

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

OMARI DANGELO FORLIN DILDEY

**INTERAÇÃO *TRICHODERMA*-FEIJOEIRO E SEUS EFEITOS NA FISIOLOGIA E  
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA CONTRA ANTRACNOSE (*Colletotrichum  
lindemuthianum*)**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

OMARI DANGELO FORLIN DILDEY

**INTERAÇÃO *TRICHODERMA*-FEIJOEIRO E SEUS EFEITOS NA FISIOLOGIA E  
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA CONTRA ANTRACNOSE (*Colletotrichum  
lindemuthianum*)**

Dissertação apresentada a Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal - Nível Mestrado, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn

Co-orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM AGRONOMIA

OMARI DANGELO FORLIN DILDEY

**INTERAÇÃO *TRICHODERMA*-FEIJOEIRO E SEUS EFEITOS NA FISIOLOGIA E  
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA CONTRA ANTRACNOSE (*Colletotrichum  
lindemuthianum*)**

Dissertação apresentada como pré-requisito de conclusão de curso do programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal - Nível Mestrado da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Marechal Candido Rondon, 27 de Fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

---

Odair José Kuhn  
Prof. Dr., CCA/UNIOESTE

---

José Renato Stangarlin  
Prof. Dr., CCA/UNIOESTE

---

Márcia de Holanda Nozaki  
Prof. Dra., ECAMV/PUCPR

À Deus Pai e a Jesus Cristo,  
Que abençoou com a vida e com o equilíbrio de sua perfeita criação,  
Aos meus amados pais, os maiores incentivadores desta jornada,  
Dedico.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito”.

“Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King).

## AGRADECIMENTOS

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

Agradeço a minha família, meus pais amados Maria Aparecida Dildey e Mário Dildey, pelo apoio e incentivo, pelas sábias palavras de conforto proporcionado durante toda minha existência, pela compreensão e por todos os esforços não medidos para que eu pudesse chegar ao final desta jornada. E a meu irmão Odair Diego Dildey, pelo apoio e compreensão.

Ao meu orientador Professor Dr. Odair José Kuhn, pela oportunidade, orientação, atenção, compreensão, ensinamento, paciência e pelas sábias palavras em todos os momentos.

Ao professor co-orientador Dr. José Renato Stangarlin pela ajuda, ensinamentos e disponibilidade no desenvolvimento de diversas metodologias.

Aos meus grandes amigos Edilaine Della Valentina Gonçalves, Cristiane Cláudia Meinerz, Emanuele Dal'Maso, Nicanor Pilarski Henkemeier, Vanessa Félix Vaz, Alice Jacobus de Moraes, Márcia Vargas Toledo, Sidiane Coltro-Roncato, Laline Broetto, Jeferson Klein, Heloísa Ferro Constâncio Mendonça, Rogério Lopes Estevez e Marta Bianchini os quais estiveram constantemente presentes e colaboraram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos André Spohr, Djenifer Probest, Adriano Loch, Priscila Juliana Trebien, Bruna Rissato, Eloisa Lorenzetti, Marlon Hahn e todos os meus colegas de pós-graduação pela amizade e companheirismo, estando sempre ao meu lado, compartilhando todos os momentos, tristes ou felizes.

Aos Professores Dra. Luciana Zago Ethur, Dr. Vandeir Francisco Guimarães, Dra. Márcia de Moraes Echer e Dr. Edmar Soares de Vasconcelos.

A todos os professores, funcionários e vigias da UNIOESTE que colaboraram de forma direta ou indireta no desenvolvimento do trabalho.

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

À EMBRAPA- CNPAF - Arroz e feijão pelo envio do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* para o desenvolvimento de experimentos.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões e considerações.

E a todos meus amigos (as) que de alguma forma estiveram presentes e contribuíram para a realização desta obra, minha gratidão.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de confrontação direta de cultura. Fonte: Rodrigues (2010). ..... 30
- Figura 2.** Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999). ..... 34
- Figura 3.** Médias de notas atribuídas pelo teste de pareamento de culturas para avaliação da agressividade dos isolados de *Trichoderma* spp., quanto à inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*. Nota 1 indica alta agressividade e nota 7 indica ausência de agressividade. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*). \* Médias seguidas com mesma letra indica ausência de significância entre os tratamentos pelo teste de Skott-Knott a 5%. CV% = 34,95 e Média = 2,22. .... 37
- Figura 4.** Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) em plantas de feijoeiro em função do tratamento de semente com isolados de *Trichoderma* spp., após 30 dias da germinação, TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*). Controle: Solo ausente de *Trichoderma* spp.. \*Ausência de letra indica ausência de significância entre os tratamentos pelo teste de Skott-Knott a 5%. Fotossíntese: CV% = 29,36 e DMS = 8,77; Respiração: CV% = 45,56 e DMS = 1,68, Barras indicam desvio padrão. .... 44

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação, espécie e origem dos isolados utilizados nos experimentos. ....	26
<b>Tabela 2.</b> Escala utilizada para teste de pareamento de culturas proposto por Rodrigues (2010). ....	29
<b>Tabela 3.</b> Caracterização química do solo. Marechal Cândido Rondon, abril/2013 .....	31
<b>Tabela 4.</b> Atividade de peroxidase (POX - unidade de enzima <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> tecido fresco), polifenoloxidase (PFO - unidade de enzima <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> tecido fresco), fenilalanina amônia-liase (FAL - µg <sup>-1</sup> ácido <i>trans</i> -cinâmico h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> tecido fresco) e β-1,3 glucanase (β-GASE - µg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> massa fresca) em raízes e folhas de feijoeiro no tratamento de semente com isolados de <i>Trichoderma</i> spp., após 30 dias da germinação. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 ( <i>T. virens</i> ); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 ( <i>Trichoderma harzianum</i> ); TLB6 ( <i>Trichoderma asperellum</i> ); TLB14, TLB17 ( <i>Trichoderma koningiopsis</i> ); TOD2A, TOD2B ( <i>Trichoderma longibrachiatum</i> ) .....	40
<b>Tabela 5.</b> Presença (+) e ausência (-) de colonização endofítica de raízes de feijoeiro por isolados de <i>Trichoderma</i> spp., após 30 dias da germinação.....	46
<b>Tabela 6.</b> Atividade de peroxidase em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 ( <i>Trichoderma virens</i> ); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 ( <i>Trichoderma harzianum</i> ); TLB6 ( <i>Trichoderma asperellum</i> ); TLB14, TLB17 ( <i>Trichoderma koningiopsis</i> ); TOD2A, TOD2B ( <i>Trichoderma longibrachiatum</i> ) .....	48
<b>Tabela 7.</b> Atividade de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 ( <i>Trichoderma virens</i> ); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 ( <i>Trichoderma harzianum</i> ); TLB6 ( <i>Trichoderma asperellum</i> ); TLB14, TLB17 ( <i>Trichoderma koningiopsis</i> ); TOD2A, TOD2B ( <i>Trichoderma longibrachiatum</i> ) .....	50

**Tabela 8.** Atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*) ..... 52

**Tabela 9.** Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*) ..... 55

**Tabela 10.** Teor de clorofila na folha de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*) ..... 57

**Tabela 11.** Severidade de antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*) ..... 59



## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Cultura do feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Antracnose – <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Controle biológico.....</b>	<b>16</b>
<b>2.4 <i>Trichoderma</i> sp. – aspectos gerais .....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Interações planta – fungo.....</b>	<b>18</b>
<b>2.6 Indução de resistência .....</b>	<b>19</b>
<b>2.7 Mecanismos de indução de resistência .....</b>	<b>20</b>
2.7.1 Peroxidases (EC 1.11.1.7) .....	21
2.7.2 Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1) .....	22
2.7.3 Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5) .....	23
2.7.4 $\beta$ -1,3 glucanases (E C 3.2.1.39).....	23
<b>2.8 Trocas gasosas.....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Isolados de <i>Trichoderma</i>.....</b>	<b>26</b>
3.1.1 Obtenção dos isolados .....	26
3.1.2 Obtenção do inóculo .....	27
3.1.2.1 Conídios em suspensão.....	27
3.1.2.2 Grãos de arroz colonizados.....	27
3.1.2.3 Obtenção dos metabólitos secundários de <i>Trichoderma</i> .....	28

<b>3.2</b>	<b>Obtenção do inóculo de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i></b> .....	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Ensaio <i>in vitro</i></b> .....	<b>28</b>
3.3.1	Crescimento micelial de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> confrontado com isolados de <i>Trichoderma</i> .....	28
<b>3.4</b>	<b>Ensaio <i>in vivo</i> 1</b> .....	<b>30</b>
3.4.1	<i>Trichoderma</i> como indutor de resistência em plantas de feijoeiro.....	30
3.4.1.1	Preparo do substrato de cultivo .....	30
3.4.1.2	Avaliação das trocas gasosas.....	31
3.4.1.3	Avaliação da colonização endofítica das raízes de feijoeiro.....	32
<b>3.5</b>	<b>Ensaio <i>in vivo</i> 2</b> .....	<b>32</b>
3.5.1	Indução de resistência de feijoeiro tratado com <i>Trichoderma</i> para proteção contra <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	32
3.5.1.1	Teor de clorofila.....	34
3.5.1.2	Avaliação da severidade.....	34
<b>3.6</b>	<b>Enzimas relacionadas à defesa</b> .....	<b>35</b>
3.6.1	Obtenção dos extratos protéicos .....	35
3.6.2	Atividade de peroxidase .....	35
3.6.3	Atividade de polifenoloxidase .....	35
3.6.4	Atividade de fenilalanina amônia-liase .....	36
3.6.5	Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase .....	36
<b>3.7</b>	<b>Análise dos resultados</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Ensaio <i>in vitro</i></b> .....	<b>37</b>
4.1.1	Crescimento micelial de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> confrontado com isolados de <i>Trichoderma</i> .....	37

<b>4.2</b>	<b>Ensaio <i>in vivo</i> 1.....</b>	<b>39</b>
4.2.1	<i>Trichoderma</i> como indutor de resistência em plantas de feijoeiro.....	39
4.2.1.1	Atividade enzimática.....	39
4.2.1.2	Atividade de peroxidase.....	40
4.2.1.3	Atividade de polifenoloxidase.....	41
4.2.1.4	Atividade de fenilalanina amônia-liase .....	42
4.2.1.5	Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase.....	43
4.2.1.6	Taxa de assimilação líquida CO <sub>2</sub> (A).....	43
4.2.1.7	Avaliação da colonização endofítica das raízes de feijoeiro.....	45
<b>4.3</b>	<b>Ensaio <i>in vivo</i> 2.....</b>	<b>47</b>
4.3.1.	Indução de resistência de feijoeiro tratado com <i>Trichoderma</i> spp. a proteção contra <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	47
4.3.1.1	Atividade de peroxidase.....	47
4.3.1.2	Atividade de polifenoloxidase.....	50
4.3.1.3	Atividade de fenilalanina amônia-liase.....	51
4.3.1.4	Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase.....	54
4.3.1.5	Teor de clorofila.....	56
4.3.1.6	Severidade de antracnose.....	58
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>63</b>

## RESUMO

DILDEY, Omari, D. F. Mestrado em Agronomia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2014. **Interação *Trichoderma*-feijoeiro e seus efeitos na fisiologia e indução de resistência contra antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*)**. Orientador: Dr. Odair José Kuhn. Coorientadore: Dr. José Renato Stangarlin.

Agentes indutores bióticos como *Trichoderma* spp. são alternativas de utilização para a indução de resistência ativando mecanismos de defesa das plantas. Este trabalho teve como objetivo estudar a interação dos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. em feijoeiro no controle da antracnose, avaliando os efeitos na indução de resistência. Foram conduzidos 3 experimentos, sendo um *in vitro* e dois em condições de casa de vegetação. *In vitro* foi avaliada a agressividade de 21 isolados de *Trichoderma* pelo método do confronto direto de cultura contra o *C. lindemuthianum*. Em casa de vegetação o feijoeiro foi cultivado e tratado com isolados de *Trichoderma* spp. (ensaio *in vivo* 1), os quais foram inoculados via tratamento de semente em solo esterilizado. Um segundo ensaio foi conduzido o qual recebeu inoculação dos 21 isolados inoculados via deposição de arroz colonizado no sulco e pulverização de exsudato via foliar dos mesmos isolados. Foram realizadas coletas de folhas e raízes para determinação da atividade enzimática antes da aplicação dos exsudatos, depois da aplicação dos exsudatos e coleta após a inoculação do patógeno. Foi realizada análise das enzimas de defesa (peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), fenilalanina amônia-liase (FAL) e  $\beta$ -1,3-glucanase ( $\beta$ -GASE)). Para verificar a capacidade de colonização endofítica dos isolados, fragmentos de raízes do feijoeiro foram sanitizadas e dispostas em placas de Petri contendo meio BDA. Foi avaliada também a taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, teor de clorofila e severidade de antracnose nas plantas de feijoeiro. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os isolados TI2, TI4, TLB3, TLB12 (*T. harzianum*); TI3, TM2 (*T. virens*); TLB6 (*T. asperellum*); TLB14, TLB17 (*T. koningiopsis*) foram considerados como muito eficientes e os isolados TI1, TM4, TLB9, TLB15 (*T. virens*); TLB2, TLB4, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*); TOD2A, TOD2B (*T. longibrachiatum*) foram considerado como eficientes no confronto direto contra *C. lindemuthianum*. Os isolados de *Trichoderma* spp., TI2 e TI4 (*T. harzianum*), TM4, TLB2, TLB9, TLB15, TOD1 (*T. virens*); TLB17 (*T. koningiopsis*) colonizaram as raízes de feijoeiro, conferindo a capacidade endofítica do microrganismo nas raízes do feijoeiro. Isolados de *Trichoderma* interferem no metabolismo do feijoeiro, atuando endofiticamente. Os isolados TI1, TM1, TLB15 (*T. virens*); TI2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*); TLB6 (*T. asperellum*); TLB14, TLB17 (*T. koningiopsis*); TOD2B (*T. longibrachiatum*) suprimiram a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase no tecido foliar, sendo considerados supressores para indução da defesa das plantas de feijoeiro. A atividade das enzimas de defesa na indução de resistência de feijoeiro tratado com *Trichoderma* spp. para proteção a *C. lindemuthianum* não demonstraram grandes alterações. Os isolados não interferiram na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e não alteraram o teor de clorofila. A incidência de severidade de antracnose em plantas de feijoeiro, não apresentou diferença significativa por meio do tratamento via semente/solo e pulverização dos exsudato via foliar na interação dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados. Contudo o manejo com *Trichoderma* spp. não pode ser descartado e requer maiores estudos nesse patossistema.

**Palavras-chaves:** *Phaseolus vulgaris* L., enzimas de defesa, proteínas relacionadas à patogênese, controle alternativo.

## ABSTRACT

DILDEY, Omari, D. F. Master's degree in Agronomy. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, february 2014. ***Trichoderma*-bean plant interaction and its effects on physiology and induction of resistance against anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*)**. Mentor: Dr. Odair José Kuhn. Joint Supervisor: Dr. José Renato Stangarlin.

Biotic inducing agents such as *Trichoderma* spp. are alternative uses for the resistance induction by activating plants mechanisms of defense. This work aimed to study the interaction of *Trichoderma* spp different isolates in bean plant on anthracnose control by evaluating the effects on the induction of resistance. Three experiments were conducted, one *in vitro* and two under greenhouse conditions. *In vitro* the aggressiveness of 21 *Trichoderma* isolates was evaluated by the culture direct confrontation method against *C. lindemuthianum*. In the greenhouse the bean plant was grown and treated with *Trichoderma* spp. (*in vivo* assay 1), which was inoculated via seed treatment in sterilized soil. A second assay was conducted which received inoculation from the 21 isolates inoculated via colonized rice deposition in the furrow and foliar spray of exudates of the same isolates. Leaves and roots collections for the enzyme activity determination before the exudates application, after the exudates application and collects after the inoculation were carried out. Analysis of defense enzymes (peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PPO), fenilalanina ammonia-lyase (PAL), and  $\beta$ -1,3-glucanase ( $\beta$ -GASE)) was held. To check the endophytic colonization ability of the isolates, fragments of bean plant's roots were sanitized and placed in Petri dishes containing PDA media. The net rate of CO<sub>2</sub> assimilation, chlorophyll content and anthracnose's severity on bean plants were also evaluated. The data were subjected to variance analysis and compared by the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ). The isolates TI2, TI4, TLB3, TLB12 (*T. harzianum*); TI3, TM2 (*T. virens*); TLB6 (*T. asperellum*); TLB14, TLB17 (*T. koningiopsis*) were considered as very efficient and the isolates TI1, TM4, TLB9, TLB15 (*T. virens*); TLB2, TLB4, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*); TOD2A, TOD2B (*T. longibrachiatum*) were considered as efficient in direct confrontation against *C. lindemuthianum*. The isolates of *Trichoderma* spp, TI2 and TI4 (*T. harzianum*), TM4, TLB2, TLB9, TLB15, TOD1 (*T. virens*); TLB17 (*T. koningiopsis*) colonized the bean plant's roots, giving the microorganism endophytic ability on bean plant's roots. *Trichoderma* isolates interfere with the bean plant metabolism, acting endophytically. The isolates TI1, TM1, TLB15 (*T. virens*); TI2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*); TLB6 (*T. asperellum*); TLB14, TLB17 (*T. koningiopsis*); TOD2B (*T. longibrachiatum*) suppressed the  $\beta$ -1,3-glucanase activity in the leaf tissue, being considered as suppressors for the induction of defense on bean plants. The defense enzymes activity on the resistance induction of the bean plant treated with *Trichoderma* spp. for protection against *C. lindemuthianum* showed no major changes. The isolates did not affect the net rate of CO<sub>2</sub> assimilation and did not change the chlorophyll content. The incidence of anthracnose's severity on bean plants, showed no significant difference by treatment via seed/soil and foliar spray of the exudates on the interaction of *Trichoderma* spp. evaluated. However the management with *Trichoderma* spp. cannot be ruled out and requires further studies in this pathosystem.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris* L., defense enzymes, pathogenesis-related proteins, alternative control.

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) está exposta a fatores que causam redução da sua produtividade e qualidade final do grão. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, com produção de 3,61 milhões de toneladas na safra 2012/1013 (CONAB, 2013). No entanto, vários são os problemas fitossanitários, principalmente pela ação dos fitopatógenos, que nesta cultura apresentam grande potencial destrutivo gerando enormes prejuízos na produção do país, além de diminuir a qualidade fisiológica, nutricional e sanitária do produto (MAPA, 2014).

A antracnose é uma das principais doenças da cultura do feijoeiro, é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* o qual esta presente em todas as regiões produtoras do mundo. A doença ocorre em cultivares suscetíveis em locais com temperaturas moderadas a fria e alta umidade relativa do ar, podendo causar perdas de até 100% (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Os prejuízos podem ser amenizados pelo uso de fungicidas, contudo os efeitos colaterais ao meio ambiente e a saúde humana, causados pelo uso de produtos químicos utilizados para o controle, motivam o desenvolvimento de novos métodos alternativos de controle de doenças. Agentes de controle biológicos como *Trichoderma* sp. são alternativas para utilização de biocontrole, com finalidade de manter em baixos níveis, grupos de microrganismos fitopatogênicos, seja por controle biológico ou por indução de resistência (MELLO et al. 2007; LOUZADA et al., 2009).

O *Trichoderma* é um fungo encontrado naturalmente em diferentes tipos de solos, vivendo saprofiticamente e parasitando outros fungos, comportando-se como antagonista a vários fitopatógenos, sendo um dos fungos mais pesquisados na atualidade, uma vez que, são capazes de atuarem como agentes de controle biológico, como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doença em diferentes culturas (LOUZADA et al., 2009).

O controle biológico é considerado um dos mecanismos que podem ocorrer simultaneamente durante todo o ciclo de vida do antagonista, cuja capacidade do mesmo pode induzir a síntese de substâncias com ação antagônica pela produção de metabólitos secundários que inibem ou estimulam o desenvolvimento de um microrganismo ou planta. Também, pela indução de resistência, ativando os mecanismos de defesa das plantas,

sinalizados por eliciadores produzidos por estes antagonistas (PAPAVIZAS, 1985; RIDOUT; COLEY-SMITH; LYNCH, 1988).

A interação planta e fungo possuem relações endofíticas, estabelecendo ações simbióticas ainda não muito bem compreendidas, mas de grande importância para as plantas (AZEVEDO, 1998). Nas interações, os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos secundários que podem conferir diversas vantagens, como a indução de resistência pela ativação de mecanismos de defesa ausentes ou presentes em baixos níveis na planta (HAMMERSCHMIDT; DANN, 1997; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000).

Na agricultura, a realização de pesquisas com utilização de fungos do gênero *Trichoderma*, como produtos indutores de resistência é uma alternativa que tem por objetivo o controle de doenças, estando associado ao manejo integrado da cultura a fim de reduzir os impactos ambientais ocasionados pelos produtos químicos.

Desta forma, o trabalho teve como objetivo estudar a interação dos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. em feijoeiro no controle da antracnose, avaliando os efeitos na fisiologia e indução de resistência através da atividade das enzimas de defesa como peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e  $\beta$ -1,3-glucanase.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro é uma dicotiledônia originária das Américas, pertencente a família Leguminosae da ordem Rosales, gênero *Phaseolus*, esse gênero possui cerca de 55 espécies, cujo nome científico é *Phaseolus vulgaris* L.. É uma planta herbácea, que pode apresentar hábitos de crescimento determinado ou indeterminado, seu ciclo de vida anual varia de, aproximadamente 60 a 120 dias, dependendo das condições, época de plantio e da cultivar. Com vagens retas ou ligeiramente curvas, achatadas ou arredondadas, com bico reto ou curvar, em geral com 9 a 12 cm de comprimento e com 3 a 7 sementes (VIEIRA; VIEIRA; VIEIRA, 2001; SANTOS e GOVILANES, 2006; GONÇALVES, 2008).

Seu cultivo é bem adaptado em regiões de áreas que tenham outonos e primaveras mais ou menos longos, suficientes para completar o seu ciclo, não se prestando aquelas onde o verão e o inverno são muito rigoroso. A temperatura média para a cultura varia de 10 a 25 °C (ALMEIDA e CANÉCHIO FILHO, 1987). A alta temperatura superior a 30 °C, pode ocasionar, dependendo da cultivar, diminuição da porcentagem de flores e do número de sementes por vagem. Por outro lado as baixas temperaturas são desfavoráveis ao crescimento, e as geadas podem causar enormes danos a cultura (VIEIRA; VIEIRA; VIEIRA, 2001).

O feijoeiro é uma das espécies mais cultivadas entre as leguminosas, servindo de alimento para grande parte da população mundial. O feijão é de grande importância econômica e social para a alimentação humana, por ser responsável pelo suprimento de grande parte das necessidades nutricionais, servindo de fonte básica e barata de nutrientes para todas as classes sociais da população (BORÉM; CARNEIRO, 1998).

No Brasil o cultivo do feijão é bastante difundido em todo o território nacional, tendo importância principalmente no cultivo de pequenas propriedades. A produção nacional se concentra nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. Apesar disso, a produção brasileira é insuficiente para abastecer o mercado interno, necessitando importação destes produtos de outros países como América Latina e dos Estados Unidos (EMBRAPA, 2014).

Em todas as regiões onde a cultura do feijoeiro é praticada, a mesma pode ser afetada por inúmeros fatores, entre eles estão, as doenças (causada por vírus, bactérias, fungos e nematoides), acidez do solo, disponibilidade hídrica, condição nutricional, ataque de insetos



pragas. Esses são alguns fatores que afetam a redução da produtividade da cultura do feijoeiro (FAGERIA e STONE, 1999; SILVEIRA e STONE, 1998).

## 2.2 Antracnose – *Colletotrichum lindemuthianum*

A antracnose do feijoeiro é causada pelo fungo *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Lams. – Scrib., em sua fase anamórfica, produz micélio septado e ramificado, de coloração hialina a quase negra, na medida de seu envelhecimento, os conídios são hialinos, unicelulares oblongos a cilíndricos com ambas extremidades arredondadas, ou uma delas pontiaguda, os conidióforos apresentam-se envolvidos por uma massa gelatinosa de cor salmão, ocre ou rosa, agregados em 30 a 50 conidióforos por acérvulo (SUTTON, 1992; MEDEIROS, 2004).

A antracnose é uma das principais doenças foliares fúngicas causadora de grandes prejuízos na cultura do feijoeiro, em condições de temperaturas entre 13 a 27 °C e umidade relativa superior a 92%. É transmitido principalmente pelas sementes e possui grande capacidade de sobrevivência em restos culturais infectados, favorecendo o início de epidemias (SUTTON, 1992; BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Segundo Rava, Purchio e Sartorato (1994), no Brasil, a antracnose é capaz de limitar significativamente a produção de feijão, principalmente nas regiões serranas de estados das regiões Sul e Sudeste, onde as condições são favoráveis ao seu desenvolvimento. Diminuindo o rendimento da cultura, depreciando a qualidade do produto por ocasionar manchas no grão, tornando-o impróprio para o consumo.

O patógeno *C. lindemuthianum* pode desenvolver sintomas em todos os órgãos da parte aérea da planta. A infecção pela semente pode apresentar lesões levemente deprimidas, de cor marrom com bordas escuras, observado facilmente em sementes de tegumento claros. Nas vagens são encontradas lesões com características arredondadas, deprimidas e de cores escuras, em condições de elevada umidade relativa do ar, desenvolve uma massa rósea de esporos (ZAUMEYER; THOMAS, 1957). Nas nervuras das folhas, no caule e pecíolo, apresentam-se como manchas necróticas, de cor marrom escura e com bordas avermelhadas. A grande variabilidade da espécie *C. lindemuthianum* e o fato de haver várias espécies de leguminosas hospedeiras possibilita emergir vários patossistemas que apresentam certa resistência em relação às intervenções do seu controle (MEDEIROS, 2004).

O uso de variedades resistentes é uma alternativa importante que contribui para reduzir os danos causados pelo patógeno. No entanto, a grande variabilidade patogênica apresentada

pelo *C. lindemuthianum* dificulta a obtenção de variedades com resistência duráveis (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). Porém, algumas alternativas na agricultura como o controle alternativo e o controle biológico são promissores para manejo de fitopatógenos em diversas culturas.

Medidas complementares como, tratamento de semente com fungicida, remoção dos restos culturais e rotação de culturas utilizando espécies não hospedeiras como, a cultura do milho e a utilização de incorporação de agentes de controle biológico, podem apresentar resultados promissores no controle da antracnose do feijão (RAVA et al., 1993).

### 2.3 Controle biológico

Diversos autores definem vários conceitos de controle biológico de doenças e plantas. Entre inúmeras definições, pode-se relatar que o controle biológico é a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, nos seus estados de atividade ou de dormência, através de um ou mais organismos, realizado naturalmente ou pela introdução e manipulação do ambiente (BETTIOL; GHINI, 1995; BAKER; COOK, 1974; MARIANO, 2000).

Os mecanismos de controle biológico podem ocorrer simultaneamente durante todo o processo de vida do antagonista. A capacidade para produzir substâncias e seu efeito pode variar entre diferentes espécies e até mesmo entre isolados da mesma espécie (PAPAVIZAS, 1985; RIDOUT; COLEY-SMITH; LYNCH, 1988). Os princípios dos mecanismos do controle baseiam-se na relação antagônica como: amensalismo, predação, parasitismo, resistência induzida ou pela produção de metabólitos que inibem o desenvolvimento do outro. Entre eles, o parasitismo parece ser o mecanismo mais eficiente de antagonismo, pois dependem dos seus hospedeiros para sobrevivência (GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

A identificação de espécies antagônicas a determinados patógenos e suas aplicações em estudos *in vitro* e *in situ* levam ao entendimento dos processos pelo qual o biocontrole se aplica (VASCONCELOS, 2011). Ao contrário do controle químico o biocontrole não erradica completamente o patógeno de forma imediata, mas sua otimização esta direcionada a fatores preventivos ligados ao manejo integrado de doenças (BERNARDES, 2006).

De acordo com Bettiol e Ghini (1995), o controle biológico está diretamente influenciado pelo equilíbrio ambiental, com objetivo de criar um ambiente favorável ao

antagonista, interagindo em todo o sistema biológico. Esses métodos visam manter um equilíbrio no agroecossistema, de modo que a planta, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos antagonistas (BIZI et al., 2005).

Desta forma, a capacidade de atuar em diferentes plantas hospedeiras e um amplo espectro de ação, contra diferentes patógenos, é uma das características ideais na busca de novas alternativas de microrganismos com potencial antagônicos para o biocontrole (BETTIOL, 1991).

#### **2.4 *Trichoderma* sp. – aspectos gerais**

*Trichoderma* sp. são fungos encontrados naturalmente em quase todos os tipos de solo, principalmente os orgânicos, vivendo saprofiticamente ou parasitando outros fungos, estando entre os fungos mais pesquisados na atualidade como agente de biocontrole, sendo antagonista a vários fitopatógenos em diferentes culturas (ETHUR, 2006; SANTOS, 2008).

Pertence a classe Ascomycota, que produz abundantes conídios, a partir de células conidiogênicas, originando estruturas denominadas conidióforos, emergindo diretamente das hifas. Em seu estado telemórfico, quando conhecido, pertence à ordem Hypocreales (MELO; AZEVEDO, 1998; POLETTO, 2010).

A principal característica morfológica deste fungo é a presença de micélios, inicialmente de coloração branca e crescimento rápido. À medida que se desenvolve, torna-se cottonoso e esverdeado. A coloração da colônia exibe vários tons de verde, podendo ser influenciado pelo meio de cultivo (SANTIN, 2008; TEDESCO, 2009).

Em meio de cultura, as colônias de *Trichoderma* crescem rapidamente, apresentando inicialmente, uma superfície lisa e quase translúcida de coloração esbranquiçada, tornando-se flocosas ou compactas com coloração esverdeada a medida que envelhecem (MELO, 1991).

Várias espécies do *Trichoderma* sp. são consideradas eficientes antagonistas contra inúmeros fungos fitopatogênicos (BERNARDES; SILVEIRA; MESQUITA, 2010). A ação do *Trichoderma* sp. ocorre por meio da associação ou não dos mecanismos de parasitismo, antibiose e competição. Essa interação se inicia com a colonização da superfície externa das raízes, e pode ser restrita ou ocorrer por todo o rizoplano, seguida da produção de celulasas e da invasão da primeira ou da segunda camada de células da epiderme pelas hifas (AHMAD; BAKER, 1987; KERSHAM; TALBOT, 1998).

De acordo com Melo e Azevedo (1998), fungos deste gênero são micoparasitas necrotróficos. Tem demonstrado melhor potencial antagonista na atuação em patógenos de solo menos especializados, como *Pythium* sp., *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* entre outros, pois, como é um organismo de solo, suas características são melhores expressas neste ambiente (ETHUR, 2006).

Os fungos desse gênero são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuar como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doença (LOUZADA et al., 2009).

## 2.5 Interações planta – fungo

As interações entre plantas e microrganismos são de extremo interesse para a agricultura, uma vez que uma parte da economia mundial tem por base a utilização de espécies vegetais (BARBIERI; CARVALHO, 2001). Grande parte dos fungos, como os endófitos, estabelece relações simbióticas com plantas. Microrganismos endofíticos são aqueles que vivem parte ou todo o seu ciclo de vida no interior de órgãos ou tecidos de plantas, sem lhe causar qualquer dano aparente aos seus hospedeiros (AZEVEDO, 1998; STURZ; CHRISTIE; NOWAK, 2000).

Uma boa parcela dos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habitam o interior das plantas, colonizando os tecidos saudáveis de partes aéreas e radiculares da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida (SOUZA et al., 2004).

Os microrganismos endofíticos foram relatados pela primeira vez no início do século XIX, mas foi Bary (1886) quem primeiro mencionou a diferença entre os endofíticos e os microrganismos patógenos de plantas. Os microrganismos endofíticos estão constantemente sendo descritos na literatura, atestando ser de grande diversidade ainda não explorada (AZEVEDO, 1999).

As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas. Nas interações simbióticas os microrganismos podem produzir ou induzir a produção de antibióticos a partir de metabólitos primários e secundários, podendo conferir diversas vantagens à planta tais como: o aumento da tolerância a estresses abióticos, a diminuição do ataque de insetos e o controle de microrganismos que causam doenças entre outras (PEREIRA, 1993; ARAÚJO, 1996; RODRIGUES; DIAS FILHO, 1996).

Na literatura encontram-se algumas referências de estudos envolvendo microrganismos endofíticos isolados de plantas medicinais. Desta forma, justifica-se o interesse em elucidar aspectos da biologia destes microrganismos, para compreender melhor a sua relação com a planta hospedeira e seu papel na produção de novos compostos (PILEGGI, 2006).

## **2.6 Indução de resistência**

A expressão indução de resistência pode ser designada como proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos tratados com o agente indutor, mas também pode indicar resistência sistêmica, que se manifesta em outro local diferente daquele onde foi aplicado o indutor (MORAES, 1992). Isso pode ocorrer através da ativação de genes que codificam diversas respostas e mecanismos de resistência induzida, aumentando o nível de resistência por meio da utilização de mecanismos de resistência, tais como as proteínas relacionadas à patogênese ( $\beta$ -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases), que são capazes de degradar a parede celular de fungos e bactérias patogênicos (SILVA et al., 2001; OSSWALD et al., 2004), aumento na atividade de enzimas oxidativas e glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (PASCHOLATI, 2011), e enzimas envolvidas na rota de síntese de fitoalexinas e acúmulo de lignina nos tecidos localizados próximos a penetração do patógeno, além de polifenoloxidasas e peroxidases (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

A indução de resistência é um processo onde a resistência das plantas contra fitopatógenos é induzida pela ativação de mecanismos de defesa latente existentes em resposta ao tratamento de agentes indutores classificados quanto sua origem biótica, tal como enzimas microbianas, microrganismos viáveis ou inativados e material de parede de fungo e células vegetais ou abiótica como ácido aminobutírico (COHEN, 1996), ácido 2,6 dicloroisonicotínico (HIJWEGWN; VERHAAR; ZADOKS, 1996) e acibenzolar-S-metil (ASM) (RESENDE; SALGADO; CAMPOS, 2001), além de metais pesados, luz ultravioleta, ácido salicílico, fosfitos e silicatos, entre outros (CAVALCANTI et al., 2005). O agente indutor é capaz de ativar ou induzir mecanismos de defesa nas plantas, sendo chamados de eliciador, a qual é uma molécula presente responsável pela ativação desses mecanismos (SMITH, 1996; BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

A resistência induzida na proteção das plantas contra fitopatógenos exhibe diversas vantagens, entre elas, a efetividade contra vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos;

estabilidade devido à ação de diferentes mecanismos de resistência; caráter sistêmico, persistente e natural de proteção; transmissão por enxertia; e presença do potencial genético para resistência nas plantas suscetíveis. A proteção induzida está ligada através do intervalo de tempo entre o tratamento com o eliciador e a inoculação do patógeno, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias específicas no metabolismo da planta, que são importantes no processo da resistência induzida (PASCHOLATI, 2003).

Entre inúmeros indutores bióticos utilizados atualmente, o fungo antagonista *Trichoderma* sp. vem sendo largamente utilizado como eliciador eficaz no controle de fungo fitopatogênicos em diversas culturas. Várias espécies desse fungo têm sido utilizadas tanto para controle de patógenos radiculares, como, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp., *Armillaria* spp., e como da parte aérea, como, *Venturia* spp., *Botrytis* spp., etc. (GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS; AUER, 2011).

## 2.7 Mecanismos de indução de resistência

A resistência de um hospedeiro a uma doença segundo Agrios (2005) pode ser definida sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno nos tecidos da mesma.

Os mecanismos de resistência das plantas são divididos em duas categorias, pré-formados (passivos ou constitutivos) e pós-formados (ativos ou induzíveis). Os pré-formados incluem aqueles já presentes nas plantas antes do contato com os patógenos. No caso dos pós-formados, que se mostram ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção, produzidos ou ativados em resposta a presença dos patógenos (PASCHOLATI, 2011). Os mecanismos estruturais são constituem-se como barreiras físicas, impedindo a penetração e/ou colonização dos tecidos pelo patógeno. Enquanto que as reações bioquímicas englobam substâncias tóxicas capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno no hospedeiro, gerando condições adversas para o crescimento e sobrevivência do mesmo no interior da planta (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Segundo Pascholati (2011), esses mecanismos compreendem, por exemplo:

- Pré-formados (passivos ou constitutivos):
  - Estruturais: cutícula, tricômas, estômatos e fibras/vasos condutores.
  - Bioquímicos: fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos sulfurados, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas e inibidores protéicos/peotídios.

- Pós-formados (ativos ou induzíveis):
  - Estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina.
  - Bioquímicos: fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese e espécies ativas de oxigênio.

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos são desencadeados por estímulos químicos ou físicos provenientes da ação de fitopatógenos os quais funcionam como sinal ou desencadeador da produção de um sinal inicial, o qual promove alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves, como fenilalanina amônia-liase, no metabolismo secundário, bem como enzimas relacionadas a produção de compostos de defesa como as peroxidases e enzimas relacionadas diretamente na atividade de lise de compostos ou estruturas do patógeno, como as  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases (CAVALCANTI et al., 2005).

Essa resistência é relatada em diversas espécies, apresentando defesa contra vários microrganismos, necessitando de um tempo após o tratamento indutor para que o mesmo se estabeleça e para que seja mantido por um longo período (MÉTRAUX, 2001).

As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) são responsáveis pela resposta de defesa vegetal a fitopatógenos, ocorrendo grandes mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel (STINTIZI et al., 1993). Pode-se dizer que essas proteínas são induzíveis no hospedeiro constituindo de resposta à infecção por um patógeno ou um composto abióticos, e podem estar correlacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno (LINTHORST, 1991).

Outro mecanismo de resistência é a reação de hipersensibilidade, que consiste na formação de barreiras químicas alocadas no ponto de penetração, sendo um dos mais eficientes mecanismos de defesa de planta contra patógeno, neste processo são sintetizadas espécies reativas de oxigênio e fitoalexinas, as quais impedem o desenvolvimento de atividade biológica, matando não somente o patógeno como a própria célula vegetal (STINTIZI et al., 1993).

#### 2.7.1 Peroxidases (EC 1.11.1.7)

A enzima peroxidase (POX) e suas isoformas participam de vários processos fisiológicos de grande importância, pela sua participação na hipersensibilidade, suberização,

metabolismo de parede celular e produção de fitoalexinas, catalisando a oxidação e eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio originando lignina, importante mecanismo físico de defesa vegetal (GASPAR et al., 1982; KUHN, 2007).

A POX está envolvida em diversas reações, entre elas, ligações de polissacarídeos, ligações de monômeros, lignificação, oxidação de ácido indol-3-acético, oxidação de fenóis, cicatrização de ferimentos, defesa contra patógenos e regulação da elongação de células entre outras (GASPAR et al., 1982; KAO, 2003). A reação clássica desta enzima é a oxidação desidrogenativa do guaiacol (*o*-metoxi-fenol) (HIRAGA et al., 2001). Além disso, as POX têm sido relacionadas à uma variedade de processos envolvidos na defesa, cujo interesse maior envolve o papel que elas desempenham no bloqueio de um patógeno (NICHOLSON e HAMMERSCHMIDT, 1992).

Mudanças na atividade das POX têm sido frequentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas (BONATTI et al., 1994). Com relação a biossíntese de lignina, um polímero complexo formado principalmente de unidade de fenilpropanóides, cujo radicais se polimerizam formando lignina, juntamente com celulose e outros polissacarídeos que ocorrem na parede celular das plantas, funcionando como uma barreira física à penetração do patógeno. A lignificação pode impedir o desenvolvimento do patógeno nos tecidos vegetais, estabelecendo barreiras mecânicas ao crescimento do patógeno, modificação da parede celular tornando-a mais resistente ao ataque de enzimas hidrolíticas, aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelo patógeno, impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (PASCHOLATI, 2011).

### 2.7.2 Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1)

As enzimas polifenoloxidase (PFO) agrupa um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis (*o*-difenois) transformando-os em quinonas (*o*-quinonas) constituindo uma atividade de difenolase. Para algumas plantas, essas enzimas podem também catalizar a *o*-hidroxilação de monofenóis, constituindo atividade de monofenolase (MAYER e HAREL, 1979). São também referidas na literatura como fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinases (OKOT-KOTBER et al., 2002).



A PFO geralmente é abundante em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência. A importância da atividade das PFO na resistência a doenças, provavelmente, à sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original. Por esta razão, o aumento na atividade das PFO resulta em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação, portanto, maior nível de resistência à infecção (AGRIOS, 2005).

As PFO e POX lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximos ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos. A PFO está diretamente envolvida no processo de escurecimento em alimentos, principalmente em frutas e hortaliças, durante o processamento e armazenamento (CARNEIRO, 2003).

### 2.7.3 Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5)

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é a enzima chave do metabolismo dos fenilpropanóides na grande maioria das plantas e tem sido indicada por seu importante papel no controle de acúmulos fenólicos em resposta à infecções (STRACK, 1997). A fenilalanina amônia-liase é uma enzima que está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que a mesma cataliza é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos (TAIZ e ZEIGER, 2009).

A FAL é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

E em meio ao fenômeno da indução de resistência, a FAL é uma das enzimas largamente estudada por fisiologistas por causa da sua importância chave no metabolismo secundário das plantas (KUHN, 2007).

### 2.7.4 $\beta$ -1,3 glucanases (E C 3.2.1.39)

As  $\beta$ -1,3 glucanases ( $\beta$ -GASE) atuam na ação catalítica da hidrólise do polímero de  $\beta$ -1,3-glucana. Em plantas essa ação se torna importante, pois durante a invasão fúngica, ataca

diretamente a estruturas da parede celular do patógeno degradando  $\beta$ -1,3-glucana, principal componente estrutural dos fungos (PANG et al., 2004).

A ação da  $\beta$ -GASE produz monômeros com massa molecular entre 25 a 35 kDa e que produzem oligômeros com dois a seis unidades de glicose a partir do substrato laminarina, uma  $\beta$ -1,3-glucana (CAVALCANTI et al., 2005). Exibem formas básicas, que ocorrem normalmente intracelularmente (nos vacúolos), e ácidas, que ocorrem extracelularmente, e possuem ação imediata na defesa das plantas, pela ação direta nas hifas invasoras (MARTINS et al., 2008).

O acúmulo e a síntese de  $\beta$ -GASE e quitinase são enzimas líticas que hidrolisam a quitina. Essas hidrolases são encontradas normalmente em tecidos vegetais e são principalmente envolvidas na defesa das plantas contra os fungos, uma vez que são constituintes da parede celular fúngica. A atividade destas enzimas pode ser desencadeada em resposta a infecção de patógeno, metabólitos provenientes de microrganismos ou substâncias químicas que agem como indutores de resistência (PASCHOLATI, 2011).

Juntamente com quitinase, as  $\beta$ -GASE representam hidrolases antifúngicas, as quais atuam sinergisticamente para inibir o crescimento fúngicos. Além disso,  $\beta$ -GASE liberam fragmentos glicosídicos, tanto do patógeno, quanto da própria parede celular da planta, os quais podem atuar como eliciadores de defesas do hospedeiro (CUTT; KLESSIG, 1992).

## **2.8 Trocas gasosas**

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 do dossel 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 adotado, sendo, portanto, importantes condicionadores da arquitetura do dossel (LOPES et al., 2013).

As determinações de variáveis ecofisiológicas são muito importantes, não somente na compreensão do comportamento vegetativo das plantas, mas no seu desempenho pontual em relação as respostas aos tratamentos impostos (NOGUEIRA; SILVA-JUNIOR, 2001).

De acordo com Floss (2004), cerca de 90% da produção biológica das plantas ocorre em resposta à atividade fotossintética. Assim, a verificação das trocas gasosas constitui-se uma importante ferramenta na determinação de adaptação e estabilidade de plantas a

determinadas condições, isto porque a redução no crescimento das plantas ou o seu aumento pode estar relacionada à redução ou aumento na atividade fotossintética (consequente a redução ou incremento na produtividade), limitada ou promovida por fatores bióticos ou abióticos no ambiente de cultivo (PEIXOTO; MATTA; CAMBRAIA, 2002; PAIVA et al., 2005).

Desta forma, a quantificação das trocas gasosas realizadas nas folhas compreendendo assimilação líquida de  $\text{CO}_2$ , concentração interna de  $\text{CO}_2$  na câmara subestomática, transpiração, condutância estomática, eficiência do uso de água entre outros está intimamente relacionada ao estado hídrico do vegetal, bem como seu desenvolvimento (NOGUEIRA et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolados de *Trichoderma*

##### 3.1.1 Obtenção dos isolados

Foram utilizados 21 isolados de *Trichoderma* spp., sendo 4 (TOD1, TOD2A, TOD2B, TOD3) isolados de solo e 17 isolados (TI1, TI2, TI3, TI4, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB6, TLB9, TLB12, TLB14, TLB15, TLB17), provenientes da coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *campus* de Marechal Cândido Rondon, PR. Foram isolados de solos de mata nativa de propriedades agrícolas em sistema de produção orgânico do oeste Paranaense e do oeste do Rio Grande do Sul, e solos de Santa Rosa de Monday, Paraguai (Tabela 1).

**Tabela 1.** Identificação, espécie e origem dos isolados utilizados nos experimentos.

Isolado	Espécie	Origem
TI1	<i>Trichoderma virens</i>	Itaqui - RS
TI2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Itaqui - RS
TI3	<i>Trichoderma virens</i>	Itaqui - RS
TI4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Itaqui - RS
TM1	<i>Trichoderma virens</i>	Maçambará - RS
TM2	<i>Trichoderma virens</i>	Maçambará - RS
TM3	<i>Trichoderma virens</i>	Maçambará - RS
TM4	<i>Trichoderma virens</i>	Maçambará - RS
TLB2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Marechal Cândido Rondon - PR
TLB3	<i>Trichoderma harzianum</i>	Marechal Cândido Rondon - PR
TLB4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Cascavel - PR
TLB6	<i>Trichoderma asperellum</i>	Missal - PR
TLB9	<i>Trichoderma virens</i>	Céu Azul - PR
TLB12	<i>Trichoderma harzianum</i>	Entre Rios do Oeste - PR
TLB14	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Santa Helena - PR
TLB15	<i>Trichoderma virens</i>	Missal - PR
TLB17	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Medianeira - PR
TOD1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Santa Rosa Del Monday - PY
TOD2A	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Santa Rosa Del Monday - PY
TOD2B	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Santa Rosa Del Monday - PY
TOD3	<i>Trichoderma harzianum</i>	Santa Rosa Del Monday - PY

Após a coleta dos solos, os fungos *Trichoderma* spp. foram isolados pelo método de isca, inserindo-se os mesmos no solo escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* por um período de 20 dias. Posteriormente, procedeu-se o método de isolamento direto (ETHUR et al., 2005).

Todos os isolados foram identificados em nível de gênero de acordo com as características citadas por Melo (1996) e para identificação em nível de espécie os isolados foram encaminhados para o Instituto Biológico de São Paulo.

### 3.1.2 Obtenção do inóculo

#### 3.1.2.1 Conídios em suspensão

Para induzir o fungo *Trichoderma* spp. à esporulação, discos de batata-dextrose-ágar (BDA) contendo micélio e conídios dos isolados de *Trichoderma* spp., foram transferidos para erlenmeyer contendo arroz (20 g de arroz para 25 mL de água e autoclavado por 20 min a 120 °C), em seguida, mantidos em BOD por 7 dias a  $25 \pm 2$  °C em escuro (SILVA et al., 2011).

Após sete dias, 50 mL de água destilada autoclavada foi adicionada para realizar a lavagem do arroz, posteriormente, o conteúdo foi filtrado em béquer com auxílio de gaze para reter estruturas como micélio e restos de arroz, mantendo apenas suspensão de conídios dos isolados de *Trichoderma* spp.. A concentração de esporos foi ajustada para  $1 \times 10^8$  conídios/mL com câmara de Neubauer e com a adição de 1 mL de solução Tween a 0,02%.

#### 3.1.2.2 Grãos de arroz colonizados

Para induzir o fungo *Trichoderma* spp. à esporulação, discos de batata-dextrose-ágar (BDA) contendo micélio e conídios dos isolados de *Trichoderma* spp., foram transferidos para erlenmeyer contendo arroz (20 g de arroz para 25 mL de água e autoclavado por 20 min a 120 °C), em seguida, mantidos em BOD por 7 dias a  $25 \pm 2$  °C em escuro (SILVA et al., 2011).

### 3.1.2.3 Obtenção dos metabolitos secundários de *Trichoderma*

Os metabolitos secundários produzidos pelo *Trichoderma* spp. podem ser chamados de exsudatos. Os exsudatos foram produzidos em 200 mL de meio de cultura líquido BD (batata-dextrose), conforme descrito por Mello et al. (2007). Dois discos de meio BDA (5 mm de diâmetro) contendo micélio com esporos e hifas de *Trichoderma* spp. foram adicionados em Erlenmeyer (500 mL), em seguida, transferidos em agitador orbital constantemente a 180 rpm em temperatura de 25 °C, em fotoperíodo de 12 horas.

Após 12 dias de cultivo em agitação, as culturas foram filtradas em gaze, em seguida papel de filtro qualitativo Whatman nº 1: 11 µm, com auxílio de bomba a vácuo, para retirada de hifas e esporos da solução. A parte líquida da filtração contendo exsudatos foi congelada - 20 °C.

## 3.2 Obtenção do inóculo de *Colletotrichum lindemuthianum*

O patógeno foi cedido pela EMBRAPA- CNPAF, Arroz e feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. O fungo *C. lindemuthianum* raça 91 (Cl 1247-91, CNPAF- Embrapa), foi multiplicado e cultivado em meio ágar-vagem para crescimento e esporulação, mantidos em temperatura de 20 °C, fotoperíodo de 12 horas (RAVA e SARTORATO, 1994).

## 3.3 Ensaio *in vitro*

### 3.3.1 Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* confrontado com isolados de *Trichoderma*

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *campus* de Marechal Cândido Rondon, PR.

Para o confronto direto foi utilizado o teste de pareamento de cultura. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo disposto por 22 tratamentos, com três repetições. Os tratamentos foram constituídos por 21 isolados de *Trichoderma* spp. (antagonista confrontados com o patógeno) e um controle (somente o patógeno), distribuídos em 66 parcelas experimentais (placas de Petri).

Para isso, os discos de meio BDA (10 mm de diâmetro) contendo micélio do fitopatógeno *C. lindemuthianum* foram retirados de colônias com quatro dias de cultivo e depositados a uma distância de 0,5 cm da borda da placa de Petri, contendo cerca de 20 mL de meio BDA. Como testemunhas, foram utilizadas placas inoculadas unicamente com *C. lindemuthianum*.

O meio de cultura BDA foi ajustado pH 7,0. As placas foram incubadas por 48 horas em câmara escura, a 25 °C, fotoperíodo de 12 horas. Esse procedimento foi realizado para permitir a competitividade, uma vez que, o tempo de crescimento do patógeno é mais lento do que o tempo de crescimento do antagonista.

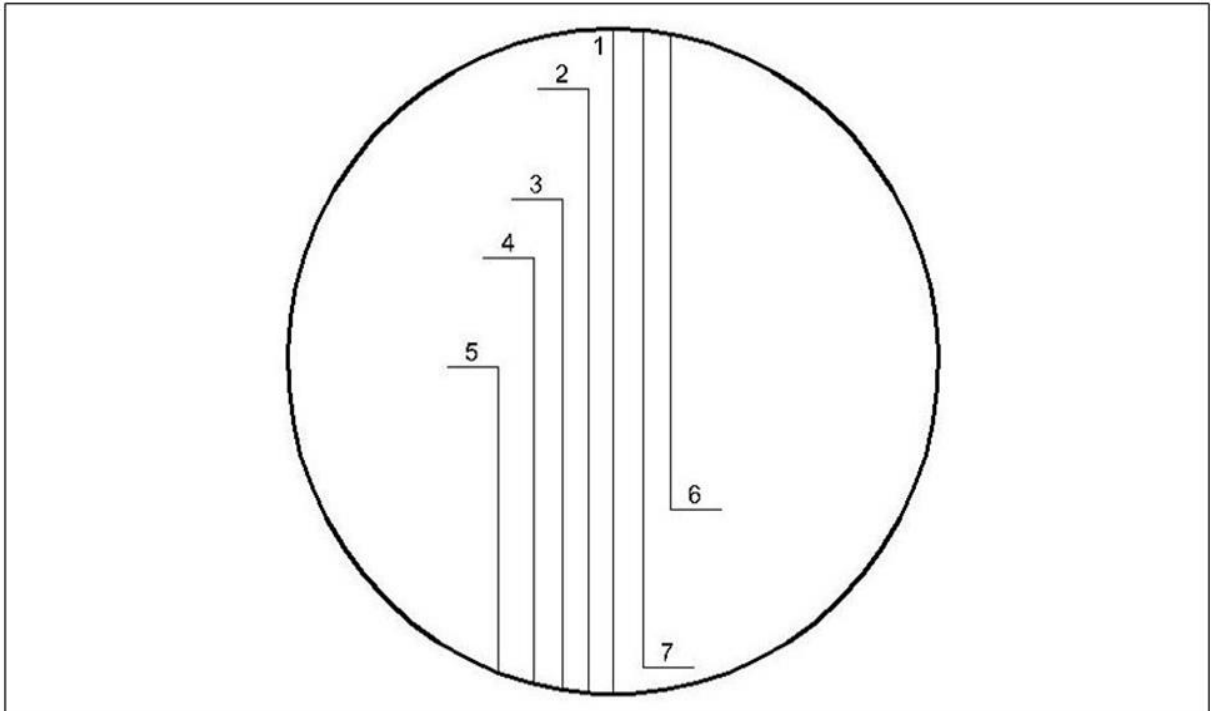
Após esse período, foi colocado um disco de meio BDA (10 mm de diâmetro) contendo micélio de *Trichoderma* spp. na extremidade oposta da placa de Petri (ETHUR, 2006). As placas foram incubadas em câmara de crescimento escura, a uma temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas.

Os dados foram coletados no sétimo dia de implantação do experimento, período em que as placas da testemunha apresentavam-se totalmente colonizadas. As avaliações foram quantificadas, de acordo com os critérios (Tabela 2) utilizando-se o modelo de notas proposto por Rodrigues (2010), atribuindo notas que variam de um a sete.

**Tabela 2.** Escala utilizada para teste de pareamento de culturas proposto por Rodrigues (2010).

Notas	Escala de avaliação
1	Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno;
2	Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não se sobrepõe o patógeno;
3	Antagonista cresce sobre $\frac{3}{4}$ da placa de Petri;
4	Antagonista cresce sobre $\frac{2}{3}$ da placa de Petri;
5	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa de Petri;
6	Patógeno cresce sobre $\frac{2}{3}$ da placa de Petri;
7	Patógeno cresce por toda a placa de Petri;

No momento da avaliação, quando as notas foram atribuídas, buscando uma melhor uniformidade nas avaliações, foi utilizado um gabarito sob o fundo das placas, em que era possível visualizar as notas conforme o crescimento das colônias (Figura 1).



**Figura 1.** Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de confrontação direta de cultura. Fonte: Rodrigues (2010).

### 3.4 Ensaio *in vivo* 1

#### 3.4.1 *Trichoderma* como indutor de resistência em plantas de feijoeiro

O experimento foi conduzido no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mario César Lopes, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* de Marechal Cândido Rondon, PR, durante o mês de outubro a novembro de 2013.

##### 3.4.1.1 Preparo do substrato de cultivo

As sementes de feijão foram semeadas em vasos plásticos, contendo substrato solo:areia:matéria orgânica na proporção de 3:2:1, mistura autoclavada por 25 minutos a 120°C repetindo-se a operação em 24 horas. O solo utilizado foi Latossolo Vermelho Eutroférico de textura muito argilosa (EMBRAPA, 2009), não sendo necessária a adubação complementar, conforme o resultado obtido na análise do solo (Tabela 3).



**Tabela 3.** Caracterização química do solo. Marechal Cândido Rondon, abril/2013

	Laudo de Análise Química do Solo										
	MO	P	PHCaCl <sub>2</sub>	H+Al	AL <sup>3+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	SB	CTC	V
	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	0,01mol l <sup>-1</sup>	-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----							%
Amostra	5,97	233,90	6,40	2,69	0,00	1,47	5,14	1,89	8,50	11,19	75,96

\* Análise realizada no Laboratório de Química Ambiental e Instrumental. Unioeste.

As sementes de feijão foram tratadas com o *Trichoderma* spp. no momento da semeadura, sendo aplicado 0,8 mL da suspensão de esporos descritos no item 3.1.2.1, por semente (BROETTO, 2013). Foram semeadas oito sementes de feijão em vasos plásticos, com capacidade de 3 litros, conforme descrito no item 3.4.1.1, com posterior desbaste, deixando-se apenas duas plantas por vaso. A cultivar de feijão utilizado foi IAPAR 81 do grupo carioca.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, sendo 22 tratamentos, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por 21 isolados de *Trichoderma* spp. e o controle (sem inoculação de *Trichoderma* spp.), distribuídos em 88 parcelas experimentais (vasos).

As avaliações de trocas gasosas e parâmetros bioquímicos foram realizados 30 dias após a emergência das plântulas de feijoeiro. Após a avaliação das trocas gasosas as amostras de tecido foliar e de tecido radicular foram coletadas, pesadas (0,5 g) e acondicionadas em envelopes de alumínio, congeladas e mantidas em freezer até o momento da extração para determinação da atividade das enzimas POX, PFO, FAL e  $\beta$ -GASE.

#### 3.4.1.2 Avaliação das trocas gasosas

Foi determinado a taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), sendo realizada no estágio final da condução do experimento, após 30 dias da germinação, antes da coleta de tecido foliar e radicular para a determinação das análises bioquímicas.

A respiração e fotossíntese foram avaliadas por métodos não destrutíveis, conforme utilizado por Ribeiro; Machado e Oliveira (2003), sendo que a medida de CO<sub>2</sub> e o fluxo de vapor d'água foram obtidas em folhas maduras e completamente expandidas, com o auxílio de um medidor portátil, sistema fechado, infravermelho de gás (IRGA), modelo LI-6400, da Li-Cor, Lincoln, NE, USA, na região do quarto trifólio e totalmente expostas à radiação solar.

A condição ambiental para o aparelho foi a mesma na qual as plantas cresceram. A assimilação de CO<sub>2</sub> foi medida pela manhã, entre 8 e 10 horas, sendo armazenada quando o coeficiente de variação do dado foi menor que 1%. A respiração foi medida pela noite, entre 21 e 23 horas com a fonte luminosa desligada sendo armazenado o valor de liberação de CO<sub>2</sub> quando o coeficiente de variação foi menor que 1%.

#### 3.4.1.3 Avaliação da colonização endofítica das raízes de feijoeiro

Após a coleta das amostras para as análises bioquímicas das raízes, uma porção de 10 cm de raiz de cada planta foi lavada e coletada para avaliar a capacidade dos isolados de *Trichoderma* spp., quanto sua capacidade de colonização endofítica, sendo realizado pelo método de isolamento indireto. Fragmentos de 1,5 cm de raiz, foram desinfestados superficialmente com álcool 70% (1 minuto), imersos em hipoclorito de sódio 3% (1 minuto) e lavados por três vezes em água destilada autoclavada. Em seguida, foram transferidos três fragmentos por placa de Petri, contendo meio BDA, em três repetições. As placas foram incubadas em BOD a 25 ± 2 °C em fotoperíodo de 12 h.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, sendo constituído por 22 tratamentos, sendo 21 isolados de *Trichoderma* spp, (raiz inoculada com antagonista) e um controle (raiz não inoculada), em três repetições com três fragmentos de raiz por repetição (placa de Petri).

A avaliação foi realizada aos 6 dias somente pela observação do crescimento do *Trichoderma* spp. a partir da raiz, metodologia descrita por Pedro (2012a), com alterações.

### 3.5 Ensaio *in vivo* 2

#### 3.5.1 Indução de resistência de feijoeiro tratado com *Trichoderma* para proteção contra *Colletotrichum lindemuthianum*

O experimento foi conduzido no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mario César Lopes, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *campus* de Marechal Cândido Rondon, PR.

As sementes de feijão foram semeadas em vasos plásticos com capacidade de 6 litros, conforme descrito no item 3.4.1.1.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, obedecendo ao esquema fatorial 23x2, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram da combinação de 21 indutores (*Trichoderma* spp.) e dois controles sendo um o controle positivo (planta inoculada com patógeno e semente sem inoculação de *Trichoderma* spp.) e o outro controle negativo (planta não inoculada com patógeno e semente sem inoculação de *Trichoderma* spp.), sob duas formas de tratamento sendo distribuídos em 184 parcelas experimentais (vasos).

- Forma 1 – sementes inoculadas com os isolados de *Trichoderma* spp. via solo;
- Forma 2 – pulverização dos exsudatos de isolados de *Trichoderma* spp. via folha;

Em cada vaso foram semeadas oito sementes de feijão, com posterior desbaste, deixando-se apenas seis plantas por vaso. A cultivar de feijão utilizado foi IAPAR 81 do grupo carioca.

No tratamento dos isolados de *Trichoderma* spp. via solo, as sementes foram inoculadas a partir de três grãos de arroz colonizados pelos isolados obtidos do item 3.1.2.2 que foram depositados junto as sementes no momento da semeadura, segunda metodologia descrita por Pedro et al. (2012b), com modificação na metodologia utilizada. Aos 20 dias após a emergência das plântulas de feijoeiro, foram realizadas duas coletas de tecido foliar para análises bioquímicas, seguindo roteiro abaixo:

- 1º coleta, sem inoculação do patógeno;
- 2º coleta no terceiro dia após a inoculação do patógeno.

No tratamento com pulverização dos exsudatos dos isolados de *Trichoderma* spp. via folha, a aplicação foi realizada como descrito no item 3.1.2.3. Aos 20 dias após a emergência das plântulas de feijoeiro, foram realizadas três coletas de tecido foliar para análises bioquímicas, como segue:

- 1º coleta, sem aplicação dos exsudatos de *Trichoderma* spp.;
- 2º coleta, terceiro dia após a aplicação dos exsudatos de *Trichoderma* spp.;
- 3º coleta, terceiro dias após a inoculação do patógeno.

Os exsudatos dos isolados foram inoculados nas plântulas de feijoeiro aos 23 dias após a sua emergência, sendo inoculados 10 mL de exsudato de cada isolados de *Trichoderma* spp. por vaso, através de pulverização foliar, com auxílio de borrifador manual de pressão acumulada.

A inoculação do patógeno *C. lindemuthianum*, foi realizada pelo processo de aspersão foliar nas plantas de feijoeiro, sendo pulverizado 10 mL por vaso, em suspensão ajustada para

$1,4 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , e aspersão de água destilada para tratamento controle negativo, preparada de acordo com o item 3.2, metodologia descrita por Campos et al. (2004).

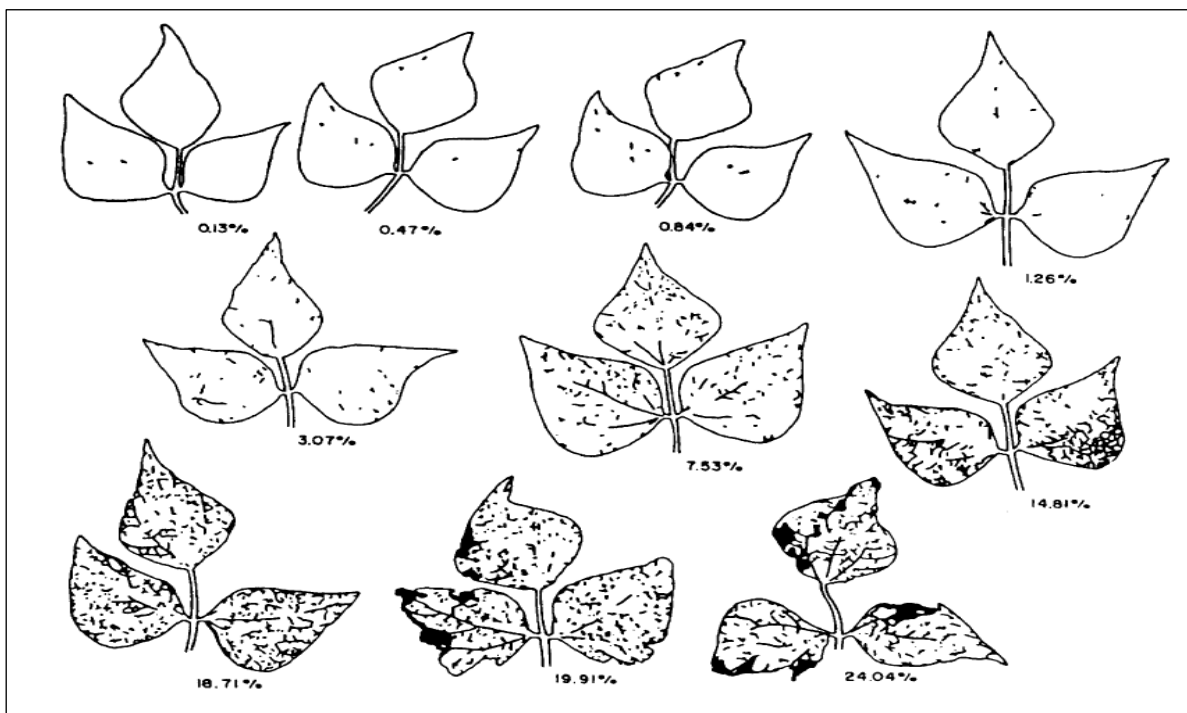
As avaliações foram efetuadas por meio de parâmetros bioquímicos, 26 dias após a emergência das plântulas de feijoeiro, sendo realizadas coletas das amostras de tecido foliar, pesadas e acondicionadas em envelopes de alumínio, congeladas e mantidas em freezer até o momento da extração para determinação da atividade das enzimas POX, PFO, FAL e  $\beta$ -GASE.

### 3.5.1.1 Teor de clorofila

A relação entre teor de clorofila nas folhas de feijoeiro foi determinada pela leitura do clorofilômetro SAPD, usando o aparelho portátil de clorofila (Minolta SPAD-502). Sendo realizada leitura antes de cada coleta das avaliações bioquímicas nas plantas inoculadas via semente e pulverização dos exsudatos via foliar de diferentes isolados de *Trichoderma* spp.

### 3.5.1.2 Avaliação da severidade

A avaliação da severidade da doença foi realizada 15 dias após a inoculação do patógeno *C. lindemuthianum*, através da área lesionada nas 7<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> folhas utilizando a escala diagramática (Figura 2), descrita por Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999).



**Figura 2.** Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amori e Canteri (1999).

### 3.6 Enzimas relacionadas à defesa

#### 3.6.1 Obtenção dos extratos protéicos

Os extratos proteicos foram obtidos de acordo com a metodologia de Lusso e Pascholati (1999). Para isso, as amostras de folhas e raízes (0,5 g) foram trituradas mecanicamente em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01mM (pH 6,0), sendo acrescentado 0,04 g de polivinil pirrolidona. A mistura foi centrifugada a 20.000g durante 25 min a 4 °C, o sobrenadante foi considerado como extrato enzimático, congelado a -20 °C, para posterior determinação da atividade das enzimas POX, PFO, FAL e  $\beta$ -GASE.

#### 3.6.2 Atividade de peroxidase

A atividade de POX foi determinada pelo método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm, por um período de 2 min, com medidas de densidade ótica a cada 15 segundos (HAMMERSCHIMIDT; NUCLES; KUC, 1982). A mistura da solução consistiu de 1.400  $\mu$ L do tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 100  $\mu$ L da preparação enzimática. Os resultados foram expressos pela atividade na variação entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear (U.E. unidade de enzima)  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  massa fresca).

#### 3.6.3 Atividade de polifenoloxidase

A atividade da PFO foi determinada usando a metodologia de Duangmal e Apenten (1999), adaptada por Kuhn e Pascholati (2010). O ensaio constitui em mensurar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação esta, medida pela enzima PFO. O substrato foi composto por catecol na concentração de 0,002 M, dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,8). A reação se desenvolveu misturando-se 900  $\mu$ L de substrato e 100  $\mu$ L da preparação enzimática. As leituras realizadas em espectrofotômetro, a 420 nm, sendo determinadas por um período de 1 min, com densidade ótica registrada a cada 15 seg. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores situados na faixa de incremento linea U.E. (unidade de enzima)  $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$  massa fresca.

### 3.6.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade da FAL foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, metodologia descrita por Umesha (2006), a qual 50  $\mu\text{L}$  da preparação enzimática foram acrescidos de 450  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de L-fenilalanina 0,05M. A mistura da reação, foi incubada a 40 °C por 2 h. No final do período, adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  de HCl 5 M para cessar a reação. A leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de FAL constituiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (100  $\mu\text{L}$  de extrato protéico e 900  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido *trans*-cinâmico ( $y = 0,0095x + 0,0255$ , onde  $y$  é a absorbância a 290 nm e  $x$  a concentração de ácido *trans*-cinâmico ( $\mu\text{g}$ )), expressa em  $\mu\text{g}$  ácido *trans*cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  massa fresca.

### 3.6.5 Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase

A atividade de  $\beta$ -GASE foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina (VOGELANG; BARZ, 1993). A reação envolveu 150  $\mu\text{L}$  da preparação enzimática e 150  $\mu\text{L}$  de laminarina ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ), que foi desenvolvida a 40 °C durante 1 hora. No controle, a laminarina foi adicionada após a incubação. Os açúcares formados foram quantificados pelo método de Lever (1972), que consiste em extrair uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  da solução anterior e acrescentar a esta 1,5 mL da solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico 0,5% (PAHBAH). A mistura foi mantida a 100 °C durante 10 min, resfriada em gelo por 10 min, e determinada a absorbância a 410 nm. A atividade de  $\beta$ -GASE consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle, a qual foi plotada em curva padrão para glicose ( $y = 0,002x + 0,0046$ , onde  $y$  é a absorbância e  $x$  a concentração de açúcares redutores ( $\mu\text{g}$ )) e expressa em equivalente glicose  $\mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  massa fresca.

## 3.7 Análise dos resultados

Após tabulados os dados foram submetidos a análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do software estatístico GENES versão 5.1 (CRUZ, 2013).

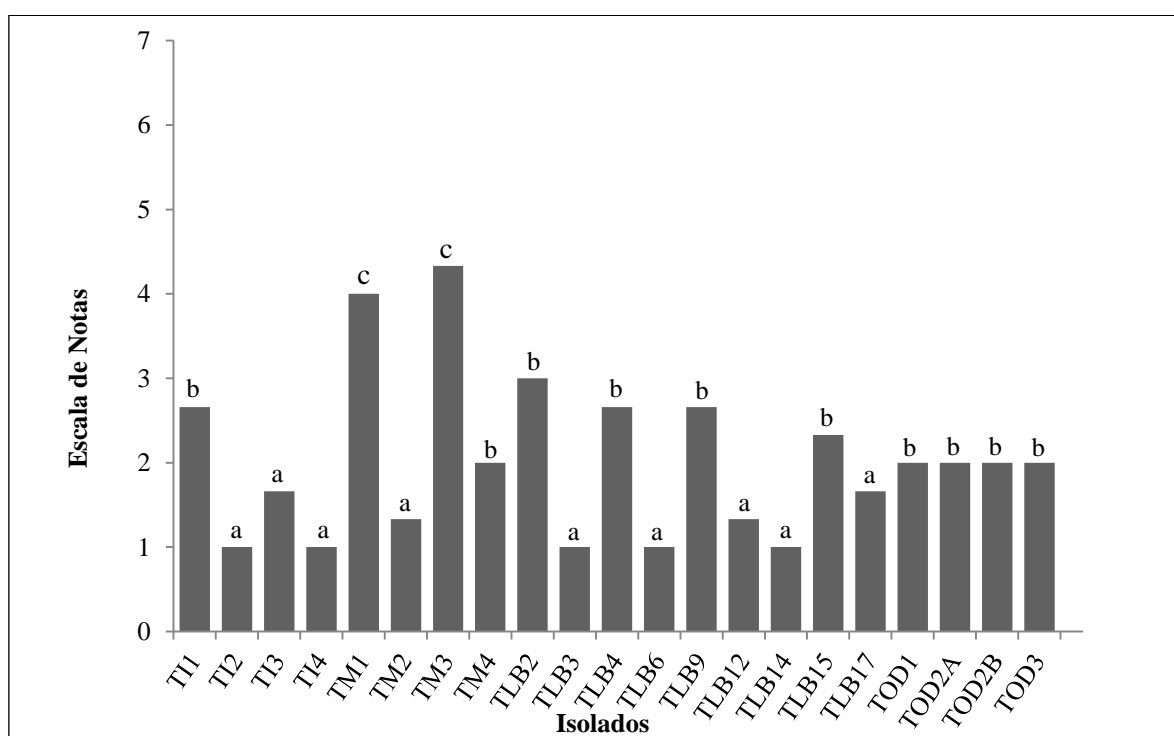
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio *in vitro*

#### 4.1.1 Crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* confrontado com isolados de *Trichoderma*

Os valores obtidos no pareamento de cultura apresentaram efeitos significativos nas notas atribuídas pela análise de variância entre os diferentes isolados de *Trichoderma* spp. confrontado com *C. lindemuthianum* (Figura 3).

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram crescimento micelial acelerado, sendo possível a observação de inibição do desenvolvimento da *C. lindemuthianum* em quatro dias de incubação.



**Figura 3.** Médias de notas atribuídas pelo teste de pareamento de culturas para avaliação da agressividade dos isolados de *Trichoderma* spp., quanto à inibição do crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum*. Nota 1 indica alta agressividade e nota 7 indica ausência de agressividade. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*). \* Médias seguidas com mesma letra indica ausência de significância entre os tratamentos pelo teste de Skott-Knott a 5%. CV% = 34,95 e Média = 2,22.

Os isolados de *Trichoderma* spp., quando comparados pelo teste de médias, foram separados em três grupos diferentes. Os isolados TI3, TM2 (*T. virens*), TI2, TI4, TLB3, TLB12 (*T. harzianum*), TLB6 (*T. asperellum*) e TLB14, TLB17 (*T. koningiopsis*) apresentaram menor nota (nota 1) crescendo por toda a placa de Petri e sobre o disco do patógeno, sendo considerado o grupo de maior eficiência, impedindo o desenvolvimento micelial de *C. lindemuthianum*, diferindo significativamente dos demais grupos.

O segundo grupo composto pelos isolados TI1, TM4, TLB9, TLB15 (*T. virens*), TLB2, TLB4, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*), TOD2A, TOD2B (*T. longibrachiatum*) apresentaram médias entre 2 e 3 respectivamente, crescendo por toda a placa de Petri, porém não sobrepondo o patógeno e antagonista ocupando 3/4 da placa de Petri. Este grupo pode ser considerado com menor eficiência no desenvolvimento micelial de *C. lindemuthianum*. O terceiro grupo separou os isolados TM1 e TM3 (*T. virens*), os quais não apresentaram inibição significativa na inibição do crescimento de *C. lindemuthianum*. Esse resultado corrobora com de Louzada et al. (2009), testando 230 isolados de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*, os quais verificaram que apenas 10% dos isolados (24 isolados) se mostraram eficientes no controle dos dois patógenos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Bomfim et al. (2010), quando avaliaram isolados de *Trichoderma* spp. no pareamento de cultura entre *Rhizopus stolonifer*. Segundo os mesmos autores, todos os isolados demonstraram rápido crescimento micelial em três dias de incubação, inibindo o desenvolvimento do patógeno.

Ethur (2006) demonstra que a seleção de isolados de *Trichoderma* spp. pela técnica de pareamento de cultura, considera como “eficientes” os isolados que apresentam média de notas entre 2 a 2,5 e isolados “muito eficientes” aqueles com média de notas de 1 a 1,5.

Alguns dos mesmos isolados utilizados neste trabalho corroboram com os resultados de Broetto (2013), que trabalhando com 17 isolados de *Trichoderma* spp. na inibição do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, sendo dividido em três grupo de isolados, somente o isolado TLB2 (*T. harzianum*) apresentou a mesma média de nota 1, sendo considerado de maior eficiência contra *M. phaseolina*. O mesmo é verificado para o segundo grupo, somente os isolados TM4, TLB9 (*T. virens*), TLB4 (*T. harzianum*) e TLB17 (*T. koningiopsis*), foram considerados com menor eficiência de inibição do patógeno.

Silva et al. (2008) observaram que isolados de *T. stromaticum*, *T. viride* e *T. virens* apresentaram maior antagonismo no pareamento de cultura contra a capacidade de supressão



de *Phytophthora citrophthora*, sendo que *Trichoderma stromaticum* apresentou neste trabalho maior antagonismo enquanto que o *T. harzianum* apresenta menor antagonismo ao patógeno.

A utilização do pareamento de cultura é efetiva ao antagonista *Trichoderma* spp. sobre o patógeno *C. lindemuthianum*, sendo demonstrada anteriormente por Melo (1998) e Delgado et al. (2007), onde a ação de *Trichoderma* se dá através da associação ou não dos mecanismos tais como parasitismo, antibiose e competição. A capacidade de produção de antibióticos ou outras substâncias secundárias pelos antagonistas pode interferir no desenvolvimento direto do fitopatógeno, bem como a competição destes por espaço e nutrientes. Além do parasitismo direto, outros mecanismos podem estar envolvidos na ação antagonista de fungos do gênero *Trichoderma* (LOUZADA et al., 2009).

Os métodos aplicados para seleção de antagonistas de *Trichoderma* spp. *in vitro*, além de serem práticos, servem como uma seleção preliminar para avaliar de potencial antagonista, e também para indicar o comportamento desses microrganismos, com relação à sua capacidade de adaptação, crescimento e reprodução (POLETTO, 2010). Contudo, não pode ser decisiva, pois Broetto (2013) observou que o isolado TLB12 de *Trichoderma harzianum* não foi eficiente no confronto com *Macrophomina phaseolina*, porém na redução da severidade da doença o mesmo foi altamente eficiente, indicando mecanismo associado a interação *Trichoderma*-feijoeiro.

## **4.2 Ensaio *in vivo* 1**

### 4.2.1 *Trichoderma* como indutor de resistência em plantas de feijoeiro

#### 4.2.1.1 Atividade enzimática

As atividades das enzimas POX, PFO, FAL e  $\beta$ -GASE foram determinadas e seus respectivos valores estão apresentados na Tabela 4.

Os resultados expressos da atividade enzimática de POX, PFO e FAL não demonstraram diferença estatística significativa entre os isolados de *Trichoderma* spp., porém, a atividade de  $\beta$ -GNASE foi reduzida pela ação de alguns isolados inoculados através do tratamento de semente em plantas de feijoeiro, apresentando diferença estatística somente no tecido foliar do feijoeiro.

## 4.2.1.2 Atividade de peroxidase

A atividade de POX, mesmo com ausência de diferença estatística entre os isolados, pode observar uma tendência de supressão das atividades pelos isolados TM1, TM4, TLB15 (*T. virens*), TOD2A (*T. longibrachiatum*) e TOD3 (*T. harzianum*) na expressão da atividade desta enzima no tecido foliar do feijoeiro, quando comparado ao controle (Tabela 4).

**Tabela 4.** Atividade de peroxidase (POX - unidade de enzima<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> tecido fresco), polifenoloxidase (PFO - unidade de enzima<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> tecido fresco), fenilalanina amônia-liase (FAL - µg<sup>-1</sup> ácido *trans*-cinâmico h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> tecido fresco) e β-1,3 glucanase (β-GASE - µg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> massa fresca) em raízes e folhas de feijoeiro no tratamento de semente com isolados de *Trichoderma* spp., após 30 dias da germinação. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*T. virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)

Isolados	ATIVIDADE ENZIMÁTICA							
	FOLHA				RAIZ			
	POX	PFO	FAL	β-GASE	POX	PFO	FAL	β-GASE
TI1	1066,22 a	438,72 a	31,48 a	869,70 a	776,85 a	655,15 a	51,54 a	1876,52 a
TI2	973,85 a	593,90 a	81,43 a	1318,42 a	1120,42 a	566,82 a	44,53 a	1678,07 a
TI3	779,27 a	506,65 a	21,25 a	1546,45 b	924,02 a	848,20 a	58,63 a	1592,40 a
TI4	850,67 a	516,97 a	30,03 a	1633,8 b	864,85 a	569,87 a	65,83 a	1630,20 a
TM1	747,05 a	629,37 a	43,11 a	1234,85 a	879,32 a	643,27 a	60,32 a	1640,30 a
TM2	827,52 a	601,92 a	97,78 a	1527,75 b	1018,20 a	852,25 a	42,87 a	1883,07 a
TM3	1065,47 a	581,02 a	162,43 a	1873,90 b	1226,87 a	741,62 a	50,75 a	1864,10 a
TM4	689,47 a	537,27 a	36,40 a	1698,47 b	819,25 a	500,25 a	39,15 a	1356,00 a
TLB2	911,25 a	512,05 a	94,99 a	2064,77 b	1080,15 a	655,22 a	49,71 a	1602,47 a
TLB3	1069,52 a	601,85 a	71,69 a	1302,17 a	1040,37 a	566,27 a	110,46 a	1833,70 a
TLB4	1045,30 a	590,30 a	38,95 a	1415,10 a	1121,90 a	775,07 a	48,95 a	1704,45 a
TLB6	1025,45 a	598,65 a	57,22 a	1395,10 a	746,45 a	715,12 a	67,54 a	1907,62 a
TLB9	973,52 a	662,97 a	64,39 a	2045,00 b	922,75 a	673,80 a	92,21 a	2050,42 a
TLB12	944,85 a	549,72 a	32,47 a	1033,17 a	878,35 a	671,85 a	71,14 a	2184,27 a
TLB14	911,07 a	583,15 a	48,25 a	1322,77 a	988,47 a	605,30 a	38,46 a	1791,10 a
TLB15	800,97 a	418,45 a	71,75 a	1308,60 a	641,70 a	546,20 a	58,21 a	1803,82 a
TLB17	1049,35 a	613,80 a	70,71 a	1263,40 a	854,45 a	700,82 a	54,02 a	2118,07 a
TOD1	1043,97 a	581,95 a	100,60 a	1366,50 a	982,92 a	522,27 a	56,49 a	1771,67 a
TOD2A	922,87 a	439,45 a	41,02 a	1831,80 b	933,87 a	595,92 a	70,58 a	1960,02 a
TOD2B	733,80 a	427,17 a	17,91 a	1187,20 a	714,12 a	632,15 a	71,45 a	2093,87 a
TOD3	827,20 a	519,42 a	77,40 a	1126,05 a	828,82 a	553,22 a	66,46 a	2252,90 a
Controle	1014,50 a	638,12 a	111,30 a	1747,75 b	890,17 a	644,25 a	64,07 a	2195,00 a
(CV%)	30,50	32,80	125,40	32,90	37,70	30,50	47,18	26,80
DMS	747,52	481,48	212,34	1274,71	921,97	523,91	75,90	1319,19

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não difere entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Controle: solo ausente de *Trichoderma* spp.. Dados transformados por  $\sqrt{x+1,0}$

Da mesma forma, os isolados TI1, TLB15 (*T. virens*), TOD2B (*T. longibrachiatum*) e TLB6 (*T. asperellum*), suprimiram a atividade da enzima no tecido radicular. No entanto, os isolados TM3 (*T. virens*), TI2, TLB4 (*T. harzianum*), apresentaram tendência de aumento da enzima POX no feijoeiro, comparados ao controle. Ao contrário do que aqui foi observado, a enzima POX é um bom marcador para se verificar o efeito do *Trichoderma* como indutor.

De acordo com Silva et al. (2011), verificando o efeito de 60 isolados de *Trichoderma* spp. na promoção do crescimento e indução de resistência sistêmica à antracnose em plantas de pepino, observaram diferença não significativas, quanto à ativação da enzima POX na plantas entre o sétimo e décimo quarto dia, após tratamento com *Trichoderma* spp., quando comparados com controle.

No entanto, Yedidia, Benhamou e Chet (1999) trabalhando com crescimento hidropônico de pepineiro inoculado com *Trichoderma* spp. verificaram aumento da enzima POX após intervalo de tempo inferiores a sete dias, porém não foi observado aumento da atividade aos 7 e 14 dias após o tratamento, enquanto que as plantas não tratadas apresentaram um aumento gradual ao longo do tempo, ambas as atividade nos tecidos foliares e radicular, conseqüentemente verificaram aumento da resposta de crescimento das plantas, assim confirmada pela primeira vez, o impacto direto deste fungo na interação fungo-planta.

O aumento da enzima POX nas folhas pode estar relacionada a uma resposta de defesa sistêmica, quanto a presença do *Trichoderma* na rizosfera, provavelmente a diminuição da atividade enzimática pode estar temporalmente correlacionada com a colonização das raízes pelo diferentes isolados de *Trichoderma* spp (YEDIDIA; BENHAMOU; CHET, 1999).

#### 4.2.1.3 Atividade de polifenoloxidase

Para a atividade de PFO, os resultados obtidos não apresentaram diferença estatística, no entanto, para os isolados TI1, TI3, TLB15, TM4 (*T. virens*), TOD2A, TOD2B (*T. longibrachiatum*) e TI4, TLB2 (*T. harzianum*), apresentaram uma tendência de supressão da atividade enzimática de PFO comparado com o controle para o tecido foliar (Tabela 4).

Já respectivamente no sistema radicular, a atividade dessa enzima nas plantas de feijão, demonstrou tendência de aumento para os isolados TI3, TM2, TM3 (*T. virens*), TLB4 (*T. harzianum*), porém pode-se observar que os isolados TLB15, TM4 (*T. virens*), TI2, TI4, TLB3, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*), suprimiram a atividade desta enzima.

Entretanto, Pereira et al. (2008), trabalhando com quitosana extraída de *Trichoderma* sp. e com filtrado de micélio de *Rhizopus* sp., obtiveram um efeito protetor em plantas de cacau, observando que a aplicação desses indutores bióticos, são capaz de promover o aumento da atividade das enzimas POX e PFO em comparação com a testemunha, na redução da murcha-de-verticílio do cacauzeiro.

Segundo Piño e Palazón (1996), citado por Campos et al. (2004), em determinadas situações, o metabolismo dos polifenóis, podem atuar como antioxidantes, levando a inativação de inúmeros campos de ativação da produção de enzimas fenolases. Em outro aspecto, essa supressão enzimática verificada seria um mecanismo de proteção do *Trichoderma* para não ser afetado por compostos tóxicos da oxidação de fenóis.

#### 4.2.1.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de FAL expressada, mesmo não apresentando diferença, para o tecido foliar, pode-se observar um aumento da atividade enzimática do isolado TM3 (*T. virens*) comparado ao controle, por outro lado, todos os isolados apresentaram tendência de supressão desta enzima, porém essa tendência é mais evidente nos isolados TI1, TI3, TM4 (*T. virens*), TI4, TLB4, TLB12 (*T. harzianum*) e TOD2B (*T. longibrachiatum*) (Tabela 4).

A expressão desta enzima no sistema radicular expressa uma tendência de aumento nos isolados TLB3 (*T. harzianum*), TLB9 (*T. virens*), porém, os isolados TI1, TM2, TM3, TM4 (*T. virens*), TI2, TLB2, TLB4 (*T. harzianum*), TLB6 (*T. asperellum*), TLB14 (*T. koningiopsis*), tenderam a suprimir supressão na atividade enzimática de FAL. Contudo, não são dados conclusivos perante o coeficiente de variação de 68% e a diferença não significativa verificada na análise estatística de dados.

Djonović et al. (2007), verificando resposta de defesa de planta no tratamento de raízes com *T. virens* em milho contra o agente patogênico *Colletotrichum graminicola*, não observaram mudanças significativas nos níveis de expressão de FAL, ao nível local e sistemicamente em folhas e raízes de plântulas de milho testadas após 48 h da inoculação do patógeno. Essa resposta pode ser complexa, pelo fato que, outros mecanismos como a produção de fitoalexinas isoflavonóides pode desempenhar respostas diferentes relacionadas à indução da enzima FAL.

#### 4.2.1.5 Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase

Para a atividade de  $\beta$ -GASE observou-se diferença significativa por este teste em tecido foliar do feijoeiro, o qual separou os isolados TI1, TM1, TLB15 (*T. virens*); TI2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*); TLB6 (*T. asperellum*); TLB14, TLB17 (*T. koningiopsis*); TOD2B (*T. longibrachiatum*), os quais suprimiram a atividade da enzima de  $\beta$ -GASE, porém em tecido de sistema radicular não constatou-se diferença, mas pode-se observar uma tendência de supressão mais evidente no isolado TM4 (*T. virens*) (Tabela 4).

Segundo Saksirirat, Charurak e Bunyatrachata (2009), trabalhando com quinze isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* observaram redução de 69,32 % dos sintomas, demonstrando que quatro isolados das espécies *T. harzianum* e *T. asperellum* induziram a planta à elevada atividade de  $\beta$ -GASE e quitinase nas folhas, em comparação às folhas não inoculadas, mostrando que essas espécies são promissoras para indução de resistência em defesa das plantas de tomateiro.

Os mesmos autores relatam que a enzima  $\beta$ -GASE é conhecida por desempenhar papel importante na degradação da parede celular dos fungos. Além disso, essa enzima está classificada com proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP). A síntese e acúmulo desta enzima em tecidos vegetais têm sido associados aos mecanismos de defesa de plantas contra doenças, inclusive em feijão, uma vez que podem ser desencadeadas por patógenos e metabólitos secundários de microrganismos, como *Trichoderma*, que agem como indutores de resistência (PASCHOLATI, 2011; VAN LOON; VAN STIEN, 1999).

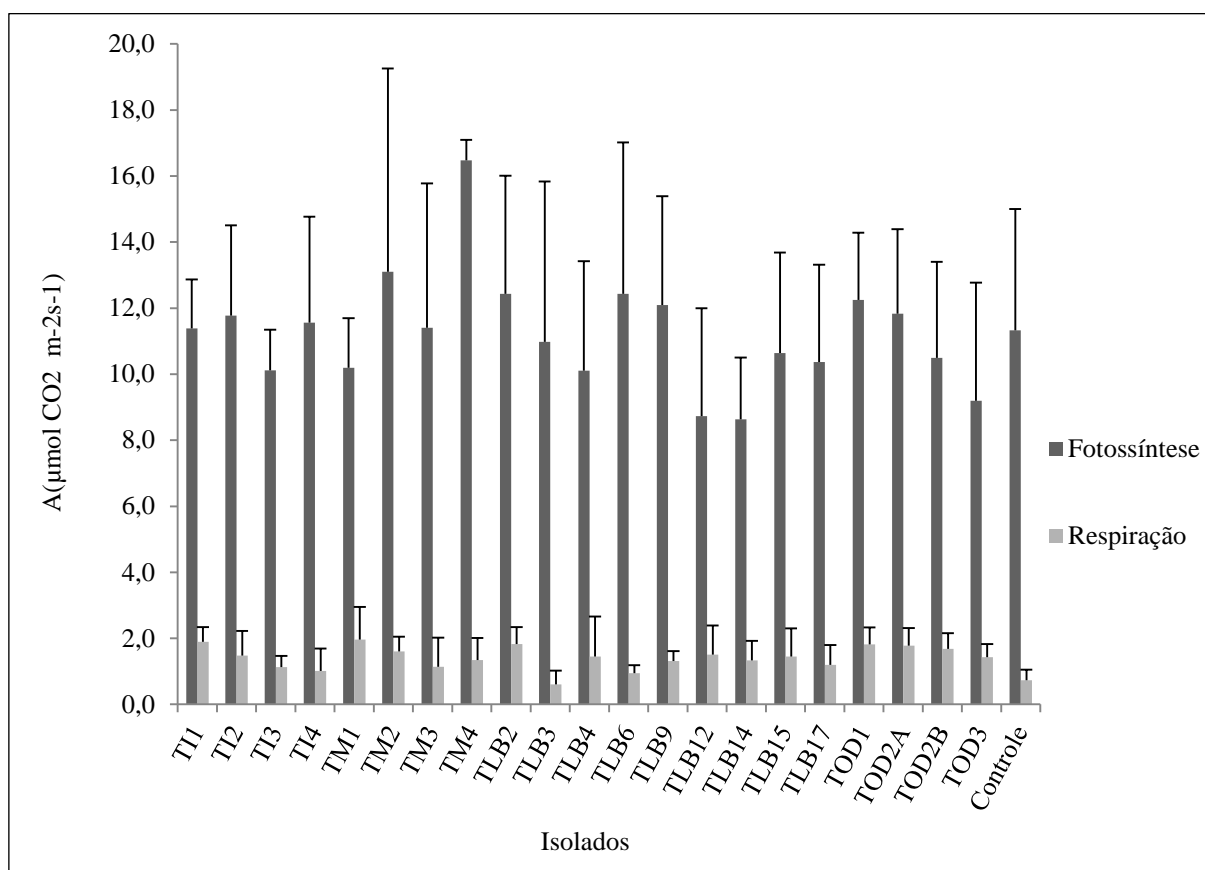
Segundo Salzman et al, (1998) essas proteínas induzidas não estão presentes necessariamente durante o processo de infecção, podendo ser encontradas em tecidos saudáveis de determinada parte da planta, como folhas ou raízes ou em estágios específicos de desenvolvimento.

Pode-se observar que os isolados de *Trichoderma* reduziram a atividade de  $\beta$ -GASE neste trabalho, porém, não pode ser encarada com estranheza, pois mecanismos de defesa contra fungos do ponto de vista dos fungos devem ser reduzidos ou pelo menos não elevados.

#### 4.2.1.6 Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A)

A taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> não sofreu alterações significativas na interação entre os isolados de *Trichoderma* spp. testados através da inoculação de semente e efeito na avaliação da fotossíntese e respiração das plantas de feijoeiro (Figura 4).

Na avaliação da fotossíntese, baseando-se pelo desvio padrão, observou-se que o isolado TM4 (*T. virens*), promoveu um aumento na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, no entanto, os isolados TLB12, TOD3 (*T. harzianum*) e TLB14 (*T. koningiopsis*) promoveram uma redução desta taxa, quando comparados ao controle. Entretanto, na avaliação da respiração quando comparada ao controle, que a maioria dos isolados apresentou tendência de aumento, porém o isolado TLB3 apresentou tendência de redução na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>.



**Figura 4.** Taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A) em plantas de feijoeiro em função do tratamento de semente com isolados de *Trichoderma* spp., após 30 dias da germinação, TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*). Controle: Solo ausente de *Trichoderma* spp.. \*Ausência de letra indica ausência de significância entre os tratamentos pelo teste de Skott-Knott a 5%. Fotossíntese: CV% = 29,36 e DMS = 8,77; Respiração: CV% = 45,56 e DMS = 1,68, Barras indicam desvio padrão.

Embora os isolados de *Trichoderma* spp. não demonstraram efeito na assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, outras variáveis como condutância estomática, concentração interna de CO<sub>2</sub>, transpiração e respiração, podem estar envolvidos na alteração da eficiência do uso da água e

a eficiência intrínseca do uso da água. Porém, trabalhos relacionados com eliciadores biológicos como o *Trichoderma* spp., são necessários para o desenvolvimento de novos resultados em relação ao comportamento fisiológico das plantas de feijoeiro para as variáveis de trocas gasosas.

Segundo Shores e Harman (2008), o fungo *Trichoderma* é capaz de estabelecer relações no sistema radicular em plantas de milho, podendo provocar alterações nas mesmas, que resultam aumento na taxa fotossintética. Estudos relatados por Gupta et al. (2011), os efeitos do *Trichoderma* são evidenciados em plantas de milho, submetidas à aplicação de fertilizantes à base de *Trichoderma*, que elevaram melhor assimilação de CO<sub>2</sub>, e o teor de clorofila, possivelmente, apresentando influência pelo fungo na transpiração e na condutância estomática.

O desenvolvimento da planta está intimamente relacionada com a quantificação das trocas gasosas realizadas nas folhas compreendendo a assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, como também a transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO<sub>2</sub> na câmara subestomática, eficiência do uso de água, entre outros que não foram avaliadas no presente trabalho (NOGUEIRA et al., 2000; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Essas variáveis são determinantes na fisiologia, sendo muito importantes, não somente na compreensão do comportamento vegetativo da planta, mas no seu desempenho em relação as respostas aos tratamentos aplicados. Além disso, a qualidade e a intensidade da luz são fatores ambientais que podem influenciar as trocas gasosas ocorridas nas plantas (COSTA e MARENCO, 2007).

#### 4.2.1.7 Avaliação da colonização endofítica das raízes de feijoeiro

Dos 21 isolados de *Trichoderma* spp. avaliados para colonização nas raízes das plantas de feijão, foi possível verificar que 8 isolados apresentaram a capacidade de endofitismo nas raízes (Tabela 5). Os resultados demonstram que esses isolados das espécies *T. virens* (TM4, TLB9, TLB15), *T. harzianum* (TI2, TI4, TLB2, TOD1) e *T. koningiopsis* (TLB17) são capazes de estabelecer relações com as raízes do feijoeiro, sendo considerados microrganismos endofíticos.

Esse resultado confirma a descrição feita por Metcalf e Wilson (2001), em que a interação *Trichoderma*-planta geralmente se dá na região das raízes e pode ocorrer em diferentes níveis de relação. Essa relação é pouco estudada, porém acredita-se que o fungo

estabelece-se como endófito, ou seja, ele coloniza não só as raízes, como também outras partes da planta, como descrito para a espécie *Trichoderma estromaticum*, o que foi relatado colonizando o sistema vascular de cacau (EVANS; HOLMS; THOMAS, 2003). O mesmo foi observado, para as espécies *T. harzianum*, *T. hamatum* e *T. asperellum*, que colonizam todas as partes da planta de cacau, desde as raízes até as folhas (BAILEY et al., 2007).

**Tabela 5.** Presença (+) e ausência (-) de colonização endofítica de raízes de feijoeiro por isolados de *Trichoderma* spp., após 30 dias da germinação

Colonização de Raízes de Feijoeiro		
Isolados	Espécie	Colonização
TI1	<i>Trichoderma virens</i>	-
TI2	<i>Trichoderma harzianum</i>	+
TI3	<i>Trichoderma virens</i>	-
TI4	<i>Trichoderma harzianum</i>	+
TM1	<i>Trichoderma virens</i>	-
TM2	<i>Trichoderma virens</i>	-
TM3	<i>Trichoderma virens</i>	-
TM4	<i>Trichoderma virens</i>	+
TLB2	<i>Trichoderma harzianum</i>	+
TLB3	<i>Trichoderma harzianum</i>	-
TLB4	<i>Trichoderma harzianum</i>	-
TLB6	<i>Trichoderma asperellum</i>	-
TLB9	<i>Trichoderma virens</i>	+
TLB12	<i>Trichoderma harzianum</i>	-
TLB14	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	-
TLB15	<i>Trichoderma virens</i>	+
TLB17	<i>Trichoderma koningiopsis</i>	+
TOD1	<i>Trichoderma harzianum</i>	+
TOD2A	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-
TOD2B	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	-
TOD3	<i>Trichoderma harzianum</i>	-
Controle*		-

\* Solo ausente de *Trichoderma* spp.

Esses resultados corroboram os de Benítez et al. (2004), os quais verificaram que isolados de *Trichoderma* spp. são capazes de colonizar raízes de plantas, produzindo compostos secundários que podem estimular o crescimento das plantas, como também, induzir resistência. O mesmo, já foi verificado por Pedro et al. (2012b), trabalhando com isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose em feijoeiro, demonstrou que sete isolados de *Trichoderma* spp., apresentaram capacidade de colonizar as raízes das plântulas de feijão, sendo possível verificar seu



crescimento nas placas de Petri, a partir das raízes. Porém estes resultados diferem dos resultados encontrados por Carvalho Filho et al. (2008), no qual trabalhando com *Trichoderma* em mudas de eucalipto não encontraram qualquer indício do fungo, em colonizar as raízes das mudas de eucalipto.

Da mesma forma, Harman et al. (2004) demonstraram que fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de reproduzir, competir e sobreviver em vários ecossistemas no solo. O gênero possui capacidade de associação em raízes de diversas plantas de várias espécies e sua penetração e colonização, associada a sua capacidade de antibiose, potencializa um arsenal enzimático hidrolítica degradadoras de parede celular.

A antibiose e o parasitismo são características de diversos fungos utilizados como agentes de biocontrole de fitopatógenos. As espécies de *Trichoderma* são conhecidas pela produção de diversos metabólitos secundários com ampla atividade antimicrobiana, com presença endofítica nas raízes, como também estimula o crescimento da planta, melhorando a absorção de nutrientes, promovendo de alguma forma o crescimento das plantas de feijoeiro e conseqüentemente aumentando a produtividade (PUNJA; UTKHEDE, 2003).

### **4.3 Ensaio *in vivo* 2**

#### 4.3.1 Indução de resistência de feijoeiro tratado com *Trichoderma* spp. a proteção contra *Colletotrichum lindemuthianum*

##### 4.3.1.1 Atividade de peroxidase

A atividade de POX em plantas de feijoeiro tratados com *Trichoderma* spp. na inoculação via semente apresentou diferença significativa na 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno), sendo observando o isolado TII (*T. virens*), uma tendência de aumento da atividade de peroxidase em comparação com a 2ª avaliação (terceiro dia após a inoculação do patógeno), em relação aos demais isolados de *Trichoderma* spp. avaliados no tratamento via semente. A inoculação dos isolados de *Trichoderma* spp. via semente apresentaram uma tendência de aumento dos resultados da atividade da enzima na 1ª avaliação, porém na 2ª avaliação, após a inoculação do patógeno *C. lindemuthianum*, fica evidente que a atividade de POX foi reduzida em comparação a 1ª avaliação entre isolados testados (Tabela 6).

**Tabela 6.** Atividade de peroxidase em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)

Isolados	Atividade de Peroxidase (unidade de enzima <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> tecido fresco)				
	Tratamento de Semente		Exsudato Via Foliar		
	1ªAvaliação <sup>1</sup>	2ªAvaliação <sup>2</sup>	1ªAvaliação <sup>3</sup>	2ªAvaliação <sup>4</sup>	3ªAvaliação <sup>5</sup>
TI1	1077,95 B a	4818,90 A a	1037,54 A a	727,85 A a	1001,53 A a
TI2	1096,95 A a	896,04 A b	833,97 A a	928,60 A a	718,36 A a
TI3	1237,71 A a	917,88 A b	1050,03 A a	1197,03 A a	1087,94 A a
TI4	1080,12 A a	658,94 A b	900,98 A a	983,16 A a	1040,45 A a
TM1	1176,58 A a	709,32 A b	660,07 A a	905,54 A a	959,66 A a
TM2	947,57 A a	1065,38 A b	959,40 A a	1052,51 A a	808,91 A a
TM3	1154,33 A a	970,94 A b	932,69 A a	936,21 A a	801,72 A a
TM4	1075,73 A a	784,40 A b	1039,46 A a	1046,97 A a	1335,44 A a
TLB2	1104,29 A a	976,54 A b	840,20 A a	925,94 A a	1037,69 A a
TLB3	1012,16 A a	864,86 A b	687,66 B a	1259,66 A a	1156,10 A a
TLB4	843,96 A a	832,64 A b	730,68 A a	946,93 A a	996,60 A a
TLB6	1179,42 A a	764,80 A b	875,58 A a	912,14 A a	877,24 A a
TLB9	933,37 A a	1001,05 A b	947,52 A a	865,80 A a	935,83 A a
TLB12	1052,99 A a	923,92 A b	806,75 A a	657,45 A a	715,12 A a
TLB14	956,41 A a	922,52 A b	810,34 A a	756,58 A a	775,08 A a
TLB15	1204,15 A a	970,56 A b	769,91 A a	1018,77 A a	1206,64 A a
TLB17	978,35 A a	755,39 A b	909,43 A a	1067,97 A a	1222,32 A a
TOD1	1156,73 A a	801,64 A b	951,00 A a	909,87 A a	835,62 A a
TOD2A	1238,77 A a	914,76 A b	897,08 A a	844,15 A a	918,32 A a
TOD2B	653,72 A a	780,34 A b	1063,72 A a	908,64 A a	1035,38 A a
TOD3	934,56 A a	952,46 A b	884,76 A a	1154,80 A a	1033,45 A a
Controle P.	1201,58 A a	882,31 A b	663,90 A a	889,00 A a	1022,57 A a
Controle N.	1049,82 A a	790,10 A b	889,33 A a	1076,10 A a	846,84 A a
(CV%)	13,95	35,75	21,84	15,16	18,20
DMS	11,98	28,95	16,88	12,36	14,91

<sup>1</sup> 1º coleta, sem inoculação do patógeno;

<sup>2</sup> 2º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

<sup>3</sup> 1º coleta, sem aplicação dos exsudatos;

<sup>4</sup> 2º coleta, terceiro dia após aplicação dos exsudatos;

<sup>5</sup> 3º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

Controle P.: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

Controle N.: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno);

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,1}$ .

A interação da planta com o *Trichoderma* no solo, conseqüentemente pode ter levado o aumento da atividade de POX após a chegada do patógeno. Esse efeito pode ser correspondente ao estado de pré-condicionamento (*priming*) da planta, o qual é um componente da ativação de defesa, com capacidade de expressão de genes que codificam os compostos de sinalização, mas não ocorrendo a expressão de mecanismos de defesa, porém a planta está em estado de indução, pelo aumento da sensibilidade da planta em perceber a

chegada de um patógeno em potencial. O fenômeno *priming* pode ser interessante para economia de energia na planta, uma vez que os genes ativados demandam menos energia e estão mais relacionados à comunicação após a chegada do patógeno, proporcionando rápida resposta sob ataque de patógenos (GOELLNER; CONRATH 2008; KUHN et al., 2006), e eventuais custos apenas serão notados se efetivamente o patógeno alcançar a superfície da planta.

A atividade de POX no tratamento do feijoeiro por meio da aplicação dos exsudato via foliar de *Trichoderma* spp., apresentaram diferença significativa para a 1ª avaliação (sem aplicação dos exsudatos), observando que o isolado TLB3 (*T. harzianum*), apresentou aumento da atividade após a aplicação dos exsudato em relação a 2ª avaliação (terceiro dia após aplicação dos exsudatos) e 3ª avaliação (terceiro dia após inoculação do patógeno), após a inoculação do patógeno *C. lindemuthianum*, não apresentando evidências significativa de ativação enzimática de POX para os demais isolados testados (Tabela 6).

Semelhante resultados deste trabalho, foram demonstrados por Dildey et al. (2013), a qual, não observaram atividade de indução das enzimas POX e PFO em plantas de feijão contra o patógeno *Macrophomina phaseolina*, na inoculação de sementes com diferentes isolados de *T. harzianum*. Entretanto, mesmo não demonstrando resultados significativos para as enzimas, houve tendência das mesmas, para um dos isolados de *Trichoderma* comparado ao controle negativo. Pelos resultados obtidos neste trabalho, a atividade de POX não está necessariamente envolvida neste processo, mas outros mecanismos de defesa podem estar atuando na indução de resistência das plantas de feijoeiro.

Em contrário, El-Rahman e Mohamed (2014), testando indutores abióticos (benzotriazol) e bióticos (*T. harzianum*) na indução de resistência de feijão fava contra mancha de chocolate causada pela infecção de *Botrytis fabae* e *Botrytis cinerea*, verificaram indução significativa na atividade de POX em plantas de feijoeiro após infecção do patógeno. A Indução de POX em resposta a indução de plantas à infecção indicado um papel definitivo na supressão do desenvolvimento da doença no tecido da planta, por estar envolvido no processo de lignificação, este processo atua como barreira contra invasão do patógeno, constituindo parte do mecanismo de resistência do hospedeiro.

## 4.3.1.2 Atividade de polifenoloxidase

Atividade de PFO em plantas de feijoeiro por meio do tratamento de *Trichoderma* spp. na inoculação via semente não apresentou diferença significativa tanto na 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno) quanto na 2ª avaliação (terceiro dia após inoculação do patógeno) (Tabela 7).

**Tabela 7.** Atividade de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)

Isolados	Atividade de Polifenoloxidase (Unidade de enzima <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> tecido fresco)				
	Tratamento de Semente		Exsudato Via Foliar		
	1ª Avaliação <sup>1</sup>	2ª Avaliação <sup>2</sup>	1ª Avaliação <sup>3</sup>	2ª Avaliação <sup>4</sup>	3ª Avaliação <sup>5</sup>
TI1	293,09 A a	290,77 A a	624,50 A a	114,36 B a	343,21 A a
TI2	660,48 A a	485,41 A a	582,86 A a	355,06 A a	318,07 A a
TI3	291,08 A a	441,33 A a	600,68 A a	449,79 A a	450,69 A a
TI4	249,33 A a	243,94 A a	488,77 A a	322,31 A a	358,74 A a
TM1	302,26 A a	223,59 A a	312,38 A a	437,72 A a	438,02 A a
TM2	239,36 A a	457,82 A a	538,21 A a	653,02 A a	481,19 A a
TM3	185,11 A a	489,69 A a	445,97 A a	380,98 A a	295,59 A a
TM4	279,68 A a	286,32 A a	513,70 A a	532,97 A a	451,43 A a
TLB2	357,56 A a	476,72 A a	518,75 A a	345,06 A a	348,83 A a
TLB3	484,34 A a	359,87 A a	283,66 A a	224,52 A a	381,00 A a
TLB4	427,33 A a	385,89 A a	388,43 A a	313,35 A a	405,09 A a
TLB6	510,76 A a	428,17 A a	505,62 A a	475,43 A a	422,88 A a
TLB9	194,24 A a	358,69 A a	433,52 A a	194,90 A a	335,77 A a
TLB12	437,95 A a	477,46 A a	578,78 A a	475,55 A a	554,06 A a
TLB14	487,72 A a	177,42 A a	379,24 A a	243,14 A a	237,00 A a
TLB15	459,94 A a	395,94 A a	445,13 A a	260,80 A a	562,63 A a
TLB17	261,16 A a	399,59 A a	518,41 A a	352,41 A a	317,97 A a
TOD1	287,73 A a	568,82 A a	528,41 A a	330,87 A a	284,09 A a
TOD2A	399,27 A a	250,34 A a	385,45 A a	402,03 A a	125,03 A a
TOD2B	243,20 A a	314,02 A a	436,56 A a	234,18 A a	333,99 A a
TOD3	307,80 A a	258,39 A a	684,60 A a	276,74 A a	528,66 A a
Controle P.	409,50 A a	464,24 A a	265,95 A a	631,35 A a	453,45 A a
Controle N.	458,27 A a	409,57 A a	440,62 A a	525,29 A a	409,62 A a
(CV%)	38,37	38,37	39,10	42,46	33,42
DMS	18,04	18,64	21,39	20,19	16,61

<sup>1</sup> 1º coleta, sem inoculação do patógeno;

<sup>2</sup> 2º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

<sup>3</sup> 1º coleta, sem aplicação dos exsudatos;

<sup>4</sup> 2º coleta, terceiro dia após aplicação dos exsudatos;

<sup>5</sup> 3º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

Controle P.: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

Controle N.: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno);

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,1}$ .

Entretanto, o tratamento do feijoeiro por meio da aplicação dos exsudato via foliar de *Trichoderma* spp., não foi significativo para a 1ª avaliação (sem aplicação dos exsudatos) e 3ª avaliação (terceiro dia após inoculação do patógeno), porém o resultado demonstra-se significativo para a 2ª avaliação (terceiro dia após aplicação dos exsudatos), em que o isolado T11 (*T. virens*), apresenta tendência de supressão da atividade de PFO entre a 1ª avaliação (sem aplicação dos exsudatos) e a 2ª avaliação (terceiro dia após aplicação dos exsudatos), diferindo dos demais isolados em comparação com o controle positivo e negativo, em relação aos demais isolados de *Trichoderma* spp. avaliados.

Diante disso, pode-se inferir que não houve aumento da atividade da enzima PFO em relação a ativação dos mecanismos de defesa da planta, em função da inoculação das plantas de feijoeiro pelo patógeno *C. lindemuthianum*.

Os resultados demonstrados da atividade de PFO podem geralmente estar presente em concentração elevada em tecidos infectados, promovendo a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximos ao local da lesão provocada pelo patógeno, resultando no aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas (AGRIOS, 2005).

Campos et al. (2004), constataram que há correlação positiva entre as atividades da POX e PFO, os teores de compostos fenólicos e a resistência à antracnose em plantas de feijoeiro. Essa afirmação corrobora com Melo, Shimizu, Mazzafera (2006), os quais observaram que a atividade das PFO, juntamente com outros compostos fenólicos presentes na planta, está diretamente ligada com a resistência ao bicho-mineiro e à ferrugem nas plantas de café. Porém não se pode confirmar isto na interação *Trichoderma*-feijoeiro com os isolados de *Trichoderma* estudados.

#### 4.3.1.3 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de FAL não apresentou diferença significativa na 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno) quanto na 2ª avaliação (terceiro dia após a inoculação do patógeno), por meio do tratamento de *Trichoderma* spp., na inoculação via semente, não diferindo entre a forma de aplicação dos isolados de *Trichoderma* spp. testados. Contudo, o isolado TLB3 (*T. harzianum*), aplicado via tratamento de semente, causou um aumento da atividade de FAL na 2ª avaliação (194,00  $\mu\text{g}^{-1}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  tecido fresco), após a inoculação do

patógeno, comparando a 1ª avaliação (16,00  $\mu\text{g}^{-1}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  tecido fresco) (Tabela 8).

**Tabela 8.** Atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)

Isolados	Atividade de fenilalanina amônia-liase ( $\mu\text{g}^{-1}$ ácido <i>trans</i> -cinâmico $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ tecido fresco)				
	Tratamento de Semente		Exsudato Via Foliar		
	1ª Avaliação <sup>1</sup>	2ª Avaliação <sup>2</sup>	1ª Avaliação <sup>3</sup>	2ª Avaliação <sup>4</sup>	3ª Avaliação <sup>5</sup>
TI1	6,41 A a	46,00 A a	41,58 A b	67,76 A a	26,61 A a
TI2	113,34 A a	94,48 A a	56,25 A b	4,73 A a	46,41 A a
TI3	40,69 A a	16,29 A a	12,13 A b	0,00 A a	15,83 A a
TI4	61,99 A a	51,99 A a	64,11 A b	45,98 A a	24,08 A a
TM1	0,00 A a	24,63 A a	114,10 A a	19,91 A a	144,46 A a
TM2	42,28 A a	58,65 A a	182,37 A a	26,13 A a	41,44 A a
TM3	10,36 A a	22,12 A a	16,05 A b	11,69 A a	32,13 A a
TM4	57,05 A a	12,81 A a	29,13 A b	24,17 A a	2,30 A a
TLB2	25,95 A a	14,62 A a	103,82 A a	0,00 A a	26,40 A a
TLB3	16,06 A a	194,00 A a	22,22 B b	21,03 B a	434,78 A a
TLB4	28,47 A a	12,82 A a	101,15 A a	12,36 A a	37,39 A a
TLB6	175,15 A a	51,13 A a	126,45 A a	328,63 A a	118,41 A a
TLB9	44,05 A a	39,25 A a	185,88 A a	16,64 A a	83,03 A a
TLB12	35,12 A a	40,78 A a	43,17 A b	84,40 A a	176,78 A a
TLB14	79,44 A a	36,06 A a	20,59 A b	18,68 A a	116,48 A a
TLB15	64,75 A a	60,49 A a	155,77 A a	50,47 A a	64,22 A a
TLB17	39,29 A a	0,00 A a	0,00 A b	28,15 A a	72,96 A a
TOD1	58,86 A a	79,26 A a	109,31 A a	8,04 A a	93,36 A a
TOD2A	8,35 A a	13,13 A a	18,98 A b	45,14 A a	52,19 A a
TOD2B	105,94 A a	49,59 A a	24,47 A b	0,00 A a	53,80 A a
TOD3	0,00 A a	11,30 A a	85,78 A a	8,51 A a	72,55 A a
Controle P.	59,57 A a	86,49 A a	95,28 A a	22,43 A a	122,40 A a
Controle N.	64,57 A a	79,18 A a	112,83 A a	0,00 A a	69,20 A a
(CV%)	116,48	119,55	88,95	180,08	102,57
DMS	14,12	14,33	114,76	14,64	17,26

<sup>1</sup> 1º coleta, sem inoculação do patógeno;

<sup>2</sup> 2º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

<sup>3</sup> 1º coleta, sem aplicação dos exsudatos;

<sup>4</sup> 2º coleta, terceiro dia após a aplicação dos exsudatos;

<sup>5</sup> 3º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

Controle P.: controle positivo (ausência de antagonista, presença do patógeno);

Controle N.: controle negativo (ausência de antagonista, ausência do patógeno);

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,1}$ .

O mesmo não se verifica para o tratamento do feijoeiro por meio da aplicação dos exsudato via foliar, apresentando diferença significativa para a 1ª avaliação (sem aplicação dos exsudatos), indicando interferência de fator ambiental não controlado, como ocorrência de ácaros e princípios de infecções de plantas de feijoeiros, vindas principalmente por sementes

contaminadas, que conseqüentemente influenciaram no alto coeficiente de variação (CV) e na 2ª avaliação (terceiro dia após a aplicação dos exsudatos).

Embora não significativo o exsudato do isolado TLB6 (*T. asperellum*) apresentou uma expressão elevada de FAL (328,63  $\mu\text{g}^{-1}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  tecido fresco), em comparação a 1ª avaliação (126,45  $\mu\text{g}^{-1}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  tecido fresco), porém na 3ª avaliação (118,41  $\mu\text{g}^{-1}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  tecido fresco), essa expressão voltou a valores próximos encontrados anteriormente na 1ª avaliação. Após a inoculação do patógeno na 3ª avaliação (434,78  $\mu\text{g}^{-1}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  tecido fresco), notou-se um incremento significativo por parte da aplicação de exsudato TLB3 (*T. harzianum*), em comparação a 1ª avaliação (22,22  $\mu\text{g}^{-1}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  tecido fresco) e 2ª avaliação (21,03  $\mu\text{g}^{-1}$  ácido *trans*-cinâmico  $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  tecido fresco).

Para o isolado TLB6, possivelmente pode estar ocorrendo uma ativação de mecanismos de defesa, pelo simples contato do exsudato com a planta, por outro lado, para o TLB3 o simples contato com o exsudato, não altera mecanismos de resistência, mas quando o patógeno entra em contato com a planta, ocorre uma superexpressão de FAL, evidenciando o fenômeno de pré-condicionamento (*priming*) (GOELLNER; CONRATH, 2008; KUHN et al., 2006).

Em geral, os isolados de *Trichoderma* spp., não apresentaram atividade significativa de FAL no mecanismo de defesa da planta, quando comparadas a avaliação das plantas de feijoeiro, após a infecção do patógeno *C. lindemuthianum*.

A FAL é uma enzima indicadora de indução de resistência e esta envolvida diretamente como um marcador bioquímico, uma vez que, esta é considerada essencial para a síntese de fenóis, sendo importante para a resistência, possibilitando a ocorrência de uma interação específica durante o processo entre a cultivar e o microrganismo indutor ou patógeno (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

Vários trabalhos com microrganismos habitantes da rizosfera têm demonstrado a ativação da rota dos fenilpropanóides através da elevação da atividade da enzima chave FAL. De Meyer et al. (1999) relataram que a colonização da rizosfera por *Pseudomonas aeruginosa*, aumentou atividade de FAL em raízes de feijão, conseqüentemente aumentou os níveis de ácido salicílico nas folhas, ao contrário do *Trichoderma* que apresentou uma redução da atividade de FAL nas plantas de feijoeiro. Campos et al. (2003), observaram uma resposta complexa que envolve a produção de fitoalexinas e isoflavonóides que pode desempenhar um papel diferente na resposta relacionada à indução da enzima FAL.

Karthikeyan et al. (2006) avaliaram a indução de compostos fenólicos e enzimas de defesa envolvidas na via fenilpropanóide e acúmulo de proteínas-PR contra *Ganoderma* em resposta à aplicação de *Pseudomonas fluorescens*, *T. viride* e *T. harzianum* em combinação com quitina coco (*Cocos nucifera* L.). Os autores observaram um elevado aumento da atividade FAL em todas as plantas tratadas diante a aplicação de *P. fluorescens*, *T. viride* e quitina, atingindo um nível mais alto nos terceiro dia após o tratamento, em seguida, diminuiu lentamente.

#### 4.3.1.4 Atividade de $\beta$ -1,3-glucanase

A atividade de  $\beta$ -GASE em plantas de feijoeiro por meio do tratamento de *Trichoderma* spp. na inoculação via semente, apresentou diferença significativa na 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno). As plantas apresentaram certa atividade de  $\beta$ -GASE devido à presença do *Trichoderma*, mas quando ocorre a inoculação do patógeno, essa atividade aumenta de modo geral, porém o único que apresentou diferença estatística significativa foi o tratamento via semente pelo isolado TLB12 (*T. harzianum*) (Tabela 9).

Não houve diferença significativa entre a relação forma de aplicação do tratamento dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados via inoculação de semente e aplicação dos exsudatos via foliar. Desta forma, é possível observar que a maioria dos isolados sofreu uma tendência de aumento da atividade de  $\beta$ -GASE, comparando com a 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno) e 2ª avaliação (terceiro dia após inoculação do patógeno), sendo possivelmente que a atividade de  $\beta$ -GASE foi ativada em função da chega do patógeno.

A atividade de  $\beta$ -GASE, no tratamento do feijoeiro através da aplicação dos exsudato de *Trichoderma* spp. via foliar, apresentaram diferença significativa para a 1ª avaliação (sem aplicação dos exsudatos), sendo considerado que essa avaliação teve influência por efeitos ambientais não controlados (ou não sujeito a controle, como temperatura e umidade relativa do ar), e 2ª avaliação (terceiro dia aplicação dos exsudatos), sendo possível observar elevação da atividade de  $\beta$ -GASE, após a inoculação do patógeno para as plantas que foram tratadas com exsudatos dos isolados TI4, TOD3 (*T. harzianum*), TLB9 (*T. virens*), TLB14 (*T. konigiopsis*).

Diante disso, essa elevada atividade enzimática depois da inoculação do patógeno, pode estar relacionada no fenômeno *priming*, na expressão de mecanismos de defesa



ocorrendo somente após a inoculação do patógeno, ocasionando economia de energia para a planta até a chegada do patógeno (KUH N et al., 2006).

**Tabela 9.** Atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)

Isolados	Atividade de $\beta$ -1,3 glucanase ( $\mu\text{g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ massa fresca)		Exsudato Via Foliar		
	Tratamento de Semente				
	1ª Avaliação <sup>1</sup>	2ª Avaliação <sup>2</sup>	1ª Avaliação <sup>3</sup>	2ª Avaliação <sup>4</sup>	3ª Avaliação <sup>5</sup>
TI1	500,37 A a	868,78 A a	648,26 A a	904,86 A a	828,29 A a
TI2	582,70 A a	1060,26 A a	312,35 A a	321,45 A a	683,95 A a
TI3	416,96 A a	928,32 A a	404,07 A a	825,46 A a	734,61 A a
TI4	879,11 A a	650,67 A a	304,63 B a	810,74 B a	1214,17 A a
TM1	939,24 A a	879,36 A a	399,88 A a	598,70 A a	1010,66 A a
TM2	870,37 A a	1075,89 A a	334,86 A a	709,23 A a	864,07 A a
TM3	503,01 A a	854,56 A a	388,10 A a	718,46 A a	1037,55 A a
TM4	617,60 A a	1135,58 A a	647,52 A a	972,91 A a	739,58 A a
TLB2	743,14 A a	1393,28 A a	511,71 A a	691,09 A a	1215,72 A a
TLB3	472,44 A a	744,69 A a	743,35 A a	1185,29 A a	901,87 A a
TLB4	693,73 A a	849,13 A a	437,82 A a	944,11 A a	741,12 A a
TLB6	706,55 A a	1053,43 A a	318,01 A a	489,56 A a	698,58 A a
TLB9	415,31 A a	885,47 A a	184,07 B a	274,28 B a	895,89 A a
TLB12	388,83 B a	1026,50 A a	612,62 A a	496,97 A a	823,37 A a
TLB14	854,63 A a	974,77 A a	630,59 B a	684,25 B a	1563,42 A a
TLB15	838,05 A a	1250,52 A a	492,66 A a	717,80 A a	1042,98 A a
TLB17	407,28 A a	870,05 A a	465,34 A a	988,10 A a	856,73 A a
TOD1	672,37 A a	1271,01 A a	600,96 A a	552,22 A a	850,33 A a
TOD2A	839,64 A a	1078,44 A a	860,63 A a	687,34 A a	705,86 A a
TOD2B	654,43 A a	870,03 A a	380,18 A a	623,57 A a	899,24 A a
TOD3	686,39 A a	837,81 A a	379,59 B a	709,25 A a	1208,86 A a
Controle P.	668,59 A a	1126,09 A a	504,34 A a	875,39 A a	734,64 A a
Controle N.	560,14 A a	1025,65 A a	719,89 A a	538,66 A a	849,43 A a
(CV%)	28,51	21,04	46,64	32,16	27,41
DMS	18,46	17,17	25,22	21,67	21,26

<sup>1</sup> 1º coleta, sem inoculação do patógeno;

<sup>2</sup> 2º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

<sup>3</sup> 1º coleta, sem aplicação dos exsudatos;

<sup>4</sup> 2º coleta, terceiro dia após aplicação dos exsudatos;

<sup>5</sup> 3º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

Controle P.: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

Controle N.: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno);

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,1}$ .

Solanki et al. (2011), trabalhando com formulações de cultura de seis isolados de espécies *Trichoderma* (*T. hamatum*, *T. asperellum* e *T. viride*) contra podridão radicular causada por *Rhizoctonia solani* em tomateiro, verificaram que todos os isolados foram

capazes de induzir a atividade de  $\beta$ -GASE, como também verificaram acúmulo de fenóis totais, POX, PFO e FAL em plantas tratadas com *Trichoderma*.

De acordo com Akrami, Golzary e Ahmadzadeh (2011), vários fatores podem interferir na eficiência dos agentes de indução bióticos, entre eles os fatores abióticos, como umidade e pH do solo, substâncias, partículas ou moléculas presentes no substrato proveniente de outros organismos e altas temperaturas são consideradas importantes na eficiência do indutor para a planta, para garantir o um bom desempenho dos isolados de *Trichoderma* spp.

Enzimas de defesa como  $\beta$ -GASE possuem um papel de grande importância no processo de resistência, as quais exercem sua função conjuntamente com quitinases, sendo as principais hidrolases do mecanismo de defesa, contudo as quitinases não foram avaliadas neste trabalho.

Dentre os isolados testados no presente trabalho, foi verificado que os isolados TI2, TOD1 (*T. harzianum*), TLB15 (*T. virens*), TLB17 (*T. koningiopsis*) apresentaram capacidade endófitos nas raízes de feijoeiro e também no resultado significativo expresso na atividade enzimática  $\beta$ -GASE. Porém nas trocas gasosas, somente o isolado TM4 (*T. virens*) promoveu um aumento na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> na fotossíntese.

Essa interação por parte desses isolados na proteção de plantas de feijoeiro com o antagonista, não estão muito bem esclarecidas, acredita-se que o *Trichoderma* spp., estimule a planta ao equilíbrio do seu arsenal enzimático, em prol do seu benefício, de forma que, a planta não prejudique a relação simbiótica entre a interação *Trichoderma* spp. e planta, pois acaso a planta ser estimulada a produzir enzimas de defesa, o *Trichoderma* provavelmente seria prejudicado pela degradação de sua estruturas e conseqüentemente sua morte celular.

Assim, o *Trichoderma* spp. pode ser considerando promissor contra antracnose no feijoeiro, podendo o *Trichoderma* spp., ser considerar como um importante ativador desses mecanismo de defesa das plantas, em relação a inoculação do patógeno *C. lindemuthianum* no feijoeiro.

#### 4.3.1.5 Teor de clorofila

O teor de clorofila na folha do feijoeiro foi verificado efeito significativo entre o tratamento de inoculação de semente na 2ª avaliação, e no tratamento da aplicação dos exsudato via foliar, para a 1ª e 3ª avaliação (Figura 10).

**Tabela 10.** Teor de clorofila na folha de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)

Isolados	Tratamento Semente		Exsudato Via Foliar		
	1ª Leitura <sup>1</sup>	2ª Leitura <sup>2</sup>	1ª Leitura <sup>3</sup>	2ª Leitura <sup>4</sup>	3ª Leitura <sup>5</sup>
TI1	41,27 A a	37,30 A a	36,90 A a	38,92 A a	35,35 A a
TI2	40,17 A a	37,90 A a	38,27 A a	39,00 A a	38,07 A a
TI3	40,40 A a	37,02 A a	34,50 B a	39,77 A a	38,05 A a
TI4	39,85 A a	35,30 A a	36,12 A a	38,52 A a	34,50 A b
TM1	42,40 A a	40,42 A a	38,32 A a	38,37 A a	38,25 A a
TM2	38,55 A a	36,45 A a	36,17 A a	39,30 A a	35,12 A a
TM3	41,75 A a	35,45 B a	37,82 A a	40,10 A a	36,70 A a
TM4	40,65 A a	35,72 B a	38,65 A a	40,12 A a	32,65 B b
TLB2	37,97 A a	37,10 A a	35,05 B a	39,97 A a	30,95 B b
TLB3	39,75 A a	37,97 A a	33,35 A a	37,92 A a	35,17 A a
TLB4	37,80 A a	33,40 A a	37,82 A a	38,47 A a	32,50 B b
TLB6	42,12 A a	38,60 A a	38,90 A a	38,72 A a	32,05 B b
TLB9	38,92 A a	37,77 A a	38,52 A a	37,87 A a	34,57 A b
TLB12	41,75 A a	39,92 A a	37,47 A a	39,60 A a	32,47 B b
TLB14	41,67 A a	39,40 A a	37,12 A a	36,62 A a	35,55 A a
TLB15	40,15 A a	36,62 A a	37,07 A a	37,12 A a	33,05 A b
TLB17	40,45 A a	34,77 B a	39,10 A a	39,82 A a	41,35 A a
TOD1	38,45 A a	33,05 B a	38,72 A a	39,22 A a	33,62 B b
TOD2A	39,85 A a	34,05 B a	37,20 A a	39,60 A a	35,50 A a
TOD2B	39,92 A a	34,60 B a	39,15 A a	38,42 A a	37,25 A a
TOD3	39,90 A a	36,55 A a	38,80 A a	40,27 A a	35,75 A a
Controle P.	37,55 A a	34,80 A a	38,00 A a	38,17 A a	35,85 A a
Controle N.	41,05 A a	35,70 B a	36,00 B a	40,30 A a	34,35 B b
(CV%)	3,33	5,58	3,52	3,58	5,29
DMS	0,54	0,89	0,57	0,59	0,83

<sup>1</sup> 1º coleta, sem inoculação do patógeno;

<sup>2</sup> 2º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

<sup>3</sup> 1º coleta, sem aplicação dos exsudatos;

<sup>4</sup> 2º coleta, terceiro dia após aplicação dos exsudatos;

<sup>5</sup> 3º coleta, terceiro dia após a inoculação do patógeno;

Controle P.: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

Controle N.: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno);

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,1}$ .

Para o tratamento de *Trichoderma* spp., pela inoculação via semente, é possível verificar que os isolados TM3, TM4 (*T. virens*), TLB17 (*T. koningiopsis*); TOD1 (*T. harzianum*) e TOD2A, TOD2B (*T. longibrachiatum*), apresentaram redução do teor de clorofila para a 2ª avaliação (terceiro dia após inoculação do patógeno), em comparação com a 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno). Os efeitos entre os diferentes isolados de *Trichoderma* spp., não apresentaram resultados significativos nos teor de clorofila. Entretanto,

o teor de clorofila diminuiu após a inoculação do patógeno *C. lindemuthianum* nas plantas de feijoeiro.

O teor de clorofila apresentado através da aplicação dos exsudato via foliar apresenta diferença significativa para a 1ª avaliação (sem aplicação dos exsudatos), sendo possível verificar os isolados TI3 (*T. virens*) e TLB2, TOD1 (*T. harzianum*), apresentando teores de clorofila maior quando comparado aos isolados TM4 (*T. virens*), TLB2, TLB, (*T. harzianum*) e TLB6 (*T. asperellum*) da 3ª avaliação (terceiro dia após aplicação dos exsudatos), o mesmo não aconteceu com a testemunha negativa, indicando que esta redução pode não ser estimulada pela presença dos isolados, acima citados.

Alguns fatores podem influenciar o desempenho das plantas de feijoeiro, em relação aos efeitos dos parâmetros da fotossíntese, podendo ter influência para as condições favoráveis, tais como: umidade e temperatura para o desenvolvimento da cultura, como também a disponibilidade de água no substrato em função do molhamento diário, como a irrigação.

Shoresh e Harman (2008), trabalhando com aumento na taxa respiratória e fotossintética, em plantas de milho inoculadas com *T. harzianum*, verificaram que além de ter promovido indução de resistência e aumento no crescimento das plantas. Atribuído ao metabolismo de carboidratos e fotossíntese, maior acúmulo de amido e impulsionando o crescimento conferido pela colonização radicular pelo *Trichoderma*.

Trabalhos ainda são escassos na literatura envolvendo os parâmetros das trocas gasosas, necessitando da realização de novos trabalhos, para obtenção de resultados que diferem o fungo *Trichoderma* como promovedores e beneficiadores que diz respeito à fisiologia da planta.

#### 4.3.1.6 Severidade de antracnose

A severidade de antracnose em plantas de feijoeiro através do tratamento de diferentes isolados de *Trichoderma* spp., realizados pela inoculação via semente e aplicação dos exsudato via foliar, não apresentaram diferença significativa na interação dos isolados avaliados entre o efeito da forma de aplicação testados, como demonstra a Tabela 11.

De modo geral, os isolados TI2, TI4, TLB4 (*T. harzianum*) e TOD2B (*T. longibrachiatum*) apresentaram baixa ocorrência da doença, porém nos isolados TI3 (*T. virens*) e TOD2A (*T. longibrachiatum*) foi possível verificar uma maior severidade nas

plantas, em ambos no tratamento de *Trichoderma* spp. na inoculação via semente como também na aplicação dos exsudato via foliar nas plantas de feijoeiro.

**Tabela 11.** Severidade de antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com exsudato de isolados de *Trichoderma* spp.. TI1, TI3, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB9, TLB15 (*Trichoderma virens*); TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB14, TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*); TOD2A, TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)

Isolados	Severidade da antracnose (%)	
	Tratamento de Semente <sup>ns</sup>	Exsudato Via Foliar <sup>ns</sup>
TI1	0,49	2,44
TI2	0,86	0,67
TI3	2,15	2,26
TI4	0,59	0,48
TM1	1,68	0,57
TM2	1,04	0,30
TM3	0,39	1,12
TM4	0,21	2,08
TLB2	2,52	0,39
TLB3	1,23	0,97
TLB4	0,95	0,21
TLB6	1,77	1,04
TLB9	1,12	0,21
TLB12	0,76	1,77
TLB14	1,31	1,05
TLB15	0,30	1,98
TLB17	2,33	0,78
TOD1	2,06	1,03
TOD2A	2,26	3,08
TOD2B	0,39	0,69
TOD3	1,77	1,21
Controle P.	0,66	0,95
Controle N.	1,71	1,88
(CV%)	66,57	59,72
DMS	1,77	1,57

<sup>ns</sup> Não houve diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Scott-Knott a 5%. Dados transformados por  $\sqrt{x+0,1}$ . Controle P.: controle positivo (ausência de *Trichoderma* spp., presença do patógeno); Controle N.: controle negativo (ausência de *Trichoderma* spp., ausência do patógeno).

A antracnose apresentou baixa severidade na casa de vegetação, apresentando sintomas antes mesmo da inoculação do patógeno, possivelmente introduzido via sementes que utilizadas no experimento, as quais estavam contaminadas por esporos do patógeno. As

condições do ambiente, tais como temperatura amena (13 a 25 °C), período de molhamento como chuva e orvalho (período de irrigação), ventos para disseminação da infecção (exaustor), e suscetibilidade da cultivar, foram favoráveis para o desenvolvimento da antracnose nas plantas de feijoeiro, apresentando sintomas pouco distribuídos nas plantas.

Entre os isolados testados neste trabalho, 17 isolados de *Trichoderma* spp. foram utilizados por Broetto (2013), para avaliar o controle de *Macrophomina phaseolina* em plantas de feijoeiro. A autora verificou que os isolados TLB2, TLB3, TLB12 (*T. harzianum*) e TLB17 (*T. koningiopsis*) apresentaram proteção eficiente do feijoeiro contra *M. phaseolina*. Além disso, os isolados TM1, TM3 (*T. virens*), TLB2, TLB3, TLB12 (*T. harzianum*) e TLB17 (*T. koningiopsis*) foram bons promotores de crescimento do feijoeiro, como também no aumento da produção por planta, com destaque para o isolado TLB12 (*T. harzianum*), porém com exceção do isolado TLB2 (*T. virens*), não conferindo aumento na produção.

O mesmo foi relatado por Pedro (2012a), testando o efeito de isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes concentrações de 0,5%, 1%, 1,5% e 2% (peso:volume), na severidade de *C.lindemuthianum* em feijoeiro. Não houve diferença significativa entre as doses de 0,5 a 1% e 1,5 a 2%, quando comparados os resultados das diferentes concentrações ao controle. Entretanto, o autor relata que a severidade reduziu gradualmente em função do aumento das concentrações dos isolados incorporado no substrato, sendo que a todas as concentrações aplicadas conferiu proteção contra *C. lindemuthianum* em feijoeiro acima de 25%, mas a maior concentração (2%) protegeu a incidência de severidade das plantas em 96%.

Silva et al. (2011) trabalhando com 60 isolados de *Trichoderma* na promoção do crescimento e na indução de resistência sistêmica à antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) em pepineiro, observou que 10 isolados da espécie *T. harzianum* foram eficientes na proteção contra antracnose, tendo redução na severidade da doença de 56 a 85%. No mesmo trabalho, os autores relatam que, as espécies *T. asperellum*, e *T. atroviride*, são isolados que se destacaram como indutores de resistência contra *C. lagenarium* e conferiram proteção a pepineiro de 56,36 a 87,30% respectivamente.

Apesar da importância do *Trichoderma* sp. e as pesquisas voltadas para indução de resistência, pouco se compreende a relação da interação microrganismo-planta deste fungo no feijoeiro, pelo fato da escassez de trabalhos envolvendo os mecanismos pelos quais o *Trichoderma* sp. interage, ativando os sistemas de defesa bioquímicos das plantas. Porém várias hipóteses foram apresentadas, mas pouco delas têm sido convincente, a qual avaliada

através de investigações químicas e citológicas dos tecidos vegetais desafiados por esses agentes fúngicos (HANSON; HOWELL, 2004).

O manejo com *Trichoderma* spp. não pode ser descartado e requer maiores estudos nesse patossistema. Diversos trabalhos vêm sendo realizados visando ampliar o conhecimento dos mecanismos de ação pelo biocontrole com *Trichoderma* sp. em diversas culturas. Acredita-se, na medida em que vai se conhecendo o potencial destes mecanismos na interação com as plantas e os microrganismos, levam a expectativas quanto a sua utilização na agricultura, além de contribuir na preservação do meio ambiente.

## 5 CONCLUSÕES

1 - Os isolados TI2, TI4, TLB3, TLB12 (*T. harzianum*); TI3, TM2 (*T. virens*); TLB6 (*T. asperellum*); TLB14 e TLB17 (*T. koningiopsis*) são considerados como muito eficientes e os isolados TI1, TM4, TLB9 TLB15 (*T. virens*); TLB2, TLB4, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*); TOD2A, TOD2B (*T. longibrachiatum*) são considerados como eficientes no confronto direto contra *C. lindemuthianum*.

2 - Os isolados TI1, TM1, TLB15 (*T. virens*); TI2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1, TOD3 (*T. harzianum*); TLB6, (*T. asperellum*); TLB14, TLB17 (*T. koningiopsis*); TOD2B (*T. longibrachiatum*) suprimiram a atividade de  $\beta$ -1,3-glucanase no tecido foliar, sendo considerados supressores para indução da defesa das plantas de feijoeiro.

3 - Os isolados de *Trichoderma* spp., TI2, TI4 (*T. harzianum*); TM4, TLB2, TLB9, TLB15, TOD1 (*T. virens*); TLB17 (*T. koningiopsis*) colonizaram as raízes de feijoeiro, conferindo a capacidade endofítica do microrganismo.

4 - A atividade das enzimas de defesa na indução de resistência de feijoeiro tratado com *Trichoderma* spp. para proteção a *C. lindemuthianum* não demonstraram grandes alterações.

5 - Os isolados não alteraram o teor de clorofila.

6 - Os isolados não interferiram na taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>.

7 - A incidência de severidade de antracnose em plantas de feijoeiro, não apresentou diferença significativa por meio do tratamento via semente/solo e pulverização dos exsudato via foliar na interação dos isolados de *Trichoderma* spp. avaliados.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Elsevier Academic Press. Ed.5, p. 207-248, 2005.
- AKRAMI, M.; GOLZARY, H.; AHMADZADEH, M. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.2653-2658, 2011.
- ALMEIDA, T.C.; CANÉCHIO FILHO, V. Principais culturas. **Instituto Campineiro de Ensino Agrícola**, Campinas, SP, v.2, ed.2, 1987.
- AHMAD, J.S.; BAKER, R. Competitive saprophytic ability and celullolytic activit of rhizosphere-component mutants of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.77, p.358, 1987.
- ARAÚJO, W.L. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros**. 1996. 111f. Dissertação (Mestrado) Escola Superior da Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1996.
- AZEVEDO, J.L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.2 (suplemento), São Paulo, SP, p.225-229, 1999.
- AZEVEDO, J.L. Microorganismos endófiticos. In: MELO, L.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP, p.117-137, 1998.
- BAKER, F.K.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens**. Freeman and Company, San Francisco, p.433, 1974.
- BAILEY, B.A., BAE, H., STREM, M.D., ROBERTS, D.P., THOMAS, S.E., SAMUELS, G.J., CHOI, I-Y., HOLMES, K.A. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. **Planta**, v.224, p.1449-1464, 2007.
- BARBIERI, R.L.; CARVALHO, F.I.F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, RS, v.7, p.79-83, 2001.
- BARY, A. **Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten**. Leipzig, Engelamn, 316p., 1886.
- BERNARDES, T.; SILVEIRA, P.M.D.; MESQUITA, M.A.M. Regulador de crescimento e *Trichoderma harzianum* aplicados em sementes de feijoeiro cultivado em sucessão a cultura de cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, GO, v.40, n.4, p.439-446, 2010.
- BERNARDES, F.S. **Rizobactéria na indução de resistência sistêmica em cultivos hidropônicos**. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado) Curso de pós-graduação em agricultura tropical e subtropical. Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, SP, 2006.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia**. Agronômicas Ceres. São Paulo, SP, ed.3, p.919, 1995.

BETTIOL, W. (Org). Controle biológico de doenças de plantas. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, SP, 1991.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A.C. Biocontrol, mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, Spain, v.7, p.249-260, 2004.

BIANCHINI, A; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H. et al., **Manual de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas**. Agronômica Ceres, São Paulo, SP, ed.4, v.2, 2005.

BIZI, R.M.; GREGOLETTI JUNIOR. A.; AUER, C.G. Seleção de Fungicidas para Controle de Oídio em Eucalipto. **Pesquisa Florestal**, Colombo, PR, v.51, p.165-170, 2005.

BOMFIM, M.P.; SÃO JOSÉ, A.R.; REBOUÇAS, T.N.H.; ALMEIDA, S.S.; SOUZA, I.V.B.; DIAS, N.O. Avaliação antagonista *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.61-67, 2010.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência: noções básicas e perspectivas. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, cap. 1. p. 11-28. 2005.

BONATTI, P. M.; LORENZINI, G.; FORNASIEIRO, B.; NALLI, C.; SCGARBI, E. Cytochemical detection of cell wall bound peroxidase in rust infected broad bean leaves. **Journal of phytopathology**, Berlin, v.140, p.319-325, 1994.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J.E.C. A cultura. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J. de; BORÉM, A. (Eds). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa: UFV. 1998. p. 375-433.

BROETTO, L. (2013) **Antagonismo a *Macrophomina phaseolina* e promoção do crescimento em feijoeiro mediados por *Trichoderma* spp**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE. Marechal Cândido Rondon, 61p. 2013.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P.; SILVA, J. B.; OSÓRIO, V. A. Induction of chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase by salicylic acid and *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina: v. 15, p. 129-134, 2003.

CAMPOS, Â.D.; FERREIRA A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E.P.D.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, DF, v.39, n.7, p.637-643, 2004.

CARNEIRO, S. M. de T. P. G. Efeito de extratos de folhas de nim sobre o oídio do tomateiro. **Summa Phytopathologica**. v. 29, n. 3, p. 262-265, 2003.

CARVALHO FILHO, M. R. T.; MENÊZES, J. E.; MELO, S. C. M.; SANTOS, R. P. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do Eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Brasília, DF; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMERO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 263p. 2005.

COHEN, Y. Induced resistance against fungal diseases by aminobutyric acids. In: LYR, H.; RUSSEL, P. E.; SISLER, H. D. (Ed.). **Modern fungicides and antifungal compounds**. Andover: Intercept, p. 461-466. 1996.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2013) **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: decimo segundo levantamento**, setembro de 2013. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 01 nov. 2013.

COSTA, G. F.; MARENCO, R. A. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica** . 37: 229-234. 2007.

CRUZ, C.D. Programa Genes: **Genética Quantitativa e Estatística Experimental**. Editora UFV. Viçosa, 2013

CUTT, J.R.; KLESSIG, D.F. Pathogenesis-related proteins. In. BOLLER, T.; MEUNS Jr., F. **Plant Gene Research: Genes involved in plant defense**, Wien: Springer-Verlag, 1992. P.209-243.

DALLA PRIA, M.; AMORIN, 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.

DELGADO, G.V.; MARTINS, I.; MENÊZES, J. E.; MACEDO, M. A.; MELLO, S. C. M. Inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma* spp. *in vitro*. In: Boletim de pesquisa e desenvolvimento. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília: 214p., 2007.

DE MEYER, G.; CAPIEAU, K.; AUDENAERT, K.; BUCHALA, A.; METRAUX, J.P.; HOFTE, M.; Nanogram Amounts of Salicylic Acid Produced by the *Rhizobacterium Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 Activate the Systemic Acquired Resistance Pathway in Bean. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.450-458, 1999.

DILDEY, O.D.F.; GONÇALVES, E.D.V.; DAL'MASO, E.G.; MEINERZ, C.C.; HENKEMEIER, N.P.; COLTRO, S.; VAZ, V.F.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J. Atividade de polifenoloxidase e peroxidase na resistência do feijoeiro à *Macrophomina phaseolina* através do tratamento de sementes com diferentes isolados de *Trichoderma harzianum*. In: 46º Congresso Brasileiro de Fitopatologia. **Anais, Fitopatologia Brasileira**, 2013.

DJONOVIC, S.; VARGAS, W.A.; KOLOMIETS, M.V.; HORNDESKI, M.; WIEST, A.; KENERLEY, C.M. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. **Plant Physiology**, v.145, p.875–889, 2007.

DUANGMAL, K., APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v.64, p.351-359, 1999.

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 traits. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.2, p.343-354, 2014.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do feijoeiro comum: Características da cultura**. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>. Acesso em 07 Fev. 2014.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de solos**. Rio de Janeiro, 2009.367 p.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A.C.F.; STEFANELO, D.R.; ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**. 30: 127-133, 2005.

ETHUR, L.Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de Fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 154f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2006.

EVANS, H. C.; HOLMS, K. A.; THOMAS, S. E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gibereli*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. **Mycological Progress**, v. 2, p. 149-160, 2003.

FAGERIA, N.K.; STONE, L.F. Manejo da acidez dos solos de cerrados e de várzea do Brasil. **Embrapa CNPAF** (Documentos, 92). Santo Antônio de Goiás, GO, p.42, 1999.

FLOSS, E. L. **Fisiologia das plantas cultivadas**. Passo Fundo: Ed. da UPF, 2004.

GASPAR, T.H.; PENEL, C.; THORPE, T.; GREPPIN, H. **Peroxidases**. Geneva. Universidad de Geneva, Centro de Botanique, 1982. p. 235-243.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A.F.D.; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. In: **Floresta** (Edição especial), Curitiba, PR, v.30, p.200. 2000.

GOELLNER, K.; CONRATH, U. Priming: it's all the world to induced disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**, v.121, n.3, p.233-242, 2008.

GONÇALVES, J.G.R. **Estabilidade fenotípica do feijoeiro com uso de genótipos suplementares em análise AMMI**. 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Genética, melhoramento Vegetal e Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação. Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP, 2008.

GUPTA, R.; PANDEY, S. K.; SINGH, A. K.; SINGH, M. Response of photosynthesis, chlorophyll fluorescence and yield of singer millet (*Eleusine coracana*) influenced by bio-chemical fertilizers. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 81, p. 445-449, 2011.

HAMMERSCHMIDT, D.; DANN, E.K. Induced resistance to disease. In: Rechcigl NA, & Rechcigl JE Environmentally safe approaches to crop disease control. Boca Raton: **CRC-Lewis Publishers**, (Ed.), 177-199, 1997.

HAMMERSCHMIDT, T. R.; NUCLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, p. 73-82, 1982.

HARMAN, G. E. HOWELL, C. R.; VITEBERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HANSON, L.E.; HOWELL, C.R. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v.94, p.171-176, 2004.

HIJWEGWN T.; VERHAAR, M. A., ZADOKS J. C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dicloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, n. 45, p. 631-635, 1996.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo: v. 2, n. 5, p. 462-468, 2001.

KARTHIKEYAN, M.; RADHIKA, K.; MATHIYAZHAGAN, S.; BHASKARAN, R.; SAMIYAPPAN, R.; VELAZHAHAN, R. Induction of phenolics and defense-related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 3, p. 367-377, 2006.

KAO, C. H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 39, p. 83-89, 2003.

KERSHAM, M.J.; TALBOT, N. J. Hidrophobins and repelants: proteins with fundamental roles in fungal morfogenesis. **Fungal Genetics and Biology**. Orlando, v.23, p.18-33, 1998.

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**, 36:107-114, 2010.

KUHN O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção.** Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba SP. ESALQ – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2007.

KUHN, O.; PASCHOLATI, S.F.; FILHO, J.C.; PORTZ, R.L.; OSSWALD, W. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.14, p. 251-302, 2006.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, 47: 273-279, 1972.

LINTHORST, H. J. M. Pathogenesis-related proteins of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 10, p. 123-150, 1991.

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

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

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, 25: 244-249, 1999.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Perfil do feijão no Brasil.** Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 19 fev. 2014.

MARIANO, R.L.R. Biocontrole de doenças de plantas. In: **Semana da Fitossanidade**, Recife, 2000. Livro de palestras e mini cursos: desafios no manejo integrado de pragas e doenças. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 247p., 2000.

MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, A. P. O. Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. 10: 102-107. 2008.

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plant. **Phytochemistry**, Oxford, v. 18, p. 193-215, 1979.

MEDEIROS, L.A.M. **Resistência genética do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Colletotrichum lindemuthianum*.** 2004. 97f. Tese (Doutorado) Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2004.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, A.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. **Fitosanidad** 11:3-9, 2007.

MELO, G. A.; SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, Elmsford, v. 67, n. 3, p. 277-285, 2006.

MELO L.S.; AZEVEDO J.L. (Eds.). **Controle biológico**. EMBRAPA, Jaguariúna, SP, v.1, p.17-66, 1998.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, L. S. & AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Controle biológico**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, 1: 17-66, 1998.

MELO, L.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como biocontrole de plantas. **Revista Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, 4: 261-295, 1996.

MELO, L.S.; Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doença de planta. In: BETTIOL, W. (org.) **Controle biológico de doenças de planta**. EMBRAPA, CNPDA. Jaguariúna, SP, p.17-66, 1991.

METCALF, D. A.; WILSON, C. R. T. The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. **Plant Pathology**, London, v. 50, p. 249-257, 2001.

MÉTRAUX, J. P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 13-18, 2001.

MORAES, W. B. C. Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 175-190, 1992.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Plant Pathology**. v. 107, p. 19-28. 1992.

NOGUEIRA, R.J.M.C. ; SILVA-JUNIOR, J. F. Resistência estomática, tensão de água no xilema e teor de clorofila em gravioleira (*Annona muricata* L.). **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, 58: 491-495. 2001.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; SILVA-JUNIOR, J. F. DA; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; BURITY, H. A.; SANTOS, V. F. Comportamiento estomático y tensión de agua en el xilema de dos genotipos de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) cultivados bajo estrés hídrico. **Revista de Investigación Agraria Série Producción y Protección Vegetales**, Madrid, 15: 213-225. 2000.

OKOT-KOTBER, M.; LIAVOGA, A.; YONG, K. J.; BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton: v. 50, p. 2410-2417, 2002.

OSSWALD, W. F.; STANGARLIN, J. R.; NICHOLSON, R. L.; BRUMMER, M.; WULFF, N. A.; DI PIERO, R. M.; PICCININ, E.; DI CIERO, L.; HOTO, F. V.; PASCHOLATI, S. F. The effect of acibenzolar-S-methyl on phytoalexin and PR-protein induction on sorghum mesocotyls and on *Colletotrichum sublineolum*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 4, p. 415-420. 2004.

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**, 25: 161-169. 2005.

PANG, Z.; KANG, Y-N.; BAN, M.; ODA, M.; KOBAYASHI, R.; OHNISHI, M.; MIKAMI, B. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of endo-1,3-β-glucanase from *Arthrobacter* sp. **Acta Crystallographica**. v. 61. p. 68-70, 2004.

PAPAVIZAS, G.C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology ecology and potencial for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, Califórnia, n.23, p.23-54, 1985.

PASCHOLATI. Fisiologia do Parasitismo: Como as Plantas se defendem dos Patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. 4. ed. v.1, p. 593-636. 2011.

PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI. In: I REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS CONTRA FITOPATÓGENOS, 19 a 21 de novembro de 2002, São Pedro – SP. **Summa Phytopathologica**, v. 29, n. 1, p. 115-116, 2003.

PEIXOTO, P.H.P.; MATTA, F.M. da; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 4, p. 821-832, 2002.

PEDRO, E.A. de S. **Trichoderma spp. na promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose em feijoeiro**. Dissertação de Mestrado. Instituto Biológico. São Paulo, 88p, 2012a.

PEDRO, E.A. de S.; HAKAKAVA, 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, 2012b.

PEREIRA, R.B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; AMARAL, D.R.; LUCA, G.C.; CAVALCANTI, F.R. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, 171p., 2008.

PEREIRA, J.O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa caendish***. 1993. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 1993.

PIÑOL, M.T.; PALAZÓN, J. Metabolismo secundário. In: BIETO-AZCON, J.; TALON, M. Fisiologia y bioquímica vegetal. **McGraw-Hill**, Madrid, p.273-283, 1996.



PILEGGI, S.A.V. **Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. por meio de marcadores RAPD e seu potencial farmacológico.** 2006. 125 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2006.

POLETTI, I. **Caracterização e manejo do patossistema erva-mate/podridão-de-raízes.** 2010. 97f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2010.

PUNJA, Z. K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v. 21, p. 400-7, 2003.

RAVA, C.A.; SARTORATO, A. Antracnose. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). **Principais doenças fúngicas do feijoeiro comum e seu controle.** Brasília: EMBRAPA-CNPAF. v. 50, p.17-40, 1994.

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

RAVA, C.A.; MOLINA, J.; KAUFFMAN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* em Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, DF, v.18, p.388-391, 1993.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CAMPOS, V.P. Resistência do cafeeiro A *Meloidogyne exigua*. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 34 São Pedro, 2001. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília: v. 26 (Suplemento), p. 499, 2001.

RIBEIRO, R.V.; MACHADO, E.C.; OLIVEIRA, R.F. Early photosynthetic of sweet Orange plants infected with *Xillela fastidiosa*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. London, v. 62, p. 167-173. 2003.

RIDOUT, C.J.; COLEY-SMITH, J.R.; LYNCH, J.M. Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *Trichoderma harzianum*. **Enzyme and Microbial Techonogy**, New York, n.10, p.180-187, 1988.

RODRIGUES, J. 2010. ***Trichoderma* spp. associado a níveis de adubação NPK no patossistema *Sclerotinia sclerotiorum*-feijoeiro.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

RODRIGUES, K.F.; DIAS FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.31, p.905-909, 1996.

SAKSIRIRAT, W.; CHAREERAK, P.; BUNYATRACHATA, W. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**. Special Issue, 2009.

SANTIN, R.C.M. **Potencial do uso de fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloydogine incognita* em *Phaseolus vulgaris***. 2008. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2008.

SANTOS, H.A.D. ***Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum***. 2008. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Faculdade de Agronomia e Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

SANTOS, J.B.; GOVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JUNIOR, T.J.; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. UFV-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2.ed., p. 41-65, 2006.

SALZMAN, R.A.; TIKHONOVA, I.; BORDELON, B.P.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. **Plant Physiology**. vol. 117, 1998.

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. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248. 2008.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, 30: 129-137, 2000.

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**, v.147, p. 2147–2163, 2008.

SILVA, V.N.D. A.; 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, 46: 1609-1618, 2011.

SILVA, K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; BOMFIM, M.P.; SILVA, D.S.; SÃO JOSÉ, A.R.; BENNETT, C.G.S. Atividade antagônica *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 749-754, 2008.

SILVA, L. H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; REZENDE, M.L.V.; CASTRO, R. M. Efeito do acibenzolar-S-methyl (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 735-744, 2001.

SILVEIRA, P.M.; STONE, L.F. Irrigação. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Editora UFV-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p.181-220, 1998.

SMITH, C. J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, n.1, p.1-45, 1996.

SOLANKI, M.K.; SINGH, N.; SINGH, R.K.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A.K.; KUMAR, S.; KASHYAP, P.L.; ARORA, D.K. Plant defense activation and management of tomato root rot by a chitin-fortified *Trichoderma/Hypocrea* formulation. **Phytoparasitica**, v.39, n.5, p.471-481, 2011.

SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; FILHO, S.A.; PINHEIRO, M.L.B.; SARQUIS, M.I. de M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônia**. Manaus, AM, v.34, n.2, p.185-195, 2004.

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WEIDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, p. 687-706, 1993.

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

STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, Florida, USA, v.19, p.1-30, 2000.

SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum: Biology, pathology and control**. Wallingford, p.1-16, 1992.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 820p., 2009.

TEDESCO, V. **Panorama e perspectiva de uso de *Trichoderma* spp. no manejo de patógenos radiculares com ênfase na cultura da soja**. 2009. 45f. Monografia (Especialista) Programa de Pós-graduação *Latu Sensu* em Tecnologias Inovadoras no Manejo Integrado de Pragas e Doenças de Plantas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, 34: 68-71, 2006.

VASCONCELOS, T.M.M.D. **Controle de *Sclerotium rolfsii*, causadora de podridão em feijoeiro, com *Trichoderma* spp. *Pseudomonas* sp. Fluorescentes e Fosfite**. 2011. 49f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

VAN LOON, L.C.; VAN STIEN, E.A. The families of pathogenesis relate proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55: 85-97, 1999.

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and hormonal regulation of a  $\beta$ -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, 189: 60-69, 1993.

VIEIRA, R.F.; VIEIRA, C.; VIEIRA, R.F. **Leguminosas graníferas**. Editora UFFV- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. United States Department of Agriculture (USDA). **Technical Bulletin**, Washington, n.868, p.225, 1957.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1061-1070, 1999.