336, 2012.

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN Biochemistry**, v. 2013, New York, p. 1-10, 2013.

THATCHER, L. F., ANDERSON, J. P., SINGH, K. B. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? **Functional Plant Biology**, Camberra, v. 32, p. 1-19, 2005.

THORDAL-CHRISTENSEN, H.; ZHANG, Z.; WEI, Y.; COLLINGE, D. B. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. **The Plant Journal**, Hoboken, v. 11, n. 6, 1997.

TIWARI, R.; RANA, C. S. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, Lumbini, v. 3, n. 5, 2015.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, London, v. 15, n. 2, p. 161–173, 2014.

UCHÔA, C. N.; POZZA, E. A.; JÚNIO, P. M. R.; UCHÔA, K. S. A.; TOYOTA, M.; MORAES W. S.; M FREITAS M. L. O.; SILVA, B. M. Acibenzolar-S-Metil e silício como indutores de resistência à Sigatoka-negra em bananeira cultivar Grand Naine (AAA). **Agrarian**, Dourados, v. 7, n. 24, p. 189-196, 2014.

UNDERWOOD, W. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion. **Frontiers in Plant Science**, Rockville, v. 3, n. 85, p. 1-6, 2012.

VAN DER ENT, S. V.; VAN WEES, S. C. M.; PIETERSE, C. M. J. Jasmonate signaling in plant interactions with resistance-inducing beneficial microbes. **Phytochemistry**, New York, v. 70, n. 13-14, p. 1581-1588, 2009.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. Significance of inducible defence-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.44, p.135-162, 2006.

VIMAL, S. R.; SINGH, J. S.; ARORA, N. K.; SINGH, S. Soil-plant-microbe interactions in stressed agriculture management: a review. **Pedosphere**, Nanjing, v. 27, n. 2, p. 177–192, 2017.

VITTI, A.; PELLEGRINI, E.; NALI, C.; LOVELLI, S.; SOFO, A.; VALERIO, M.; SCOPA, A.; NUZZACI, M. *Trichoderma harzianum* T-22 Induces Systemic Resistance in Tomato Infected by *Cucumber mosaic virus*. **Frontiers in Plant Science**, Rockvile, v. 7, n. 1520, p. 1-11, 2016.

VOLTAN, R. B. Q.; WUTKE, E. B.; BULISANI, E. A.; AMBROSANO, E. J.; SORDL, G. S.; PEREIRA, J. C. V. N. A. I. Botânica e fisiologia de plantas comparação da morfologia de folhas lisas e rugosas de plantas de feijoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 50, n. 1, p. 1-15, 1991.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 10, n. 12, p. 828-840, 2012.

WALTERS, D. R.; FOUNTAINE, J. M. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. **Journal of Agricultural Science**, New York, v. 147, p. 523–535, 2009.

WALTERS, D. R.; RATSEP J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 5, p. 1263–1280, 2013.

WANG, W. H.; HE, E. M.; GUO, Y.; TONG, Q. X.; ZHENG, H. L. Chloroplast calcium and ROS signaling networks potentially facilitate the primed state for stomatal closure under multiple stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 122, p. 85-93, 2016.

WENDLAND, A.; MOREIRA, A. S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN, J. S.; LOBO JÚNIOR, M. Doenças do feijoeiro. In. AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO A.; CAMARGO L. E. A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2016, p. 383-395, 2016

WHITE, J.; MONTES-R, C. Variation in parameters related to leaf thickness in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 91, p.7-21, 2005.

WOOD, R. M.; PATRICK, J. W. OFFLER, C. E. The Cellular Pathway of Short-distance Transfer of Photosynthates and Potassium in the Elongating Stem of *Phaseolus vulgaris* L. Stem Anatomy, Solute Transport and Pool Sizes, **Annals of Botany**, London, v. 73, n. 2, 1994.

YOSHIOKA, Y.; ICHIKAWA, H.; NAZNIN, H. A.; KOGURE, A.; HYAKUMACHI, M. Systemic resistance induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma asperellum* SKT-1, a microbial pesticide of seedborne diseases of rice. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 68, p. 60-66, 2012.

YUAN, Z.; DRUZHININA, I. S.; LABBÉ, J.; REDMAN, R.; QIN, Y.; RODRIGUEZ, R.; ZHANG, C.; TUSKAN G. A; LIN, F. Specialized Microbiome of a Halophyte and its Role in Helping Non-Host Plants to Withstand Salinity. **Scientific Reports**, London, v.6, p. 1-13, 2016.

ZELICOURT, A.; AL-YOUSIF, M.; HIRT, H. Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance. **Molecular Plant**, Maryland, v. 6, n. 2, p. 242-245, 2013.

ZHU, Z. X.; ZHUANG, W. Y. Three new species of *Trichoderma* with hyaline ascospores from China. **Mycologia**, New York, v. 107, n. 2, p. 328-345, 2015.

ZURBRIGGEN, M. D.; CARRILLO, N.; HAJIREZAEI, M. ROs signaling in the hypersensitive response. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v.5, n.4, p. 393-396, 2010.