

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

VANESSA FELIX VAZ STEFANELLO

**ANTAGONISMO A *Colletotrichum lindemuthianum* E ATIVAÇÃO DE
MECANISMOS DE DEFESA EM FEIJOEIRO-COMUM DESENCADEADOS POR
Trichoderma spp.**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON-PARANÁ

2015

VANESSA FELIX VAZ STEFANELLO

**ANTAGONISMO A *Colletotrichum lindemuthianum* E ATIVAÇÃO DE
MECANISMOS DE DEFESA EM FEIJOEIRO-COMUM DESENCADEADOS POR
Trichoderma spp.**

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

2015

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

VANESSA FELIX VAZ STEFANELLO

**ANTAGONISMO A *Colletotrichum lindemuthianum* E ATIVAÇÃO DE
MECANISMOS DE DEFESA EM FEIJOEIRO-COMUM DESENCADEADOS POR
Trichoderma spp.**

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, 24 de agosto de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Odair José Kuhn
Prof. Dr., CCA/UNIOESTE

José Renato Stangarlin
Prof. Dr., CCA/UNIOESTE

Lucimar Pereira Bonett
Prof. Dra., UNIPAR/TOLEDO-PR

A Deus pai todo poderoso, aquele que detém tamanha misericórdia e soberania, ao meu rei amado dono de todo o meu amor e devoção, ao único merecedor de toda honra, de toda glória, de todo louvor e de toda a minha adoração, aos meus pais, ao meu amado esposo Luciano e ao meu querido filho Samuel,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me amparar em todas as horas por me guardar até nos momentos em que eu achava que estava só, a ele que tem cumprido todas as suas promessas em minha vida, afinal céus e terras passarão mais as tuas palavras meu senhor jamais irão passar.

A minha amada família, meu esposo Luciano Stefanello que me ajudou no decorrer de todo o mestrado sendo meu fiel companheiro estando comigo no laboratório do início até o final dos longos dias em que nós realizávamos as bioquímicas, agradeço por muitas vezes ter abrido mão dos seus experimentos para ficar em função dos meus, ao meu querido filho Samuel Stefanello por ser tão bem comportado e permitir que a mamãe concluísse sua dissertação, a meus queridos pais João Carlos Vaz e Terezinha Felix Bastos Vaz, pela educação que deram e por todos os 'nãos', pelo afago e olhares amorosos que dispensavam qualquer palavra, aos meus irmãos Antônio Carlos Felix Vaz e Lucas Felix Vaz por serem meu refúgio nos momentos de dúvidas e indecisão.

Ao meu orientador Professor Dr. Odair José Kuhn, por aceitar uma orientada que veio de forma inusitada, pela forma como me mostrou o caminho a seguir nesta jornada fantástica que foi a pós-graduação, por todos os ensinamentos, pela enorme paciência e por sempre se manter presente.

A Professora Dra. Lucimar Pereira Bonett coordenadora do curso de Ciências Biológicas da Universidade Paranaense-Unipar, pela colaboração com minha pesquisa.

Ao Professor co-orientador Dr. José Renato Stangarlin pelas suas sábias palavras, por sempre se mostrar paciente e presente, por dominar como poucos a arte de ensinar.

Aos meus colegas de pós-graduação Omari Dangelo Forlin Dildey, Sidiane Coltro-Roncato, Alice Jacobus de Moraes, Edilaine Della Valentina Gonçalves, Nicanor Pilarski Henkemeier, Emanuele Dal'Maso, Cristiane Cláudia Meinerz, Eloisa Lorenzetti, Andersom Luis Heling, por toda a colaboração para com o meu trabalho, por se mostrarem solícitos e prestativos, agradeço por ajudarem a enriquecer o presente trabalho.

Aos Professores que eu tive a honra de ser aluna, Edmar Soares de Vasconcelos, Vandeir Francisco Guimarães, Affonso Celso Gonçalves Junior, Fabiola Villa, Eurides Kuster Macedo Junior.

Aos funcionários da Unioeste que de alguma maneira seja ela direta ou indireta colaboraram para que este trabalho fosse concretizado.

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

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

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e sugestões.

Alguns homens veem as coisas como são, e dizem ‘Por quê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo, ‘Por que não?’ (Geroge Bernard Shaw)

RESUMO

Stefanello, Vanessa, F. V. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, junho de 2015. **Antagonismo a *Colletotrichum lindemuthianum* e ativação de mecanismos de defesa em feijoeiro comum desencadeados por *Trichoderma* spp.** Orientador: Odair José Kuhn. Co-orientador: José Renato Stangarlin.

O objetivo do trabalho foi avaliar a ação do *Trichoderma* spp. e seus filtrados como agente de biocontrole da antracnose e indutor de resistência em feijoeiro. Conduziram-se dois experimentos *in vitro*, onde foi realizado teste de germinação de conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* após tratamento com filtrados de *Trichoderma* spp., e o teste de confronto direto de culturas de 21 isolados de *Trichoderma* spp. frente a esse patógeno também conduziu-se dois experimentos *in vivo*: no primeiro se impôs os tratamentos a base de *Trichoderma* no feijoeiro inoculado via semente; já no segundo experimento a aplicação dos tratamentos se deu por meio de pulverização foliar de filtrados de *Trichoderma* spp. Para os experimentos *in vivo* realizaram-se coletas de folhas para análises bioquímicas, no qual houve duas coletas para o experimento cujos tratamentos foram via semente (aos 15 dias após a emergência foliar e três dias após a inoculação do patógeno). Já para o experimento aos quais os tratamentos foram via pulverização foliar de filtrados de *Trichoderma*, realizaram-se três coletas, (a primeira sem a aplicação do tratamento, a segunda realizada três dias após a pulverização dos filtrados e a terceira coleta realizada três dias após a inoculação do patógeno). Determinou-se a atividade de polifenoloxidase (PFO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL), e foram avaliados os teores de proteínas totais, fenóis totais, lignina e a severidade da antracnose após os tratamentos a base de *Trichoderma* para ambos os experimentos. Para o teste de germinação de conídios de *C. lindemuthianum*, os filtrados dos isolados TM1, TI1 e TOD1 reduziram a germinação em, 33%, 38% e 61% respectivamente. No confronto direto percebeu-se que os isolados inibiram o crescimento do patógeno. Para a atividade de PFO em tratamentos via semente, os isolados TLB12, TOD1 e TOD2B causaram aumento da mesma após o desafio com o patógeno, enquanto que no tratamento via pulverização foliar de filtrados de *Trichoderma* não foi observada diferença significativa. A atividade de POX em feijoeiro tratado na semeadura, para o tempo 1 não observou-se diferença entre os tratamentos, já no tempo 2 alguns isolados tenderam a suprimir a atividade enzimática, enquanto que para as plantas tratadas via pulverização foliar nota-se tendência de supressão enzimática da POX no tempo 2 ocasionada por alguns filtrados em relação ao controle

positivo. A atividade enzimática de FAL e os teores de proteínas solúveis totais tanto na aplicação dos tratamentos via semente quanto via pulverização foliar em feijoeiro não acarretou em diferença significativa. Para os teores de fenóis totais e de lignina os tratamentos a base de *Trichoderma* via semeadura e via pulverização foliar não promoveram incremento dos mesmos em feijoeiro. Já a severidade em feijoeiro tratado apresentou-se no geral baixa, tornando estes dados imprecisos.

PALAVRAS-CHAVE: indução de resistência; controle alternativo; Controle biológico; filtrados.

ABSTRACT

Stefanello, Vanessa, F. V. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, junho de 2015. **Antagonismo a *Colletotrichum lindemuthianum* e ativação de mecanismos de defesa em feijoeiro comum desencadeados por *Trichoderma* spp.** Orientador: Odair José Kuhn. Co-orientador: José Renato Stangarlin.

The objective of the work was to evaluate the action of *Trichoderma* spp. and its filtered as biocontrol agent of anthracnose and resistance inducer in beans. Were conducted two experiments *in vitro*, where were made a germination test of *Colletotrichum lindemuthianum* conidium after the treatment with *Trichoderma* spp. filtered, and the direct confrontation test of 21 cultures isolated from *Trichoderma* spp. against this pathogen were also conducted two experiments *in vivo*: on the first imposed treatments in base of *Trichoderma* in the beans inoculated via seed; on the second experiment the treatments application were made through foliar spray of filtered medium of *Trichoderma* spp. For the experiments *in vivo* were realized sheets collects for biochemical analysis, in which there were two collects for the experimente that were treated via seed (15 days after the foliar emergency and three days after the pathogen inoculation). Whereas for the experiment which the treatments were via foliar spray of filtered medium of *Trichoderma*, were realized three collectings, (the first without the treatment application, the second three days after the filtered pulverization and the third collect realized three days after the pathogen inoculation). Were determined the polyphenoloxidase activity (PFO), peroxidase (POX) and phenylalanine ammonia lyase (FAL), and were evaluated the total protein content, total phenols, lignin and the severity of anthracnose after treatments in base of *Trichoderma* for both experiments. For the germination test of *C. lindemuthianum*, conidium the filtered from the isolated TM1, TI1 and TOD1 reduced the germination in, 33%, 38% and 61% respectively. In direct confrontation were realized that the isolated inhibited pathogen growth. For the PFO activity in via seed treatment, the isolated TLB12, TOD1 and TOD2B caused an increase thereof after challenge with the pathogen, while the treatment via foliar spray of *Trichoderma* filtered were not observed significant difference. The POX activity in beans treated at sowing, for the time 1 weren't observed difference between the treatments, whereas in the time 2 some isolated tended to suppress the enzymatic activity, while for plants treated via foliar pulverization notes the tendency to enzymatic suppression of POX in time 2 caused by some filtered in relation to the positive control. The FAL enzymatic activity and the total soluble protein contents both in the application of the treatments via seed and via foliar

pulverization in beans didn't result in significant difference. For the total phenol contents and lignin the treatments in base of *Trichoderma* via sowing and via foliar pulverization didn't promote an icrease of the same in beans. The severity in treated beans presented in general low, making these inaccurate data.

KEY WORDS: resistance induction, alternative control, biologic control, filtered.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de confrontação direta de cultura. Fonte: Rodrigues (2010).	34
Figura 2. Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999).	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação da espécie dos isolados e local de origem dos isolados	31
Tabela 2. Escala utilizada para teste de pareamento de culturas proposto por Rodrigues (2010).	34
Tabela 3. Percentual de conídios germinados de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> após 24 horas da aplicação dos filtrados de <i>Trichoderma</i> spp.....	43
Tabela 4. Pareamento de cultura de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. frente à <i>C. lindemuthianum</i>	46
Tabela 5. Atividade de polifenoloxidase em tecido foliar de feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	48
Tabela 6. Atividade de polifenoloxidase em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrado de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	50
Tabela 7. Atividade de peroxidase em tecido foliar de feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	52
Tabela 8. Atividade de peroxidase em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrados de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	54
Tabela 9. Atividade de fenilalanina amônia-liase em tecido foliar feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	56
Tabela 10. Atividade de fenilalanina amônia-liase em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrado de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	58
Tabela 11. Teor de proteínas solúveis totais em tecido foliar feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	59
Tabela 12. Teor de proteínas solúveis totais em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrado de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	60
Tabela 13. Teor de fenóis totais em tecido foliar de feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	62
Tabela 14. Teor de fenóis totais em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrado de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	64
Tabela 15. Teor de lignina em tecido foliar de feijoeiro tratadas via aspersão foliar com filtrado de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	66

Tabela 16. Severidade de antracnose causada por <i>Colletotrichum. lindemuthianum</i> em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com filtrados de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	69
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA.....	18
2.1	A CULTURA DO FEIJOEIRO	18
2.2	ANTRACNOSE- <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	20
2.3	CONTROLE BIOLÓGICO	21
2.4	<i>Trichoderma</i> spp.	23
2.5	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	23
2.6	PRÉ-CONDICIONAMENTO (<i>PRIMING</i>)	25
2.7	MECANISMOS DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	26
2.7.1	Polifenoloxidase (PFO).....	26
2.7.2	Peroxidase (POX).....	27
2.7.3	Fenilalanina amônia-liase (FAL)	27
2.7.4	Compostos Fenólicos	28
2.7.5	Lignina	29
3	MATERIAL E METÓDOS.....	29
3.1	LOCAL	30
3.2	CULTIVAR IAPAR 81	30
3.3	ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i>	30
3.4	OBTENÇÃO DO INÓCULO DE <i>Trichoderma</i>	31
3.5	PREPARAÇÃO DOS FILTRADOS DE ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp.	31
3.6	OBTENÇÃO DO FITOPATÓGENO - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	32
3.7	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	32
3.7.1	Germinação de Conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> após Tratamento com Filtrados de Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	32

3.7.2	Pareamento de Cultura de Isolados <i>Trichoderma</i> spp. Confrontados com <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	33
3.8	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	34
3.8.1	Indução de Resistência de Plantas de Feijoeiro	34
3.8.2	Proteínas Totais e Enzimas de Defesa Vegetal.....	36
3.8.2.1	Extratos Proteicos para Determinação da Atividade Enzimática e Teor de Proteínas.....	36
3.8.2.2	Teor de Proteínas Solúveis Totais	37
3.8.2.3	Atividade de Polifenoloxidase (PFO)	37
3.8.2.4	Atividade de Peroxidase (POX).....	37
3.8.2.5	Atividade de Fenilalanina Amônia-liase (FAL)	38
3.9	OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE TECIDO FOLIAR PARA A DETERMINAÇÃO DE TEORES DE FENÓIS TOTAIS E LIGNINA.....	38
3.9.1	Teores de Compostos Fenólicos e de Lignina	39
3.9.2	Compostos Fenólicos.....	39
3.9.3	Lignina	39
3.10	AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA ANTRACNOSE EM FEJJOEIRO TRATADO	40
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA E TABULAÇÃO DE DADOS	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	41
4.1.2	Germinação de Conídios de <i>C. lindemuthianum</i> Tratados com Filtrados de Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	41
4.1.3	Confronto Direto de Cultura de Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. Frente à <i>C. lindemuthianum</i>	43
4.2	ENSAIOS <i>IN VIVO</i>	46
4.2.1	Atividade de Polifenoloxidase	46
4.2.2	Atividade de Peroxidase (POX).....	50

4.2.3	Atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL)	55
4.2.4	Teor de Proteínas Solúveis Totais.....	58
4.2.5	Teor de Fenóis Totais	61
4.2.6	Teor de Lignina.....	64
4.2.7	Severidade de Antracnose.....	67
5	CONCLUSÕES.....	70
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é ingrediente essencial na dieta alimentar do brasileiro, por possuir uma boa fonte de proteína. Considerando o gênero *Phaseolus*, o Brasil é o maior produtor de feijão possuindo uma produção de 3,44 milhões de toneladas na safra 2013/2014 (CONAB, 2014). Um problema que afeta a produção do feijão e seus aspectos econômicos é o surgimento de doenças, as mesmas podem ser ocasionadas por fungos, vírus, nematoides e bactérias, dependendo da influencia ambiental (FAGERIA; STONE, 1999).

Entretanto, dentre as doenças de interesse destaca-se a antracnose causada por *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Saccardo & Magnus) Briosi & Cavara (1989). É uma das doenças de maior importância da cultura do feijoeiro, podendo causar danos de até 100% (BIANCHINI et al., 2005). Os sintomas típicos desta doença são lesões necróticas de coloração marrom-escura nas nervuras na face inferior da folha e lesões produzidas nas vagens (BIANCHINI et al., 2005). O controle pode ser feito pelo uso de sementes saudáveis, cultivares resistentes, rotação de cultura e o tratamento com químicos (PAULA JÚNIOR et al., 2008).

Porém a utilização excessiva de agrotóxicos vem sendo amplamente discutida, devido aos danos que podem provocar à saúde humana, animais e ambiente ocasionando a contaminação do solo e dos recursos hídricos (BOZIKI; BEROLDT; PRINTES, 2011).

Neste caso, uma alternativa para reduzir a utilização de agroquímicos para o controle de doenças de plantas, é fazer uso do biocontrole podendo ser utilizado o controle biológico natural ou se realizando a introdução de um agente antagonista (BETTIOL; MORANDI, 2009; ALMEIDA, 2009). Sendo um antagonista potencial o *Trichoderma* spp. que é o agente de controle biológico de doenças de plantas mais estudado e utilizado nos países da América Latina (BETTIOL et al., 2008). Segundo Gauch (1996) entre as habilidades do *Trichoderma* spp. está a capacidade de indução de defesa do hospedeiro.

Na indução de defesa, sabe-se que os mecanismos nas plantas são ativados ou por indução do antagonista ou apenas na presença do patógeno o que acarreta em benefícios para planta (KUHN, 2007). Dentre os produtos sintetizados pelo metabolismo da planta para defesa contra patógenos estão as enzimas. Em vista disso o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação de isolados de *Trichoderma* spp. e seus filtrados como agente de biocontrole

da antracnose e indução de resistência em feijoeiro. Para isso, objetivou-se: 1º avaliar o efeito dos filtrados de *Trichoderma* spp. sobre a germinação dos conídios do patógeno ; 2º avaliar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. em inibir o desenvolvimento de *C. lindemuthianum*; 3º investigar o potencial do antagonista em induzir resistência em *Phaseolus vulgaris*.

2 REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

2.1 A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro é pertencente à família *Leguminosae*, ao gênero *Phaseolus* L. e a espécie *Phaseolus vulgaris* L. é de vital importância por compor 22% de proteína na semente além de 60% de carboidratos e de ser rico em ferro, lipídeos e sais minerais (WANDER; RAMALHO; ANDRADE, 2005). A taxa elevada de tais componentes se da ao fato da mesma conter um conteúdo reduzido de água (10%-15%) (SANTOS; GAVILANES, 2006).

Apesar de controversas se relata que o feijão-comum teve dois centros principais de origem e domesticação e um terceiro de menor expressividade (DEBOUCK, 1991, ANGIOI et al., 2010). A primeira classificação dos centros de origem do feijoeiro e das raças contidas foi proposta por SINGH et al. (1991). Sendo, portanto a América Central o primeiro local de diversificação com destaque para o México que foi onde se deu origem a cultivares de grãos pequenos como o “Carioca”, tais espécies foram subdivididas em três raças: Durango, Jalisco e Mesoamericana. O segundo centro esta localizado no Sul dos Andes, mais especificamente ao norte da Argentina e ao Sul do Peru, onde se originou as cultivares de grãos maiores, sendo que os feijões pertencentes ao centro de origem Andino também foram ramificados em três raças: Nova Granada, Peru e Chile (SINGH et al., 1991). A terceira área de domesticação e também de menor relevância localiza-se na Colômbia, provavelmente intermediaria entre as duas primeiras, como se relata em estudos com a faseolina que é a principal proteína do feijão (SANTOS; GAVILANES, 2006).

Ressalta-se também a ocorrência de outros centros secundários como os localizados na América do Sul, Europa, Ásia e África originadas a partir dos três centros principais anteriormente mencionados, é um dos principais fatores que permitiram o surgimento de diversas raças selvagens da espécie *Phaseolus vulgaris* L., embora também seja uma das

causas da dificuldade de localização exata dos locais de domesticação desta cultura (FREITAS, 2006; CHEN et al., 2010).

O feijoeiro de maneira geral possui uma fase de crescimento determinado, isto é, a emissão e alongamento foliar cessam pelo advento das flores, e indeterminado, pois também é constatado que a plantas de feijoeiro apresentando o processo de crescimento após a floração (FANCELLI; DOURADO NETO, 2007). Possui um sistema radicular complexo onde raízes secundárias e terciárias surgem a partir da primária que tem origem do embrião, o caule é herbáceo classificado morfológicamente como haste que por sua vez é revestido de uma coloração e pilosidade característica de acordo com o estágio de desenvolvimento da planta. É uma espécie herbácea, trepadeira ou rasteira, cujo ciclo de vida varia de 65 a 120 dias, dependendo da cultivar utilizada e das condições ambientais e época de cultivo (GONÇALVES, 2008). Segundo a Conab (2014) o Brasil, Índia, China, Myanmar e México são os cinco maiores produtores, representando mais de 65% da produção mundial de feijão.

Em geral o consumo deste alimento no Brasil esta relacionado a aspectos culturais e históricos, o feijão-comum é tradicional na culinária diária do brasileiro com significativo papel social, o seu consumo *per capita* no país é o mais alto do mundo, apesar do mesmo ter diminuído nas últimas três décadas situando-se nas décadas de 1970, 1990 e 2001 em torno de 23-24 kg/habitante/ano, 16,2 kg/habitante/ano e 14,9 kg/habitante/ano respectivamente (FERREIRA et al., 2006). É provável que a mudança de hábitos alimentares, esta intimamente relacionada ao advento do *fast food* e a elevada variação na oferta do produto fato este que reflete o descaso de órgãos competentes para com a agricultura, a falta de planejamento e precariedade na orientação técnica (FANCELLI; DOURADO NETO, 2007).

No Brasil o cultivo do feijão-comum é bastante amplo, sendo o país uma das maiores potências agrícolas mundiais, possuindo importância no cultivo tanto de grandes como de pequenas propriedades. A produção nacional se localiza nos Estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, Ceará, São Paulo, Goiás, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Pernambuco e Pará. Apesar disso, a produção nacional não é suficiente para abastecer o país, necessitando importar este produto de outros países como América Latina e Estados Unidos (BORÉM; CARNEIRO, 2006, EMBRAPA, 2014).

De acordo com Salgado (2007), no Brasil há um número significativo de genótipos com características particulares e dos mais variados grupos, sendo que destes o feijão carioca tem maior aceitação no mercado interno e é o tipo de grão mais semeado no país.

Um problema que tem afetado a produção de feijão e seus aspectos econômicos é o surgimento de doenças que podem depreciar a qualidade do grão e causar redução da

produtividade, as mesmas podem ser causadas por fungos, vírus, nematoides, bactérias e pragas, dependendo também da influência ambiental, acidez do solo, disponibilidade hídrica e condição nutricional da cultura (FAGERIA; STONE, 1999).

Dentre os microrganismos com potencial em patogenicidade os fungos são os principais causadores de doenças, como consequência do amplo número de espécies envolvidas e da eficiência dos mecanismos de penetração (SNOWDON, 1990).

Mais de duzentos patógenos entre fungos, procariotos, vírus e nematoides, têm sido relatados ocorrendo durante o ciclo de vida da cultura, limitando a produtividade ou reduzindo a qualidade sanitária, fisiológica ou nutricional do feijão (RAVA; SARTORATO, 1994).

2.2 ANTRACNOSE- *Colletotrichum lindemuthianum*

O agente causal da antracnose do feijoeiro é o *Colletotrichum lindemuthianum* sendo este a fase assexual e imperfeita, a fase sexual é considerada como perfeita corresponde ao ascomiceto *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. Este fungo também pode ser patogênico a outras espécies de leguminosas como a *P. lunatus*, *P. acutifolius*, *P. coccineus*, *Vigna unguiculata* e *Vicia faba*. O micélio é septado e ramificado, com conídios hialinos, unicelulares, podendo se apresentar-se de forma oblonga e cilíndrica, com massa de esporos formada em acérvulos (BIANCHINI et al., 2005). É uma das doenças de maior importância da cultura do feijoeiro, podendo causar danos de até 100%, é cosmopolita, por este motivo ocorre em ambientes de temperatura baixa a moderada entre 13 e 27 °C, com ótima a 21 °C combinadas com umidade de aproximadamente 91% (BIANCHINI et al., 2005).

Em condições ideais os conídios germinam de seis a nove horas formando tubo germinativo e apressórios que penetram mecanicamente através da cutícula e epiderme do hospedeiro, com surgimento dos sintomas seis dias após a infecção (SARTORATO; RAVA, 1994; BIANCHINI et al., 2005).

A antracnose é mais severa quando a mesma é detectada no início do plantio (PASTOR-CORRALES; TU, 1994). Os sintomas típicos da antracnose são lesões necróticas de coloração marrom-escura nas nervuras na face inferior da folha e lesões produzidas nas vagens (ROSOLEM; MARUBAYASHI, 1994), os mesmos podem ser visualizados

nitidamente em qualquer órgão da parte aérea da planta, dependendo do inóculo e intensidade da doença. As lesões no caule e pecíolo possui em geral forma elíptica, deprimidas e escuras podendo aprofundar-se nos tecidos em condições que favoreçam o patógeno, dependendo da disponibilidade ambiental surge no centro das lesões uma massa de esporos denominada mucilagem de coloração rósea (JUNIOR; ZAMBOLIM, 2006).

No Brasil, mais de 50 raças de *C. lindemuthianum* foram identificadas, embora durante os últimos anos as raças 65, 73 e 81 foram mais observadas (SILVA et al., 2007). O patógeno sobrevive de um cultivo a outro como micélio dormente dentro do tegumento da semente, nas células dos cotilédones, na forma de esporos, ou em restos de culturas, a transmissão à longa distância é feita pela semente contaminada, e a curta distância pelos respingos da água de chuva ou de irrigação que carregam os esporos, sendo esta a principal via de sobrevivência e disseminação do patógeno (EMBRAPA, 2002).

No entanto a utilização dos agrotóxicos vem sendo amplamente discutido, devido a possíveis danos à saúde humana e ao ambiente natural. As principais substâncias químicas atualmente utilizadas como agrotóxicos surgiram durante a primeira guerra mundial sendo empregados também durante a segunda guerra, com isso, os venenos “modernos” foram modificados para serem aplicados nas lavouras (MORANDI; BETTIOL, 2009).

Os agrotóxicos são os principais poluentes na agricultura atual, os químicos não se limitam a um determinado local, apesar de serem aplicados em uma área determinada, pois os mesmos são carregados pela ação da chuva, do vento ou de interferências antrópicas (PESSOA, 1999). Com o grande consumo de agrotóxico, surge o problema da contaminação do solo e dos recursos hídricos (BOZIKI; BEROLDT; PRINTES, 2011).

Outra maneira de se obter o controle da antracnose no feijoeiro é o uso do controle alternativo e do controle biológico, que visam o manejo de patógenos pelo uso de extratos de plantas, caldas obtidas por fermentação ou inimigos naturais.

2.3 CONTROLE BIOLÓGICO

O uso indiscriminado de agrotóxicos nas lavouras é um dos principais problemas da agricultura atual. Esta prática desencadeia uma serie de fatores negativos tais como: contaminação dos alimentos, do solo e dos recursos hídricos, sendo também fonte de intoxicação de pessoas e de animais, além de ser responsável por desencadear resistência de pragas, de patógeno e de plantas invasoras (SOUSA et al., 2012).

A conscientização dos impactos que a utilização em demasia de agrotóxicos na agricultura causa na natureza e em toda a cadeia trófica vem alterando o cenário agrícola, aumentando a consciência dos consumidores e resultando em mercados de alimentos produzidos de maneira mais sustentável. Das ferramentas que estão sendo empregado para se reduzir o uso de químicos é o controle alternativo ou biológico, que pode se dar tanto de maneira natural ou pela introdução de um agente antagonista (BETTIOL; MORANDI, 2009; ALMEIDA, 2009).

Historicamente, o controle biológico foi relatado já no século III a.C., quando os chineses observaram que as formigas predadoras reduziam as populações de pragas dos citros, tempos depois em 1602 a descoberta de Aldrovandi, que relatou o parasitismo da lagarta-das-crucíferas por *Apanteles glomeratus*, considerado este como o primeiro registro do controle biológico com parasitoides (BERTI FILHO; CIOCIOLA, 2002; NAVA, 2007).

O primeiro pesquisador a conceitua-lo foi Harry S. Smith em 1919 em uma reunião de entomologistas para se referir ao uso de inimigos naturais no controle de pragas de culturas agrícolas (BERTI FILHO; CIOCIOLA, 2002).

De acordo com Batista Filho (2006), o controle biológico pode ser definido como a ação de organismos que mantêm a população de outros organismos considerados pragas ou doenças, em um nível menor do que ocorreria sem a sua presença.

O controle biológico faz uso de mecanismos que propiciam um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência de plantas hospedeiras ou ambas, sendo também utilizado para fins de melhoramento de planta visando aumentar a resistência ao agente patogênico ou ate mesmo adequar o hospedeiro para atividades antagônicas de microrganismos, que em geral são agentes saprófitos, linhagens não patogênicas ou até mesmo outros organismos que proporcione benefícios em potencial. Sendo, portanto a definição de maior simplicidade de controle biológico, como: “O controle de um microrganismo através de outro microrganismo” sendo aceita por diversos fitopatologistas (BETTIOL; GHINI, 1995).

Segundo Moraes (1992), na denominação generalizada de controle alternativo inclui-se também o termo controle biológico e controle induzido, tal prática é conhecida por não fazer uso de defensivos agrícolas, mais também podendo ser empregado em conjunto com o controle químico e outras práticas culturais de rotina.

2.4 *Trichoderma* spp.

É um fungo imperfeito Deuteromiceto, subclasse Hifomiceto, ordem Monialiales, família Moniliaceae, o mesmo produz conídios em abundância a partir de conidióforos que se originam diretamente de hifas (MELO 1998; SAMUEL, 1996). Este Deuteromiceto é natural de solo rico em matéria orgânica, é um micoparasita necrotrófico eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente os que possuem estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos (MELO, 1996).

O *Trichoderma* sp. é o agente de controle biológico de doenças de plantas mais estudado e utilizado nos países da América Latina, se destacando entre os microrganismos por possuir potencial antagônico (BETTIOL et al., 2008). No Brasil teve início em 1950, quando Foster descreveu sobre o potencial dos filtrados na inativação do vírus do mosaico do fumo. (BETTIOL; MORANDI, 2009).

Os fungos de gênero *Trichoderma* spp. caracterizam-se por se relacionar com o agente patogênico por mecanismos como antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de defesa do hospedeiro (GAUCH, 1996). A antibiose pela síntese de substâncias micoparasíticas e antibióticas que são potencialmente tóxicas a fitopatógenos competem com os outros microrganismos pelos nutrientes disponíveis no ambiente de ação (ARGUMEDO-DELIRA et al., 2009).

Alem disso, são considerados saprófitos potentes e eficientes por agirem como antagonistas de alguns patógenos de grande importância econômica, e também por interferirem no metabolismo das plantas promovendo acréscimo no crescimento (RESENDE et al., 2004).

2.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A ativação do processo de defesa é desencadeada quando uma molécula elicitadora se liga ao receptor na célula vegetal, ou seja, na tentativa do patógeno penetrar no hospedeiro, ou ate mesmo quando um inseto agride a superfície do tecido vegetal, moléculas liberadas destes organismos, sejam elas exsudatos de fungos ou bactérias, ou mesmo saliva de inseto.

Essas moléculas são reconhecidas por proteínas receptoras de membrana, sendo desencadeado o envio de um sinal primário, que ativam os mensageiros secundários, que amplificam o sinal e determinam um padrão de resposta ativando mecanismos de defesa que atuarão diretamente contra as atividades do patógeno (LEITE, 1997). Essa característica das plantas permite com um elicitor adequado induzir as defesas das plantas antes mesmo que os patógenos alcancem sua superfície.

Em fitopatologia, resistência é regra e susceptibilidade é exceção (AGRIOS, 2005), se não fosse desta maneira provavelmente a escassez de produtos sadios e viáveis seria tão grande, que com certeza o acesso da população em relação à alimentação estaria ainda mais comprometido, levando em consideração os custos de produção que seriam ainda maiores. Apesar das plantas não possuírem sistema imunológico como nos animais, elas são capazes de se defender de ataques indesejáveis de patógenos, apresentando diversas respostas a estresses bióticos e abióticos (PASCHOLATI, 2003).

O fenômeno da indução de resistência em plantas a patógeno já é conhecido desde o início do século XIX (MULLER; BORGER, 1940), a partir deste trabalho pioneiro foi possível verificar que tubérculos de batatas previamente inoculados com um isolado não agressivo de *Phytophthora infestans*, expressavam resistência quando desafiados com um isolado agressivo.

A eficiência das plantas ao se defenderem de ataques de insetos, pragas e fitopatógenos ocorre pelos mecanismos existirem em multiplicidade, a resistência natural de plantas a patógenos baseia-se em barreiras e mecanismos já existentes, independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção. (BARROS et al., 2010).

Contudo, as plantas possuem outras formas de se defenderem de ataques, que se mostram ainda mais eficientes e que podem permanecer inativos ou latentes, sem que sua presença seja notada, expressando-se apenas no momento de ameaça eminente, isso após a exposição do tecido vegetal ao agente de indução (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005). Neste caso, a resistência é induzida, pois as plantas percebem a agressão, ativam suas defesas e se adaptam, o que permite sua sobrevivência, mais devido ao enorme gasto energético reduzem seu potencial produtivo (BARROS, et al. 2010).

Atualmente visa-se a proteção de plantas com uma menor utilização de insumos tóxicos, sendo reforçada a busca por produtos alternativos visando o controle de doenças, os indutores de resistência se destacam pela sua eficiência no controle de doenças de plantas e serem praticamente atóxicos, não deixando resíduos que causam danos a saúde humana, dos

animais e do meio ambiente (RESENDE et al., 2007). O termo indução de resistência refere-se para apontar tanto uma proteção local, quanto sistêmica (MORAES, 1992).

Diversos processos são envolvidos na indução de resistência, que vão desde a percepção de sinais, sua transdução aos sítios alvos e por fim a tradução destes sinais que resultam na expressão dos genes de defesa (RESENDE et al., 2007). Dentre os mecanismos de defesa que são ativados pelas plantas em resposta a uma previa indução, encontram-se as barreiras estruturais pós-formadas, aumento da síntese de fitoalexinas e acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (PRP's) (HAMMERSCHMIDT, 1999), resposta de hipersensibilidade, alterações na estrutura da célula vegetal, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (explosões oxidativa) e síntese de metabolitos secundários (GUZZO; HAKAKAVA, 2007).

Com o avanço das pesquisas, diversos produtos vêm sendo acompanhados, por proporcionarem melhora na produtividade agrícola, devido à redução de danos ocasionada por patógenos (RESENDE, 2006). Dos produtos que induzem a resistência, mais estudados, destacam-se os biofertilizantes que podem atuar como elicitores potentes na resistência sistêmica induzida (BARBOSA; MEDEIROS, 2007), os extratos vegetais (BETTIOL; STADNIK, 2001; KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS; SCHMITT, 1998; STANGARLIN, et al., 1999;), os óleos essenciais que são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas e tem sido vistos por apresentarem substâncias químicas de atividades biológicas intensas (ALVES; PERINA, 2014), podendo se usar também elicitores químicos como acibenzolar-S-metil (BOKSHI; MORRIS; DEVERALL, 2003), raças não virulentas de patógenos (MONOT et al., 2002; SHIRAISHI et al., 1995), bactérias como a *Pseudomonas* spp. e as rizobactérias que exercem diversas funções como controle de doenças e ativação do sistema de defesa (MEDEIROS et al., 2012) e agentes antagonistas, como os fungos do gênero *Trichoderma* spp. (COLARES; BONALDO, 2014).

2.6 PRÉ-CONDICIONAMENTO (*PRIMING*)

O estado de *Priming* é um aumento da capacidade das plantas responderem a uma ameaça, pela qual ocorre a ativação de mecanismos de defesa celular no momento em que o patógeno chega (CONRATH et al., 2002).

Plantas após receberem tratamento com agente de indução e serem desafiadas por um patógeno, aumentam sua sensibilidade sendo possível notar nas mesmas alterações

metabólicas, já que as respostas de defesa acontecem de forma mais rápida e intensa, evidenciando que a planta tratada está mais apta a se defender na presença do patógeno (KUHN et al., 2006).

Logo após a indução já na presença do patógeno desafiante, os eventos bioquímicos são alterados, além do acionamento de outros mecanismos (estruturais), em contrapartida as plantas não induzidas e inoculadas com o patógeno apresentam uma menor funcionalidade de eventos no momento da defesa (KUHN et al., 2006). Sendo assim quando ocorre tratamento com agentes bióticos ou abióticos que visam à indução sistêmica de resistência, embora não se observe grandes alterações, a planta se apresenta sistemicamente protegida e reage de maneira mais rápida quando desafiada a um patógeno virulento (HEIL; BOSTOCK, 2002).

2.7 MECANISMOS DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

2.7.1 Polifenoloxidase (PFO)

A polifenoloxidase é uma enzima oxidativa envolvida no processo de defesa vegetal contra fitopatógenos, participa da formação da lignina e de compostos oxidativos, contribuindo para formação de barreiras de defesa e também na ação direta sobre o patógeno (SILVA et al., 2009). Sua expressão pode ser induzida por ferimentos ou por agentes exógenos (CONSTABEL; BERGEY; RYAN, 1995).

Polifenoloxidases catalisam dois tipos de reações que envolvem o oxigênio, a primeira reação corresponde à hidroxilação de monofenóis que forma os orto-difenóis e a segunda à oxidação de orto-difenóis formando orto-quinonas que é altamente antimicrobiana (VAUGHN; DUKE, 1984). As polifenoloxidases atuam sobre uma grande variedade de substratos, como p-cresol, tirosina e ácido p-cumárico como substratos monofenólicos, enquanto catecol, diidroxifenilalanina e ácido clorogênico substratos difenólicos (ALMEIDA et al., 2014; GOMES et al., 2001).

Viecelli et al., (2009) ao submeter sementes de feijão-comum à filtrados de *P. sanguíneos*, notou um incremento na atividade de polifenoloxidase, a nível local e sistêmico, sugerindo que esta enzima é importante na defesa contra fitopatógenos. Já Kuhn (2007) em

seus estudos não observou aumento na atividade da polifenoloxidase em feijoeiro tratado com os indutores bióticos e abióticos respectivamente *Bacillus cereus* e ASM.

Na defesa vegetal a PFO é uma das enzimas com principal ação, pois a concentração de quinonas no tecido vegetal prejudica a nutrição dos insetos (TAIZ; ZEIGER, 2013). Já na ação contra fitopatógenos, o gatilho que desencadeia a produção da mesma é a penetração do patógeno, que degrada parede celular e acaba por oxidar os compostos fenólicos e produzindo quinonas que apresentam ação antimicrobiana (LIU et al., 2005).

2.7.2 Peroxidase (POX)

As peroxidases são enzimas relacionadas à patogênese e são conhecidas por estarem envolvidas em vários processos fisiológicos ao longo do ciclo de vida da planta (ALMAGRO et al., 2008), isso se deve provavelmente ao elevado número de isoformas enzimáticas em que se apresenta e a versatilidade de reações catalizadas (PASSARDI et al., 2005). Possui ampla distribuição no reino dos vegetais, sendo relatada a abundante presença desta enzima nos grupos, clorófitas (algas verdes), euglenófitas (algas flageladas também presente no reino protista), rhodophyta (algas vermelhas), briófitas, pteridófitas, e todo o grupo de espermatófitas (plantas que produzem sementes) (PASSARDI et al., 2007). Estão presentes também em tecidos de animais, plantas e em microrganismos, sendo a função básica a oxidação desidrogenativa do guaiacol (*o*-metoxi-fenol) (HIRAGA et al., 2001).

A POX apresenta vários substratos, com moderada afinidade para fenóis, especialmente para o álcool coniferílico (MORALES; ROS BARCELO, 1997). Sendo uma enzima relacionada à patogênese a mesma é sintetizada pela planta em resposta a um ataque de patógeno ou outra situação que causem estresse à planta, acumulando-se a nível local e sistêmico (SCHERER et al., 2005). De acordo com Passardi et al. (2005) são eficazes no controle da infecção já que limitam a mesma, por meio de barreiras estruturais (suberina, lignificação) e formando um ambiente altamente tóxico (devido ao acúmulo de ERO's) para o microrganismo patogênico.

2.7.3 Fenilalanina amônia-liase (FAL)

Fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma das enzimas ponto de ramificação entre metabolismo primário e secundário. Ela desempenha um papel importante durante o desenvolvimento da planta e de sua defesa (SONG; WANG, 2009).

O ácido *trans*-cinâmico é precursor de numerosos compostos fenilpropanóides que realizam várias funções essenciais na planta, como suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina, protetores contra estresses abióticos, como antioxidantes e compostos que absorve radiação UV (RITTER; SCHULZ, 2004).

O substrato específico que a FAL atua é a fenilalanina, no entanto é codificada por vários genes, podendo ter diversas combinações dependendo do estímulo indutor (DIXON; PAIVA, 1995), isto torna a FAL é uma das enzimas mais estudada por fisiologistas devido a sua importância no metabolismo secundário das plantas, o que a torna essencial no processo de indução de resistência (KUHN, 2007).

Sua principal função é catalisar a deaminação do aminoácido fenilalanina para a formação dos fenilpropanóides, ou seja, são moléculas precursoras dos compostos fenólicos que por sua vez é altamente fungitóxico (CHAMAN et al., 2003) estando o aumento da FAL associado ao aumento de fenilpropanóides, além dos hidroxinamatos oriundos da enzima alimentarem rotas metabólicas que geram diferentes compostos como, lignina, fitoalexinas, flavonóides e taninos (GOMES et al., 2008).

2.7.4 Compostos Fenólicos

Dentre as substâncias relacionadas à defesa química, destacam-se os fenóis (BOWLES, 1990; XAVIER-FILHO, 1993). Os compostos fenólicos são considerados um dos principais mecanismos da defesa constitutiva química pré-formada (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; LEITE, 1995), a nomenclatura compostos fenólicos (fenóis totais) agrupa substâncias que contenha em sua estrutura um anel aromático que possua ao menos uma hidroxila, incluem, portanto: fenóis simples e outros glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, a-pirones (cumarinas e isocumarinas), ligninas, flavonóides (flavononas, antocianinas e catequinas) e quinona. Podem estar localizados nos vacúolos celulares e por isso sua grande maioria é solúvel em água, sendo as vias do ácido shiquímico e cinâmico (fenilpropanóides) que constituem a sequência comum que gera os diferentes grupos de polifenóis e lignina (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Segundo Lo et al. (1996) são conhecidos por possuírem substâncias com alto potencial antimicrobiano e antivirótico. Entretanto, o efeito inibitório na germinação de esporos, e crescimento micelial é variado entre os diferentes grupos de fenóis (STANGARLIN et al., 2011) Dessa forma, os compostos fenólicos podem estar envolvidos nos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992; NICHOLSON, 1995).

2.7.5 Lignina

É originada em uma reação dependente de H_2O_2 e mediada pela enzima peroxidase, onde a mesma catalisa a polimerização de álcool hidroxicinâmico (ROS BARCELO', 1997).

Possui vital importância na defesa vegetal contra fitopatógenos, já que no momento da infecção onde ocorre a degeneração do citoplasma pela tentativa de penetração do agente patogênico, especialmente fungos, acarretam no aumento da biossíntese de lignina, no intuito de reforçar as paredes celulares ou mesmo a formação de lignina ao redor das estruturas do patógeno, como hifas, isolando-o do citoplasma e paralisando seu avanço (STANGARLIN et al., 2011).

Partindo deste pressuposto, sabe-se, portanto que a lignificação da célula vegetal torna as paredes mais resistentes à penetração e exige do invasor a expressão de enzimas específicas que degradam lignina para continuar o avanço da colonização. Além disso, a presença de compostos fenólicos, substrato para formação da lignina, inibe metabólitos do patógeno. Ocorre então a lignificação das hifas do patógeno, denominada de tubo lignífero, o que acaba isolando-o, já que ocorre o acúmulo de lignina nos tecidos circunvizinhos ao local da penetração do microrganismo do hospedeiro, dificultando o trânsito de água e nutrientes do hospedeiro para o fungo e o trânsito de toxinas e enzimas do patógeno para o hospedeiro (STANGARLIN et al., 2011; IURKIV et al., 2006).

3 MATERIAL E METÓDOS

3.1 LOCAL

Os ensaios foram realizados no laboratório de Fitopatologia e no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mario César Lopes, da Universidade Estadual Oeste do Paraná-Unioeste, situada no município de Marechal Cândido Rondon-Pr.

3.2 CULTIVAR IAPAR 81

Dentre as cultivares do grupo carioca destaca-se a Iapar 81, a mesma possui tegumento bege claro com listras marrom, com teor médio de proteína de 22%, apresentado crescimento indeterminado, tem ampla adaptação e porte ereto o que possibilita a colheita mecânica. O tempo médio até o florescimento é de 43 dias, sendo o ciclo total de 92 dias da emergência a colheita.

O feijão do tipo Iapar 81 foi desenvolvido pelo Instituto Agrônomo do Paraná, sendo recomendado a partir de junho de 1997, provém do cruzamento dos genótipos A248 / EMP117 /4/ BAT 93 /2/ Carioca sel. 99/ G.N.Nebraska 1#27 /3/Sel.Arona, a população segregante foi conduzida pelo método de descendência ate a geração F₇ onde foi isolada a linhagem LP93-56, que se adaptou a todas as regiões do Paraná (IAPAR, 2015).

3.3 ISOLADOS DE *Trichoderma*

21 isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 1), pertencentes à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste, obtidos a partir de isolamento em solos de mata nativa, de propriedades rurais com sistema de produção orgânico do oeste Paraná, do oeste do Rio Grande do Sul, e de solos de Santa Rosa de Monday- Py.

Tabela 1. Identificação da espécie dos isolados e local de origem dos isolados

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

3.4 OBTENÇÃO DO INÓCULO DE *Trichoderma*

A indução da esporulação se deu pela metodologia sugerida por Silva et al. (2011), para isto foram transferidos discos de colônias de *Trichoderma* crescidos em meio BDA (batata-dextrose-água) para erlenmeyers contendo 20 g arroz, (previamente autoclavados com 25 mL de água, por aproximadamente 20 minutos a 120 °C), foram mantidos em BOD 25 ± 2 °C na ausência de luz por sete dias.

3.5 PREPARAÇÃO DOS FILTRADOS DE ISOLADOS DE *Trichoderma* spp.

Os filtrados de isolados de *Trichoderma* foram obtidos através da cultura líquida sob agitação, no qual se utilizou para cada isolado: erlenmeyers contendo 200 mL de meio de cultura líquido BD (Batata-Dextrose), com dois discos de meio de cultura previamente colonizado por micélio e conídios de *Trichoderma* spp., na sequência os erlenmeyers foram acondicionados em agitador orbital, a 180 rpm em temperatura de 25 °C, em fotoperíodo de 12 horas. Após 15 dias de cultivo sob constante agitação, procedeu-se a filtragem em gaze e

papel filtro (qualitativo Whatman nº 1: 11 µm), com auxílio de bomba a vácuo. Os filtrados foram congelados -20 °C para posterior utilização.

3.6 OBTENÇÃO DO FITOPATÓGENO - *Colletotrichum lindemuthianum*

O patógeno utilizado como inóculo é o fungo *C. lindemuthianum* raça 91 (CI 1247-91, CNPAF- Embrapa), cedido pela EMBRAPA- CNPAF, Arroz e feijão, Santo Antônio de Goiás, GO. O *C. lindemuthianum*, foi cultivado em meio BDA e posteriormente repicado para tubo contendo o meio ágar-água, no qual foi mantido em temperatura ambiente por até 20 dias, metodologia descrita por Rava e Sartorato, (1994).

3.7 ENSAIOS *IN VITRO*

3.7.1 Germinação de Conídios de *Colletotrichum lindemuthianum* após Tratamento com Filtrados de Isolados de *Trichoderma* spp.

Para o teste de germinação de conídios do patógeno, seguiu-se o método proposto por Tratch e Bettiol (1997) sendo utilizadas lâminas de microscópio óptico no qual foi vertido sobre as mesmas meio ágar-água 1%, após a completa solidificação do meio, pipetou sobre elas 20 µL de suspensão de conídios do patógeno ajustada em câmara de Neubauer para $1,7 \times 10^6$ conídios mL⁻¹, em seguida 20 µL do filtrado dos isolados de *Trichoderma* spp. sendo utilizado para este experimento filtrados de 20 isolados do antagonista (TI1, TI2, TI3, TI4, TM1, TM2, TM3, TM4, TOD1, TOD2A, TOD3, TLB2, TLB3, TLB4, TLB6, TLB9, TLB12, TLB14, TLB15, TLB17 e controle).

As lâminas foram acondicionadas em placas de Petri contendo no fundo papel de filtro embebido com água (para manter a umidade), as mesmas foram incubadas em câmara de germinação do tipo BOD por um período de 24 horas, após foi adicionado o corante azul algodão de lactofenol para corar as estruturas fúngicas, e parar o crescimento do tubo germinativo. Sendo então na sequência realizada a contagem de até 100 conídios em microscópio óptico, no qual foi considerado conídio germinado aquele cujo tubo germinativo apresentou o dobro do seu tamanho. Realizou-se também a contagem dos não germinados, dada pela ausência do tubo germinativo ou sua presença em tamanho inferior ao dobro do comprimento dos conídios.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizados composto por 21 tratamentos (filtrados de 20 isolados de *Trichoderma* spp. e controle) e três repetições.

3.7.2 Pareamento de Cultura de Isolados *Trichoderma* spp. Confrontados com *Colletotrichum lindemuthianum*

O teste de pareamento cultura foi realizado com 21 isolados de *Trichoderma* spp. (antagonista) confrontados com o *C. lindemuthianum* (patógeno) e um controle (somente o patógeno), o experimento foi realizado em triplicata, onde cada placa de petri representava uma parcela experimental (total de 66 parcelas experimentais).

Para a realização do experimento foi transferido um disco de meio de cultura (BDA) de uma colônia jovem (de até sete dias) de *C. lindemuthianum* com aproximadamente 10 mm de diâmetro, o qual foi depositado em placa de petri com meio BDA estéril, a uma distância de 0,5 cm da borda. O tratamento controle contou com placas contendo o meio de cultivo e o patógeno.

Em seguida estas placas foram incubadas por 48 horas em câmara de BOD, a 26 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após esse procedimento foi repicado no lado oposto de onde estava o patógeno, um disco de meio BDA de 10 mm de diâmetro contendo micélio de *Trichoderma* spp. (ETHUR, 2006).

As placas foram então incubadas em câmara de crescimento (BOD) a uma temperatura de 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação dos resultados foi realizada aos sete dias da implantação do experimento (tempo que a colônia do patógeno levou para preencher toda a superfície do meio de cultura da placa controle), seguiu-se para tanto o método de atribuição de notas proposto por Rodrigues (2010), onde as notas podem variar de um a sete, sendo a nota 1 atribuída à característica de alta eficiência, pois o antagonista cresce por toda a placa de petri e sobre o disco do patógeno, e a nota 7 referente à característica de menos eficiência, pois neste caso é o patógeno que cresce por toda a placa de petri, notas estas que estão relacionadas na Tabela 2. Para auxiliar a avaliação e atribuição das notas utilizou-se um gabarito, que possuía o mesmo tamanho de uma placa de Petri, onde era mais fácil a visualização do crescimento das colônias (Figura 1).

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 3/4 da placa de Petri;
4	Antagonista cresce sobre 2/3 da placa de Petri;
5	Antagonista e patógeno crescem até a metade da placa de Petri;
6	Patógeno cresce sobre 2/3 da placa de Petri;
7	Patógeno cresce por toda a placa de Petri.

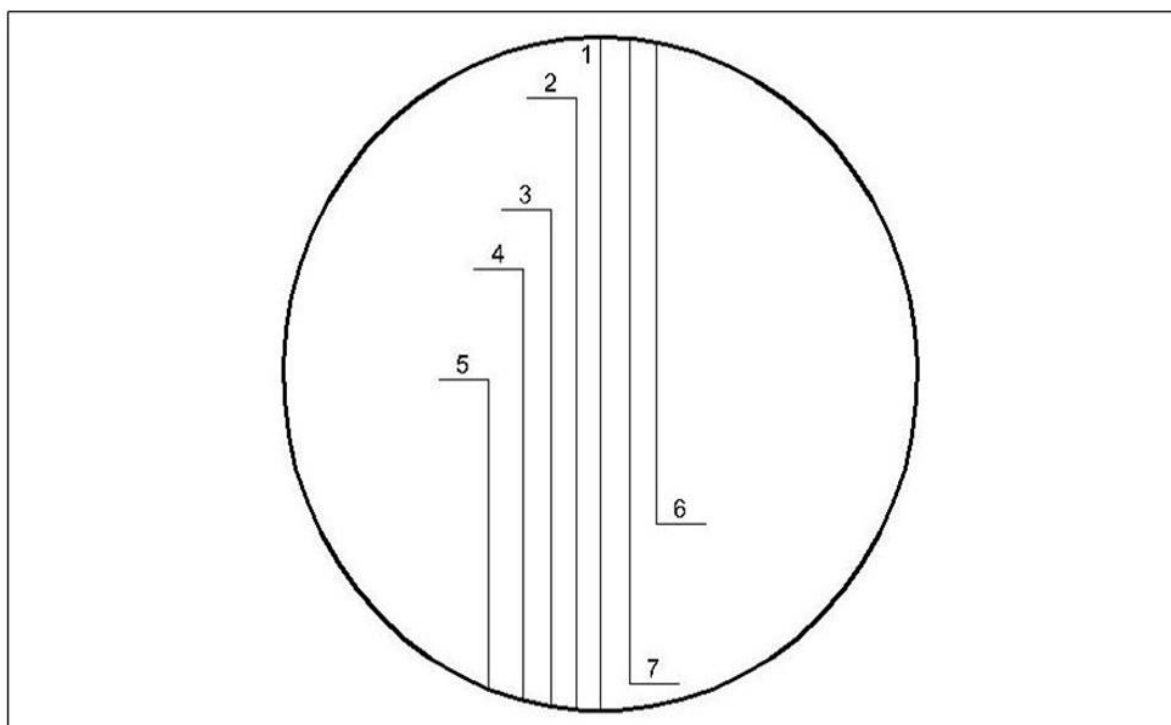


Figura 1. Gabarito com a escala utilizada para atribuição das notas no teste de confrontação direta de cultura. Fonte: Rodrigues (2010).

3.8 ENSAIOS *IN VIVO*

3.8.1 Indução de Resistência de Plantas de Feijoeiro

Para avaliar a indução de resistência em feijoeiro foram conduzidos dois experimentos simultaneamente em casa de vegetação: sendo um com o inóculo do antagonista aplicado no momento da semeadura e outro com aplicação foliar de filtrado dos mesmos isolados.

Para os dois experimentos as sementes de feijão da cultivar Iapar 81 (grupo carioca) foram semeadas em vasos de polipropileno com capacidade para 6 litros, contendo uma mistura de: solo, areia e matéria orgânica na respectiva proporção de 3:2:1, na sequência foi autoclavada por 1 hora a 120 °C.

Nos vasos foram semeadas oito sementes de feijão, sendo realizado o desbaste, restando em cada vaso seis plantas com desenvolvimento uniforme.

Foram empregados 23 tratamentos, sendo 21 isolados de *Trichoderma* spp. (TI1, TI2, TI3, TI4, TM1, TM2, TM3, TM4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB6, TLB9, TLB12, TLB14, TLB15, TLB17, TOD1, TOD2A, TOD2B e TOD3) um controle positivo (planta com a presença do patógeno e ausência do antagonista) e um controle negativo (planta com ausência do patógeno e ausência do antagonista). Sendo utilizado para cada experimento, maneiras distintas de aplicação dos tratamentos. Primeiro experimento: Plantas de feijão inoculadas com os isolados de *Trichoderma* spp. no momento da semeadura;

Segundo experimento: Plantas de feijão inoculadas via pulverização foliar dos filtrados de isolados de *Trichoderma* spp.

Para os tratamentos realizados no momento da semeadura, inoculou-se junto às sementes o antagonista por meio de grãos de arroz previamente colonizados (PEDRO et al. 2012). Após 15 dias de emergência foliar do feijoeiro, foram realizadas em tempos diferentes duas coletas:

- 1º coleta, (**Tempo 1**) apenas com a presença do antagonista e sem inoculação do patógeno;
- 2º coleta, (**Tempo 2**) realizada no terceiro dia após a inoculação do patógeno em plantas previamente tratadas na semeadura.

No outro experimento, aos 15 dias de emergência foliar das plântulas de feijoeiro, procedeu-se a aplicação dos tratamentos via pulverização foliar dos filtrados de isolados de *Trichoderma* spp., a mesma se deu com auxílio de um borrifador manual de pressão acumulada. Foi adicionada em 10 mL de filtrado, uma gota de solução emulsificante/aderente de Tween 80 (por vaso), visando reduzir perdas nos tratamentos, três dias após a aplicação dos filtrados foi realizada a inoculação de *C. lindemuthianum*.

As coletas do material vegetal ocorreram na seguinte ordem:

- 1º coleta, (**Tempo 0**) realizada aos 15 dias de emergência foliar sem a aplicação dos filtrados de *Trichoderma* spp. (plantas sem tratamento);
- 2º coleta, (**Tempo 1**) realizada no terceiro dia (com 18 dias de emergência foliar) após a aplicação dos filtrados de *Trichoderma* spp., (plantas já tratadas com filtrados);

-3º coleta, **(Tempo 2)** realizada no terceiro dia (com 21 dias de emergência foliar) após a inoculação do patógeno, (plantas tratadas com o antagonista e inoculadas com o *C. lindemuthianum*).

A suspensão do patógeno *C. lindemuthianum* foi ajustada para $1,8 \times 10^6$ esporos mL⁻¹, sendo inoculado 10 mL por vaso, e no controle negativo foi realizada a aspersão de água destilada. Após as coletas do material vegetal tratado, (tanto no momento da semeadura, quanto em tratamentos via pulverização foliar), os mesmos foram acondicionados em envelopes de papel alumínio, devidamente identificados, e transportados dentro de caixas de isopor com gelo até o laboratório de fitopatologia, onde ficaram armazenados em freezer a -20 °C para as determinações bioquímicas.

Os dois experimentos obedeceram ao delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), sendo o primeiro em esquema fatorial 23x2 (23 tratamentos e 2 tempos de coleta), distribuídos em 4 blocos totalizando 184 unidades experimentais. O segundo experimento em esquema fatorial 23x3 (23 tratamentos e 3 tempos de coleta) distribuídos em 4 blocos, totalizando 276 unidades experimentais.

3.8.2 Proteínas Totais e Enzimas de Defesa Vegetal

3.8.2.1 Extratos Proteicos para Determinação da Atividade Enzimática e Teor de Proteínas

Para obtenção dos extratos proteicos seguiu-se a metodologia proposta por Lusso e Pascholati (1999), na qual 0,5 g de material vegetal (folhas) foram macerados mecanicamente em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01mM (pH 6,0), com auxílio de um graal e um pistilo, sendo acrescentado a esta mistura 0,04 g de polivinil pirrolidona. Após foi centrifugada a 20.000g durante 25 min a 4°C, o sobrenadante foi considerado como extrato enzimático, o qual foi congelado a -20 °C, para posterior determinação do teor de proteínas solúveis totais e da atividade das enzimas, polifenoloxidase (PFO), peroxidase (POX) e fenilalanina amônia-liase (FAL).

3.8.2.2 Teor de Proteínas Solúveis Totais

Para determinação do teor de proteínas totais foi utilizada a metodologia de Bradford (1976), onde 0,2 mL do reagente (que se usou para 250 mL: 125 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 62,5 mL de etanol 95%, 125 mL de ácido fosfórico 85% e água destilada q.s.p. 250 mL) foi adicionado a 0,8 mL do extrato proteico sob agitação constante (vortex), e após um período de 5 minutos de incubação em temperatura ambiente se realizou a leitura em espectrofotômetro a 595 nm de absorbância. Todas as amostras foram realizadas em triplicata, e no final foram obtidas médias que foram impostas a curva padrão (albumina de soro bovino (ASB), variando de 0 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados dos teores de proteínas foram expressos em $\mu\text{g proteína mL}^{-1}$.

3.8.2.3 Atividade de Polifenoloxidase (PFO)

Para se determinar a atividade de PFO, avaliou-se a oxidação do catecol convertido em quinonas, o que se mensura através da atividade enzimática da polifenoloxidase, por meio de método espectrofotométrico direto.

Utilizou-se para tanto 50 mL do tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,8), onde se adicionou a ele 0,110 g de catecol (0,02 M). Para a total diluição do catecol a mistura permaneceu por 30 minutos em banho-maria a 30 °C, após este período realizou-se a leitura (com as amostras ainda no banho-maria) em espectrofotômetro a 420 nm. A mistura contida na cubeta era a seguinte, 900 μL do tampão + 100 μL da amostra (extrato proteico obtido como descrito no item anterior) tal metodologia foi proposta por Duangmal e Apenten (1999). Sendo a atividade determinada pela variação ocorrida entre os valores obtidos a cada 15 segundos por período de 1 minuto. Resultados expressos em U.E. unidade de enzima/ $\text{min}^{-1} \text{ g}^{-1}$ massa fresca sendo uma unidade de enzima (UE) equivalente a 0,001 de absorbância.

3.8.2.4 Atividade de Peroxidase (POX)

Para a determinação da atividade de POX seguiu-se a metodologia proposta por Hammerschimdt et al. (1982), na qual todo o procedimento se deu a uma temperatura de

30°C por meio do método espectrofotométrico direto, onde 1,4 mL de uma solução a base de guaiacol 2%, tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,0 e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi utilizada como substrato para a enzima. A esta solução foi adicionada 100 µL de extrato proteico (Conforme item 3.8.2.1). Mediu-se então através de espectrofotômetro a 470 nm, (com medidas de densidade ótica a cada 15 segundos por um período limite de 2 minutos) a conversão do guaiacol em tetraguaiacol. Expressaram-se os resultados pela atividade na variação entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear (U.E. unidade de enzima/min⁻¹ g⁻¹ massa fresca, sendo uma unidade de enzima (UE) equivalente a 0,001 de absorvância).

3.8.2.5 Atividade de Fenilalanina Amônia-liase (FAL)

Seguindo o método que foi proposto por Umesha (2006), a atividade de FAL foi quantificada pela colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina. Onde se utilizou 50 µL do extrato proteico, que foram acrescidos de 450 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 µL de uma solução de L-fenilalanina 0,05M. O tampão usado na reação, foi incubado a 40 °C por 2 horas, no final do período, adicionou-se 60 µL de HCl 5M a fim de parar a reação e garantir uniformidade da leitura. Sendo que para cada uma das amostras foi também preparado um controle (50 µL do extrato proteico e 950 µL de tampão Tris-HCl 0,025M pH 8,8), realizada a leitura da amostra e a leitura do controle, em aparelho de espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de FAL foi determinada entre a diferença da absorvância da amostra (50 µL de extrato proteico, 450 tampão Tris-HCl 0,02 M e 500 µL de L-fenilalanina) e da solução controle (50 µL de extrato proteico e 950 µL de tampão Tris-HCl 0,025 M), sendo estes resultados aplicados em curva padrão para ácido *trans*-cinâmico ($y = 0,0135x + 0,0255$). Resultados apresentados em expressa em µg ácido *trans*cinâmico h⁻¹ g⁻¹ de massa fresca.

3.9 OBTENÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS DE TECIDO FOLIAR PARA A DETERMINAÇÃO DE TEORES DE FENÓIS TOTAIS E LIGNINA

Após a realização das coletas, 0,5 g do material vegetal (folhas) tratado, foi acondicionado em envelopes de papel alumínio devidamente identificados, os quais foram armazenados em freezer (-20 °C) e posteriormente liofilizadas a -50 °C, triturados com

auxílio de graal e pistilo, tornando-se um pó seco, sendo armazenado em tubos de microcentrífuga, para posterior análise de compostos fenólicos e lignina.

3.9.1 Teores de Compostos Fenólicos e de Lignina

3.9.2 Compostos Fenólicos

Do material liofilizado, 30 mg foram transferidos para tubos de microcentrífuga com capacidade para 2 mL, sendo vertido sobre ele 1,5 mL de metanol 80%, após 15 horas de constante agitação em agitador rotativo com ausência de luz, obteve-se o extrato metanólico que continha os compostos fenólicos. Este extrato foi então centrifugado a 12.000g por 5 minutos, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga e o pelet (resíduo) proveniente da centrifugação foi seco e armazenado para posterior determinação de lignina.

Os compostos fenólicos foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Rodrigues et al. (2005). Para isso, misturou-se 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25N em 150 µL do extrato metanólico, esta solução permaneceu por 5 minutos em temperatura ambiente e na sequência pipetou-se 150 µL de Na₂CO₃ 1M, após completa homogeneização e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, foi acrescentado 1 mL de H₂O destilada e deionizada e mantido a temperatura ambiente por uma hora. Após este período foi realizada a leitura da reação em aparelho de espectrofotômetro a 725 nm. O resultado desta avaliação foi obtido a partir do cálculo dos valores de acordo com a curva de catecol e os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente mg de catecol g⁻¹ de tecido seco.

3.9.3 Lignina

Ao pelet residual proveniente da determinação de compostos fenólicos totais (item 3.9.2) foi adicionado 1,5 mL da água destilada, depois de realizada homogeneização, o conteúdo foi centrifugado 12.000g por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o resíduo foi seco a 65°C em estufa por cerca de 15 horas. Este resíduo seco foi utilizado para determinação da lignina (BARBER e RIDE, 1988). Para isso 1,5 mL de uma solução a base de ácido tioglicólico e HCl 2M (proporção de 1:10) foi adicionada sobre o resíduo. Após a

completa incorporação da solução ao resíduo, os tubos foram mantidos em banho-maria a 100 °C por 4 horas e na sequência colocados em gelo para resfriar rapidamente (permaneceu por 10 minutos). Em seguida a mistura foi centrifugada a 12.000g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao pelet (resíduo) que ficou no fundo do micro tubo foram acrescentados 1,5 mL de água destilada e deionizada e novamente centrifugado a 10.000g por 10 minutos. Sendo novamente o sobrenadante descartado e o pelet (resíduo) ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5M. Após, esta mistura foi agitada com auxílio de agitador rotativo por 15 horas, foi realizada outra centrifugação a 10.000g por 10 min e o sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga, sendo adicionado 200 µL de HCl concentrado ao sobrenadante e mantido em câmara fria (4 °C) por 4 horas para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. Realizou-se então outra centrifugação a 10.000g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e ao resíduo proveniente adicionado 2 mL de NaOH 0,5M. A leitura se deu em aparelho de espectrofotômetro a 280 nm, e os valores calculados de acordo com a curva de lignina e os resultados foram expressos em mg de lignina por grama de tecido seco (RODRIGUES et al., 2005).

3.10 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA ANTRACNOSE EM FEIJOEIRO TRATADO

Realizou-se a avaliação da severidade da antracnose 15 dias após a inoculação de *C. lindemuthianum*, através da área foliar que apresentava lesões causadas pela doença, se fez uso da escala diagramática (Figura 2), proposta por Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999).

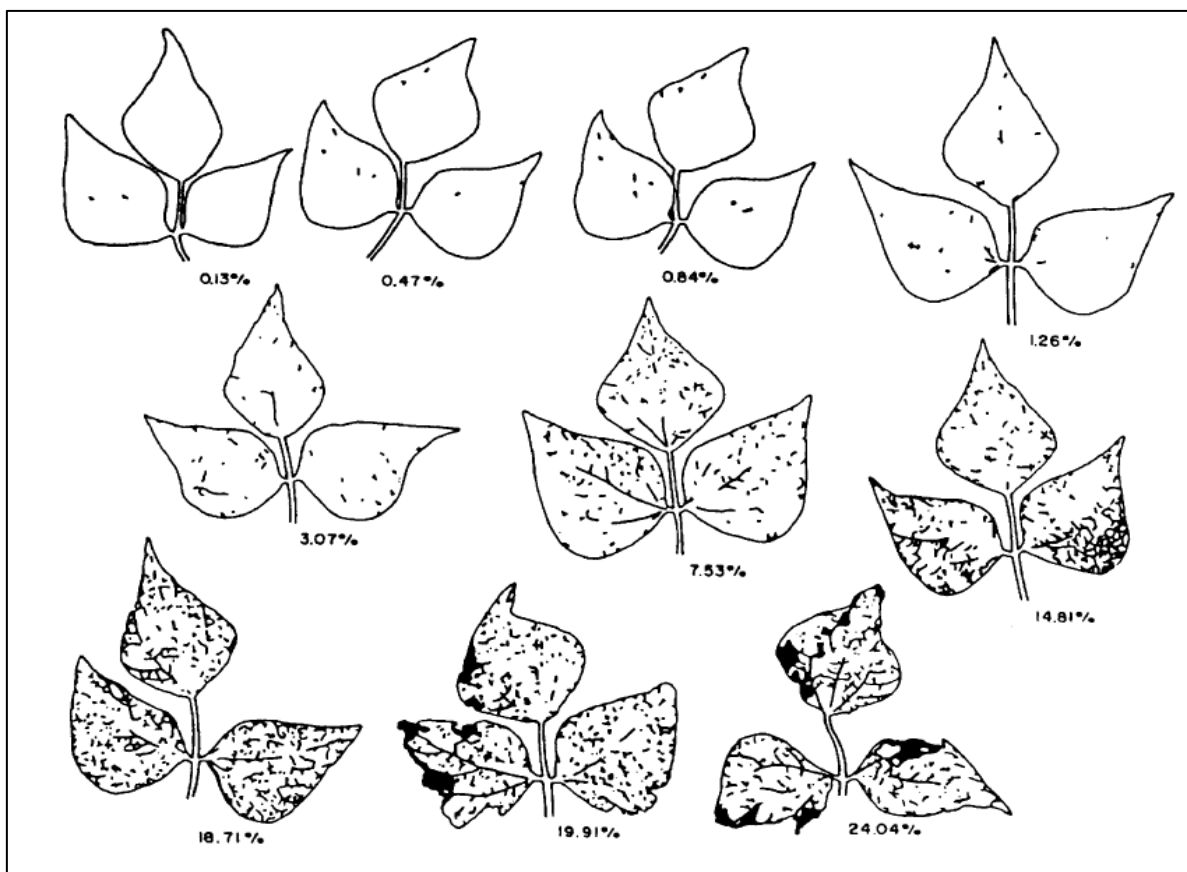


Figura 2. Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA E TABULAÇÃO DE DADOS

Após tabulação dos resultados, submeteram-se os mesmos à análise de variância (ANAVA), e as médias comparadas pelos testes de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade com auxílio do programa estatístico Sivar (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIOS *IN VITRO*

4.1.2 Germinação de Conídios de *C. lindemuthianum* Tratados com Filtrados de Isolados de *Trichoderma* spp.

O teste de média separou os resultados da ANAVA em dois grupos, o primeiro grupo (B) formado pelos isolados TLB14 (*T. koningiopsis*), TM2 (*T. virens*), TLB17 (*T.*

koningiopsis), TOD2A (*T. longibrachiatum*), TLB3 (*T. harzianum*), TLB15 (*T. virens*) e TLB4 (*T. harzianum*) que obtiveram os maiores percentuais de germinação, variando de 70,31% a 93,64% não diferindo do controle (água destilada) e mostrando uma baixa ação antagônica frente ao agente causal da antracnose.

O segundo grupo (A) composto pelos isolados TLB2 (*T. harzianum*), TLB6 (*T. asperellum*), TLB12 (*T. harzianum*), TI2 (*T. harzianum*), TLB9 (*T. virens*), TI4 (*T. harzianum*), TM3 (*T. virens*), TOD3 (*T. harzianum*), TI3 (*T. virens*), TM4 (*T. virens*), TM1 (*T. virens*), TI1 (*T. virens*) e TOD1 (*T. harzianum*) proporcionam redução do percentual de germinação diferindo estatisticamente do controle (Tabela 3). Os isolados que apresentaram resultados promissores são TM1, TI1 e TOD1 que mostraram respectivamente uma redução na germinação de, 33,34%, 38,34% e 61,04% em relação ao controle.

Kexiang et al. (2002), ao testarem isolados de *T. harzianum* e *T. atroviride*, chegaram à conclusão que os compostos voláteis e não-voláteis produzidos por eles possuíam ação antibiótica ao patógeno *Botryosphaeria berengeriana* f.sp. *piricola* (causador da podridão anelar na maçã), que suprimiu o crescimento micelial do mesmo. Estes autores verificaram ainda que filtrados de cultura de *T. harzianum* e *T. atroviride*, reprimiram a germinação de conídios do patógeno.

Aneja et al. (2005), ao trabalhar com a cultura líquida de um isolado de *T. harzianum*, puderam observar que o mesmo inibia a germinação de esporos e crescimento micelial de dois patógenos do cacau, *Crinipellis perniciosus* Stahel e *Moniliophthora roreri*, apresentando alta atividade antagônica resultando em redução de 75% da germinação dos esporos.

Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, Gomes et al. (2001) não obtiveram resultados satisfatórios, ao testar fungos do gênero *Trichoderma* spp. sobre a germinação de esporos de *Cylindrocladium spathulatum*, causador da pinta-preta em erva-mate, concluindo que apesar de um comprovado hiperparasitismo do *Trichoderma* spp., o mesmo não inibiu a germinação do patógeno.

Tabela 3. Percentual de conídios germinados de *Colletotrichum lindemuthianum* após 24 horas da aplicação dos filtrados de *Trichoderma* spp.

Isolados	Número de conídios germinados (%)	Redução da germinação (%)
TOD1	30,00 a	61,04
TI1	47,48 a	38,33
TM1	51,33 a	33,33
TM4	52,12 a	32,31
TI3	56,00 a	27,27
TOD3	56,06 a	27,19
TM3	58,33 a	24,24
TI4	60,25 a	21,75
TLB9	60,88 a	20,93
TI2	61,00 a	20,77
TLB12	61,87 a	19,64
TLB6	63,70 a	17,27
TLB2	65,87 a	14,45
TLB4	70,31 b	8,68
TLB15	72,22 b	6,20
TLB3	74,14 b	3,71
TOD2A	75,75 b	1,62
Controle	77,00 b	---
TLB17	78,36 b	-2,41
TM2	79,86 b	-3,71
TLB14	93,64 b	-21,61
(CV%)	22,62	

*Médias agrupadas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

4.1.3 Confronto Direto de Cultura de Isolados de *Trichoderma* spp. Frente à *C. lindemuthianum*

Ao realizar o teste de pareamento de cultura dos isolados de *Trichoderma* spp. frente ao patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, pela metodologia proposta por Rodrigues (2010), percebe-se que os isolados inibiram o crescimento do agente patogênico, em razão da alta agressividade apresentada, em relação ao fitopatógeno, aonde a nota: 1 indica alta agressividade e nota 7 indica a ausência de agressividade. Sendo o isolado TM2 o qual apresentou nota 4, único isolado que mostrou moderada agressividade em relação ao *C. lindemuthianum*, e o controle (água) com baixa agressividade apresentando nota 6,3.

Com base na estatística, os isolados quanto a sua eficiência, foram separados em três grupos distintos, onde o controle (água) permanece no grupo “c”, o qual apresentou ausência de agressividade resultando em nota de 6,3; o isolado TM2 (*T. virens*), permaneceu no grupo “b”, com nota 4 e moderada agressividade em relação ao patógeno; já os isolados TI1, TI3, TM1, TM3, TM4, TLB9 e TLB15 (*T. virens*), TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12, TOD1 e TOD3 (*T. harzianum*), TLB6 (*T. asperellum*), TLB14 e TLB17 (*T. koningiopsis*), TOD2A e TOD2B (*T. longibrachiatum*), permaneceram no grupo “a” com notas variando de 1 a 2,3 indicando extrema agressividade e acelerado crescimento micelial (Tabela 4). Com exceção do TM2 (*T. virens*), todos os isolados testados apresentaram resultados satisfatórios para o teste de pareamento de cultura, já que os mesmos inibiram o crescimento do patógeno (*C. lindemuthianum*).

Este resultado em particular corrobora com o encontrado por Broetto (2013), que ao confrontar este isolado (TM2), com o patógeno *Macrophomina phaseolina*, considerou que o antagonista que obteve nota de 3,6 possuía pouca eficiência, e baixa supressão ao patógeno. Os resultados do presente estudo, corroboram com alguns dos encontrados por Dilley (2014), onde os isolados: TI2, TI4, TLB3, TLB12 (*T. harzianum*), TLB6 (*T. asperellum*) e TLB14 (*T. koningiopsis*), apresentaram um crescimento micelial extremamente acelerado, sendo atribuída a nota 1, o qual impediu o crescimento do patógeno *C. lindemuthianum*. Os mesmos autores como no atual trabalho, também encontraram para os isolados TI1 (*T. virens*) e TLB2 (*T. harzianum*) notas de 2 a 3.

Broetto (2013), ao realizar teste de pareamento com isolados de *Trichoderma* spp., confrontados com o patógeno *Macrophomina phaseolina*, notou que os isolados do agente antagonico (com algumas exceções) apresentaram crescimento micelial acelerado, inibindo o desenvolvimento do patógeno com apenas cinco dias de incubação. A mesma autora em seu estudo diverge em alguns pontos deste estudo, ao qual relata que os isolados: TI2, TI4, TLB12 (*T. harzianum*), TI3 (*T. virens*) e TLB14 (*T. koningiopsis*) não apresentaram qualquer inibição no crescimento de *M. phaseolina*.

Maciel et al., (2012), ao realizarem testes *in vitro* de confronto direto de *Trichoderma* spp. e produtos comerciais à base do mesmo, frente à *Cylindrocladium candelabrum* (causador da mancha-foliar em *Eucalyptus saligna*), observaram que os tratamentos foram eficientes no biocontrole do patógeno. Apresentando relação antagonista de *Trichoderma* spp. sobre o patógeno, que recebeu notas que variaram de 1 a 2,25, correspondendo, respectivamente, à ocupação completa da placa pelo antagonista e antagonista ocupando no mínimo 2/3 da superfície do meio.

Maciel et al. (2014), visando avaliar a ação antagônica de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* no controle de *Fusarium sambucinum*, responsável por danos em plântulas de *Pinus elliottii*, ao confrontar estas culturas (antagonistas x patógeno) in vitro, pode concluir que tanto *Trichoderma* spp. quanto *Bacillus subtilis* foram eficientes no controle de *F. sambucinum*.

Já Louzada et al. (2009), ao conduzir testes de pareamento de cultura de uma coleção de 230 isolados de *Trichoderma* spp. frente aos patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, concluíram que apenas 10% dos isolados de *Trichoderma* spp. possuem efeito antagônico direto sobre os dois patógenos, avaliações por meio de microscopia de sete isolados selecionados mostraram que nem todos possuem hiperparasitismo, esta pesquisa, sugere outros mecanismos de ataque a fitopatógenos, como antibiose ou competição. Estes resultados corroboram com os encontrados no presente trabalho, ao qual se pode observar que o isolado TM2 (*T. virens*) apresentou pouca severidade em relação ao *C. lindemuthianum*, sugerindo que o mesmo possui outro mecanismo de ação antagônica. Almeida (2009) ao estudar o potencial de inibição do *Trichoderma viride* sobre *Colletotrichum* spp., *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em cultura pareada, concluiu que o mesmo mostrou um elevado potencial antagônico e de biocontrole, resultados que se assemelham aos aqui encontrados.

Santos (2008), ao testar isolados de *Trichoderma* spp. em cultura pareada confrontando-os com *Fusarium osysporum*, constatou que todos os isolados reduziram o crescimento do patógeno, resultados estes que indicam alto potencial inibitório de espécies de *Trichoderma* spp. Vale ressaltar, que mesmo os testes in vitro de pareamento ser uma ferramenta que nos auxilia a identificação de microrganismos com potenciais para biocontrole, outros estudos também se faz necessários, já que o antagonista além de fazer uso de outros mecanismos de ataque conhecidos ou não a patógenos, também possui comportamento distinto em relação ao meio e ao hospedeiro em que se encontra.

Tabela 4. Pareamento de cultura de isolados de *Trichoderma* spp. frente à *C. lindemuthianum*

Isolados	Espécies	Notas ¹	Grau de Eficiência ¹
TI1	<i>T. virens</i>	2,33	Eficiente
TI2	<i>T. harzianum</i>	1,00	Alta Eficiência
TI3	<i>T. virens</i>	1,33	Alta Eficiência
TI4	<i>T. harzianum</i>	1,00	Alta Eficiência
TM1	<i>T. virens</i>	1,00	Alta Eficiência
TM2	<i>T. virens</i>	4,00	Ineficiente
TM3	<i>T. virens</i>	1,00	Alta Eficiência
TM4	<i>T. virens</i>	1,33	Alta Eficiência
TLB2	<i>T. harzianum</i>	2,33	Eficiente
TLB3	<i>T. harzianum</i>	1,00	Alta Eficiência
TLB4	<i>T. harzianum</i>	1,66	Eficiente
TLB6	<i>T. asperellum</i>	1,00	Alta Eficiência
TLB9	<i>T. virens</i>	1,66	Eficiente
TLB12	<i>T. harzianum</i>	1,00	Alta Eficiência
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	1,00	Alta Eficiência
TLB15	<i>T. virens</i>	1,33	Alta Eficiência
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	1,33	Alta Eficiência
TOD1	<i>T. harzianum</i>	1,33	Alta Eficiência
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	1,66	Eficiente
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	1,33	Alta Eficiência
TOD3	<i>T. harzianum</i>	1,66	Eficiente
C ²	Controle	6,33	- - -
(CV%)	41,92		

1: Valores até 1,5 indicam alta eficiência; valores entre 1,5 e 2,5 indicam que são eficientes e valores acima de 2,5 considera-se ineficiente (ETHUR, 2006); Controle (apenas a presença do patógeno).

4.2 ENSAIOS *IN VIVO*

4.2.1 Atividade de Polifenoloxidase

No experimento *in vivo* cujos tratamentos foram a aplicação dos isolados de *Trichoderma* na semeadura a primeira coleta de tecido vegetal (tempo 1) foi realizada 15 dias após a emergência foliar, o feijoeiro tratado não apresentou diferença significativa para a atividade de polifenoloxidase. Já no tempo 2 (coleta realizada 72 horas após a inoculação do patógeno) a atividade da enzima polifenoloxidase (PFO) aumentou significativamente para os tratamentos com os isolados TLB12 (*T. harzianum*), TOD1 (*T. harzianum*) e TOD2B (*T. longibrachiatum*), quando comparado aos tratamentos controles, sendo evidente que estes isolados em especial alavancaram a produção enzimática da PFO. Mesmo

notando-se que todos os outros isolados testados promoveram o acréscimo na atividade da polifenoloxidase, apresentando as plantas tratadas com o isolado TOD2B um estado de pré-condicionamento (*priming*), já que o tratamento em questão deixou o feijoeiro em estado de alerta, e no momento em que o patógeno chegou à resposta de defesa foi acionada mais rapidamente (Tabela 5).

Estes resultados não corroboram com os encontrados por Dildey (2014), já que os mesmos ao estudarem a interação *Trichoderma*-feijoeiro, não verificaram resultados satisfatórios ao avaliar a atividade da enzima polifenoloxidase após o tratamento via semente, não sendo encontrada por eles diferença significativa.

Com exceção de todos os outros isolados testados: TI3, TLB9, TLB15 e TLB17 que reduziram a atividade da enzima, vale ressaltar que dentre estes apenas o TI3 (*T. virens*) não é endofítico (DILDEY, 2014), levanta-se então a hipótese que estes isolados suprimiram a atividade de polifenoloxidase já que a mesma é fungitóxica e acabaria por prejudicar a associação ecológica destes isolados com as raízes do feijoeiro. Nota-se, portanto, comportamento diferenciado destes isolados em relação ao patógeno e ao feijoeiro. De acordo com Piño e Palazón (1996), já 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. Já Dildey (2014) afirma que essa supressão enzimática verificada pode ser um mecanismo de proteção do *Trichoderma* para não ser afetado por compostos tóxicos da oxidação de fenóis.

Tabela 5. Atividade de polifenoloxidase em tecido foliar de feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de *Trichoderma* spp.

Atividade de polifenoloxidase (Unidade de enzima ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹ tecido fresco)			
Isolados	Espécies	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	38,03 a	68,03 b
TI2	<i>T. harzianum</i>	65,20 a	84,35 b
TI3	<i>T. virens</i>	10,70 a	31,48 b
TI4	<i>T. harzianum</i>	51,65 a	55,43 b
TM1	<i>T. virens</i>	39,03 a	63,65 b
TM2	<i>T. virens</i>	39,53 a	82,68 b
TM3	<i>T. virens</i>	10,25 a	31,08 b
TM4	<i>T. virens</i>	18,50 a	48,58 b
TLB2	<i>T. harzianum</i>	45,13 a	120,70 b
TLB3	<i>T. harzianum</i>	42,48 a	59,60 b
TLB4	<i>T. harzianum</i>	76,28 a	55,03 b
TLB6	<i>T. asperellum</i>	19,40 a	57,00 b
TLB9	<i>T. virens</i>	45,15 a	38,15 b
TLB12	<i>T. harzianum</i>	45,13 a	223,30 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	13,55 a	51,38 b
TLB15	<i>T. virens</i>	196,60 a	64,70 b
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	83,48 a	65,30 b
TOD1	<i>T. harzianum</i>	75,15 a	249,83 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	82,83 a	94,33 b
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	57,63 a	254,10 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	33,73 a	72,60 b
C.P ⁴	Controle Positivo	51,28 a	143,60 b
C.N ⁵	Controle Negativo	50,08 a	99,45 b
(CV%)	150,33		

2: coleta realizada após 15 dias após a emergência foliar das plantas tratadas na semeadura;

3: coleta realizada 72 horas após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

*Médias seguidas pela mesma minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância respectivamente.

Já no segundo experimento *in vivo*, de plantas tratadas via aspersão foliar com filtrados de *Trichoderma* spp., não houve diferença entre os tratamentos para o tempo 0 e para o tempo 1. No tempo 2 observa-se que os seguintes isolados: TI3, TM1, TM2, TM4 (*T. virens*), TLB3, TLB4, TLB12 (*T. harzianum*), TLB15 (*T. virens*) e TOD2B (*T. longibrachiatum*) (Tabela6) apresentaram médias superiores aos demais, porém isso não evidencia diferença estatística já que os mesmos não se distinguiram do controle positivo.

Embora não tenha ocorrido diferença estatística, alguns isolados chamam a atenção por reduzirem a atividade enzimática da polifenoloxidase, reforçando a hipótese de que devido, os mesmos possuem capacidade de endofitismo e sendo eles assim como o

patógeno um fungo, a alta síntese desta enzima poderia acarretar em ameaça inerente à sobrevivência do mesmo dentro da planta..

Corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho Dildey (2014), também notou uma tendência à supressão da enzima polifenoloxidase ocasionada por alguns isolados. Campos et al. (2004), dentre seus resultados notaram nítida correlação entre as atividades de POX e PFO, e teores de compostos fenólicos com a resistência do feijoeiro-comum a antracnose. Ao contrário do presente estudo, Ribas (2014) ao trabalhar com isolados de *Trichoderma* spp. em feijoeiro-comum pode concluir que os mesmos tenderam a aumentar a atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, com destaque para as plantas tratadas com isolados de *Trichoderma harzianum* ICB05.

Tabela 6. Atividade de polifenoloxidase em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrado de isolados de *Trichoderma* spp.

Atividade de polifenoloxidase (Unidade de enzima ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹ tecido fresco)				
Isolados	Espécies	Tempo (0) ¹	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	21,15 a	20,75 a	45,05 b
TI2	<i>T. harzianum</i>	38,30 a	19,58 a	30,15 b
TI3	<i>T. virens</i>	33,70 a	89,15 a	68,30 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	20,10 a	12,18 a	39,63 b
TM1	<i>T. virens</i>	47,35 a	75,15 a	93,63 a
TM2	<i>T. virens</i>	76,10 a	59,80 a	62,68 a
TM3	<i>T. virens</i>	20,08 a	39,05 a	49,43 b
TM4	<i>T. virens</i>	29,03 a	117,38 a	137,83 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	33,05 a	74,13 a	11,70 b
TLB3	<i>T. harzianum</i>	41,05 a	26,13 a	59,60 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	29,78 a	29,43 a	103,60 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	47,73 a	55,58 a	21,33 b
TLB9	<i>T. virens</i>	75,45 a	11,13 a	32,10 b
TLB12	<i>T. harzianum</i>	39,98 a	35,03 a	74,95 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	20,28 a	11,50 a	12,53 b
TLB15	<i>T. virens</i>	47,20 a	14,38 a	93,00 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	56,85 a	34,05 a	9,25 b
TOD1	<i>T. harzianum</i>	28,30 a	20,23 a	32,48 b
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	23,80 a	21,48 a	16,48 b
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	67,38 a	55,38 a	78,58 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	29,58 a	40,03 a	50,83 b
C.P ⁴	Controle Positivo	15,30 a	51,30 a	67,48 a
C.N ⁵	Controle Negativo	65,52 a	47,28 a	26,88 b
(CV%)	52,80			

1: coleta realizada sem aplicação dos filtrados;

2: coleta realizada no terceiro dia após aplicação dos filtrados;

3: coleta realizada no terceiro dia após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

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

4.2.2 Atividade de Peroxidase (POX)

No experimento *in vivo* cujos tratamentos foram à aplicação dos isolados de *Trichoderma* na semeadura (Tabela 7), a coleta do tempo 1 não apresentou resultado significativo de atividade de POX, para o tempo 2 observa-se que os isolados TI2, TI3, TI4, TM1, TM4, TLB2, TLB3, TLB9, TLB14, TD2A e TOD2B apresentaram médias inferiores a do controle positivo, o que evidencia supressão da atividade enzimática da peroxidase ocasionadas pela ação dos isolados de *Trichoderma*. Corroborando com estes resultados,

Dilley et al. (2013), não observaram atividade de indução das enzimas POX e PFO em feijoeiro contra o patógeno *Macrophomina phaseolina*, na inoculação via semente de diferentes isolados de *T. harzianum*.

Dilley (2014) ao estudar a interação dos organismos *Trichoderma*-feijoeiro pode verificar que os isolados TM1, TM4 (*T. virens*), TOD2A e TOD2B (*T. longibrachiatum*) acarretaram em supressão enzimática da POX, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Sugere-se que tais resultados se deram por uma estratégia de sobrevivência ou defesa por parte do antagonista, devido os mesmos impedirem o acionamento do arsenal enzimático da POX.

Tabela 7. Atividade de peroxidase em tecido foliar de feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de *Trichoderma* spp.

Atividade de peroxidase (Unidade de enzima ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹ tecido fresco)			
Isolados	Espécies	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	208,46 a	323,50 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	96,46 a	259,00 b
TI3	<i>T. virens</i>	179,62 a	204,57 b
TI4	<i>T. harzianum</i>	599,26 a	221,00 b
TM1	<i>T. virens</i>	349,12 a	207,35 b
TM2	<i>T. virens</i>	204,05 a	462,70 a
TM3	<i>T. virens</i>	240,50 a	320,80 a
TM4	<i>T. virens</i>	289,93 a	174,47 b
TLB2	<i>T. harzianum</i>	198,30 a	256,47 b
TLB3	<i>T. harzianum</i>	208,86 a	275,50 b
TLB4	<i>T. harzianum</i>	337,13 a	401,76 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	215,46 a	330,47 a
TLB9	<i>T. virens</i>	151,82 a	247,12 b
TLB12	<i>T. harzianum</i>	287,93 a	535,65 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	208,76 a	190,46 b
TLB15	<i>T. virens</i>	143,13 a	345,10 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	201,66 a	410,03 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	211,40 a	542,36 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	231,40 a	301,77 b
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	151,13 a	204,93 b
TOD3	<i>T. harzianum</i>	310,27 a	296,17 a
C.P ⁴	Controle Positivo	268,10 a	424,46 a
C.N ⁵	Controle Negativo	298,65 a	228,20 b
(CV%)		28,42	

2: coleta realizada após 15 dias de emergência foliar das plantas tratadas na semeadura;

3: coleta realizada 72 horas após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

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

Para o experimento com as plantas tratadas via pulverização foliar com filtrados dos isolados de *Trichoderma* spp., os tempos 0 e 1 não apresentaram diferença significativa, ou seja as plantas sem tratamentos e aquelas apenas tratadas com os filtrados não apresentaram incremento na atividade da POX, já no tempo 2 observa-se que os isolados TI1, TI2, TI4, TM2, TLB2, TLB4, TLB6, TLB9, TLB12, TLB14, TLB17, TOD1, TOD2A, TOD2B, e TOD3 reduziram a atividade enzimática de POX em relação ao controle positivo (Tabela 8).

Contrário a estes resultados El-Rahman e Mohamed (2014), ao testar indutores de resistência abióticos (benzotiadiazole) e bióticos (*T. harzianum*) em plantas de feijoeiro fava contra mancha de chocolate, verificaram aumento significativo na atividade de POX após infecção do agente patogênico. Stefanello et al. (2014), ao trabalhar com filtrados dos isolados (TLB15 (*T. virens*), TOD2A (*T. longibrachiatum*), TLB6 (*T. asperellum*) TOD3 (*T. harzianum*) e TLB17 (*T. koningiopsis*) em plantas de trigo visando à indução de resistência, puderam concluir que para o isolado TLB6 a atividade de peroxidase aumentou em 213,89% sendo superior em relação aos demais isolados. No mesmo estudo os autores observaram que os isolados TLB15 e TOD2A promoveram um acréscimo de 154,51% e 154,29% respectivamente, resultados diferentes aos encontrados neste estudo.

Tabela 8. Atividade de peroxidase em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrados de isolados de *Trichoderma* spp.

Atividade de peroxidase (Unidade de enzima ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹ tecido fresco)				
Isolados	Espécies	Tempo (0) ¹	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	119,97 a	150,15 a	136,25 b
TI2	<i>T. harzianum</i>	175,63 a	173,15 a	108,60 b
TI3	<i>T. virens</i>	151,05 a	277,32 a	292,06 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	128,00 a	145,57 a	138,92 b
TM1	<i>T. virens</i>	155,00 a	371,70 a	327,23 a
TM2	<i>T. virens</i>	140,33 a	351,80 a	111,32 b
TM3	<i>T. virens</i>	94,00 a	231,82 a	195,23 a
TM4	<i>T. virens</i>	234,83 a	233,33 a	326,20 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	155,60 a	191,72 a	127,95 b
TLB3	<i>T. harzianum</i>	159,75 a	331,25 a	216,32 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	153,52 a	244,47 a	164,75 b
TLB6	<i>T. asperellum</i>	91,62 a	261,50 a	109,07 b
TLB9	<i>T. virens</i>	273,50 a	119,50 a	94,02 b
TLB12	<i>T. harzianum</i>	130,17 a	229,10 a	155,15 b
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	123,06 a	157,23 a	120,37 b
TLB15	<i>T. virens</i>	60,75 a	200,40 a	229,40 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	133,52 a	377,20 a	128,72 b
TOD1	<i>T. harzianum</i>	89,77 a	161,15 a	87,60 b
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	122,32 a	176,42 a	81,02 b
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	141,20 a	237,00 a	150,86 b
TOD3	<i>T. harzianum</i>	129,55 a	332,70 a	182,43 b
C.P ⁴	Controle Positivo	70,75 a	188,20 a	191,75 a
C.N ⁵	Controle Negativo	155,40 a	122,05 a	77,67 b
(CV%)		32,76		

1: coleta realizada sem aplicação dos filtrados;

2: coleta realizada no terceiro dia após aplicação dos filtrados;

3: coleta realizada no terceiro dia após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

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

4.2.3 Atividade de Fenilalanina amônia-liase (FAL)

A avaliação da atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase em feijoeiro tratado na semeadura (Tabela 9), não apresentou diferença significativa para as coletas do tempo 1 e do tempo 2. Semelhantes a estes resultados, Dildey (2014), ao testar os mesmos isolados de *Trichoderma* spp. em feijoeiro no momento da semeadura, puderam concluir que os mesmos suprimiram a atividade enzimática de fenilalanina amônia-liase.

Ribas (2014) ao tratar plantas de feijoeiro com isolados de *Trichoderma* spp., visando a indução de resistência, observou que dentre estes o *Trichoderma harzianum* ICB05 foi o que mais se destacou, promovendo um notório aumento na atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase, resultados contrários aos encontrados no presente estudo.

Tabela 9. Atividade de fenilalanina amônia-liase em tecido foliar feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de *Trichoderma* spp.

Atividade de fenilalanina amônia-liase (Unidade de enzima ⁻¹ min ⁻¹ g ⁻¹ tecido fresco)			
Isolados	Espécies	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	0,71 a	2,00 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	4,57 a	0,71 a
TI3	<i>T. virens</i>	4,18 a	0,71 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	0,71 a	2,45 a
TM1	<i>T. virens</i>	7,48 a	2,69 a
TM2	<i>T. virens</i>	7,63 a	1,59 a
TM3	<i>T. virens</i>	5,36 a	5,21 a
TM4	<i>T. virens</i>	2,57 a	3,33 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	1,65 a	0,71 a
TLB3	<i>T. harzianum</i>	2,17 a	0,71 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	1,11 a	14,80 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	1,31 a	2,76 a
TLB9	<i>T. virens</i>	3,14 a	2,01 a
TLB12	<i>T. harzianum</i>	2,30 a	3,20 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	5,27 a	5,05 a
TLB15	<i>T. virens</i>	0,81 a	3,04 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	7,46 a	5,74 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	2,45 a	2,96 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	7,94 a	4,47 a
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	2,85 a	1,66 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	5,06 a	4,41 a
C.P ⁴	Controle Positivo	1,30 a	4,69 a
C.N ⁵	Controle Negativo	2,86 a	0,71 a
(CV%)	52,88		

2: coleta realizada após 15 dias de emergência foliar das plantas tratadas na semeadura;

3: coleta realizada 72 horas após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

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

Para o experimento com plantas de feijoeiro, tratadas via aspersão foliar com filtrados de isolados de *Trichoderma* spp., a atividade de fenilalanina amônia-liase, não apresentou diferença significativa, quando comparados os tratamentos aos controles, para as coletas do tempo 0, tempo 1 e do tempo 2 (Tabela 10).

Contrário aos resultados obtidos neste estudo, Karthikeyan et al. (2006), ao investigar a ação da aplicação, no solo, de bioagentes (*Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma viride* e *T. harzianum*, em combinação com quitina), sobre a indução de enzimas relacionadas à defesa e fenóis em raízes de coqueiros infectados com *Ganoderma lucidum*. Concluíram que a aplicação dessas formulações de microorganismo combinado com quitina acarretou em aumento significativo nas atividades de peroxidases, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, nas plantas infectadas com *G. lucidum*. Após a aplicação de uma mistura de *P. fluorescens*, *T. viride* e quitina, as atividades tanto da fenilalanina amônia-liase como da peroxidases foram máximas dentro de 3 dias, ao passo que a da polifenoloxidase foi máxima dentro de 6 dias. Após a imposição dos tratamentos, o acúmulo de fenóis ocorreu dentro de 3 dias, com concentrações máximas dentro de 9 dias.

Jayalakshmi et al. (2009), ao testar *T. harzianum* como eliciador de defesa em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), contra murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. puderam concluir que o isolado de *T. harzianum* L1 mostrou aumento das atividades de fenilalanina amônia-liase e polifenoloxidase além de conferir resistência ao apodrecimento das raízes causada pela murcha, resultados diferentes dos encontrados no presente estudo.

Tabela 10. Atividade de fenilalanina amônia-liase em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrado de isolados de *Trichoderma* spp.

Atividade de fenilalanina amônia-liase (μg ácido transcinâmico $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ massa fresca $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ massa fresca)				
Isolados	Espécies	Tempo (0) ¹	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	2,40 a	1,46 a	2,13 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	2,30 a	1,00 a	2,33 a
TI3	<i>T. virens</i>	3,54 a	0,71 a	1,71 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	4,20 a	0,71 a	1,96 a
TM1	<i>T. virens</i>	2,50 a	0,71 a	2,49 a
TM2	<i>T. virens</i>	3,58 a	1,75 a	4,73 a
TM3	<i>T. virens</i>	4,40 a	2,40 a	3,80 a
TM4	<i>T. virens</i>	2,81a	0,71 a	2,77 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	1,71 a	2,75 a	0,71 a
TLB3	<i>T. harzianum</i>	1,76 a	1,07 a	2,39 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	4,36 a	2,89 a	1,93 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	3,08 a	0,71 a	7,05 a
TLB9	<i>T. virens</i>	0,71 a	4,97 a	1,67 a
TLB12	<i>T. harzianum</i>	0,71 a	0,71 a	3,32 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	2,43 a	5,60 a	0,71 a
TLB15	<i>T. virens</i>	2,94 a	4,04 a	2,38 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	3,68 a	2,80 a	3,51 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	3,40 a	2,97 a	0,71 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	0,71 a	3,22 a	1,75 a
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	4,76 a	2,15 a	2,52 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	6,48 a	4,56 a	2,66 a
C.P ⁴	Controle Positivo	4,26 a	2,64 a	2,08 a
C.N ⁵	Controle Negativo	2,86 a	4,45 a	4,08 a
(CV%)	47,14			

1: coleta realizada sem aplicação dos filtrados;

2: coleta realizada no terceiro dia após aplicação dos filtrados;

3: coleta realizada no terceiro dia após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

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

4.2.4 Teor de Proteínas Solúveis Totais

No experimento *in vivo* cuja aplicação dos isolados de *Trichoderma* se deu no momento da semeadura, não se observou diferença significativa em relação ao incremento no teor de proteínas solúveis totais em plantas de feijoeiro (Tabela 11).

Ao contrário deste, em estudo realizado por Shores e Harman (2008) verificaram que quando o *Trichoderma harzianum* é adicionado ao solo ou em tratamento via semente, o mesmo coloniza raízes e induz grandes mudanças no proteoma de plântulas de milho, dentre

as quais se destacam a expressão de proteínas, os mesmos autores puderam concluir que esta expressão diferencial foi menor nas raízes de que na parte aérea, estando uma parte destas proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos e outra associada à defesa a fitopatógenos, respostas expressas tanto a nível local quanto a nível sistêmico.

Tabela 11. Teor de proteínas solúveis totais em tecido foliar feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de *Trichoderma* spp.

Teor de Proteínas Solúveis Totais		(Proteína mg g ⁻¹ peso fresco)	
Isolados	Espécies	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	1,30 a	1,20 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	1,68 a	1,38 a
TI3	<i>T. virens</i>	1,48 a	1,28 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	1,18 a	1,13 a
TM1	<i>T. virens</i>	1,53 a	0,95 a
TM2	<i>T. virens</i>	1,48 a	1,50 a
TM3	<i>T. virens</i>	1,38 a	1,00 a
TM4	<i>T. virens</i>	1,60 a	1,25 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	1,68 a	1,85 a
TLB3	<i>T. harzianum</i>	1,60 a	1,05 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	1,13 a	1,03 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	1,83 a	1,10 a
TLB9	<i>T. virens</i>	1,25 a	1,48 a
TLB12	<i>T. harzianum</i>	1,43 a	1,73 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	1,88 a	1,05 a
TLB15	<i>T. virens</i>	1,45 a	1,05 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	1,60 a	1,23 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	1,15 a	1,32 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	1,43 a	1,05 a
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	1,35 a	1,02 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	1,45 a	1,33 a
C.P ⁴	Controle Positivo	1,28 a	1,03 a
C.N ⁵	Controle Negativo	1,80 a	1,10 a
(CV%)		12,40	

2: coleta realizada após 15 dias de emergência foliar;

3: coleta realizada 72 horas após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista. presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista. ausência do patógeno).

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância respectivamente. Dados transformados por $\sqrt{x+0.5}$.

Para os tratamentos aplicados em plantas de feijoeiro via pulverização foliar de filtrados de *Trichoderma* spp., os tratamentos não promoveram incremento nos teores de proteínas solúveis totais em nenhum dos tempos de coleta (Tabela 12).

Harman et al. (2004) em seus trabalhos com *Trichoderma harzianum* em milho inoculado via semente, observaram resultados contrários aos obtidos no presente estudo, pois perceberam um aumento nos níveis de proteínas totais e atividades de β -1,3 glucanase, exoquitinase e endoquitinase, tanto nas raízes quanto na parte aérea, indicando indução de resistência sistêmica.

Tabela 12. Teor de proteínas solúveis totais em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrado de isolados de *Trichoderma* spp.

Teor de proteínas solúveis totais (Proteína mg g ⁻¹ peso fresco)				
Isolados	Espécies	Tempo (0) ¹	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	1,55 a	1,40 a	1,77 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	1,55 a	1,75 a	1,35 a
TI3	<i>T. virens</i>	1,70 a	1,72 a	1,67 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	1,30 a	1,32 a	1,65 a
TM1	<i>T. virens</i>	1,27 a	1,27 a	2,10 a
TM2	<i>T. virens</i>	1,52 a	1,57 a	1,55 a
TM3	<i>T. virens</i>	1,62 a	1,37 a	1,95 a
TM4	<i>T. virens</i>	1,55 a	1,60 a	1,30 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	1,20 a	1,80 a	1,57 a
TLB3	<i>T. harzianum</i>	1,02 a	1,02 a	1,90 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	1,12 a	1,60 a	1,70 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	1,47 a	1,87 a	1,90 a
TLB9	<i>T. virens</i>	1,32 a	1,50 a	1,75 a
TLB12	<i>T. harzianum</i>	1,27 a	1,62 a	1,85 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	1,62 a	1,45 a	1,32 a
TLB15	<i>T. virens</i>	1,62 a	1,60 a	1,80 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	1,65 a	1,15 a	1,47 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	1,25 a	1,75 a	1,62 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	1,30 a	1,57 a	1,75 a
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	1,47 a	1,17 a	1,55 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	1,35 a	1,45 a	1,62 a
C.P ⁴	Controle Positivo	1,15 a	1,70 a	2,10 a
C.N ⁵	Controle Negativo	1,45 a	1,80 a	1,75 a
(CV%)			12,39	

1: coleta realizada sem aplicação dos filtrados;

2: coleta realizada no terceiro dia após aplicação dos filtrados;

3: coleta realizada no terceiro dia após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

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

4.2.5 Teor de Fenóis Totais

O teor de fenóis totais no experimento *in vivo* com a aplicação dos isolados de *Trichoderma* na semeadura não se apresentou diferenças significativas para os tratamentos impostos em nenhum dos tempos de coleta, o que mostra que os isolados utilizados neste estudo não são eficazes na indução de compostos fenólicos (Tabela 13).

Discordando com os resultados do presente estudo, Sriram et al. (2009), trabalhando com isolados de *Trichoderma harzianum* na indução de resistência sistêmica, contra *Phytophthora capsici* em pimentão vermelho, observaram que para alguns isolados houve aumento significativo no teor de fenóis em plantas tratadas com talco a base de *T. harzianum*, reduzindo em 23% a infecção por *P. Capsici* em relação ao controle.

Yiedidia et al. (2003), ao estudar o efeito do *T. asperellum* inoculado nas raízes de pepineiro, também obtiveram resultados que não corroboram com os do presente estudo, já que puderam concluir que o mesmo reduzia os sintomas da mancha-angular do pepino (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) em até 80%, devido à indução de uma resposta sistêmica, a proteção conferida pelo agente de biocontrole, foi relacionada à acumulação de RNAm de dois genes de defesa: o gene que codifica fenilalanina amônia-liase (PAL) enzima chave da rota dos fenilpropanóide e o gene que codifica hidroperóxidos-liase (HP) da via da lipoxigenase. Esta hipótese foi ainda apoiada pelo acúmulo de metabólitos secundários de natureza fenólica.

Ojha e Chatterjee (2012), ao testar o efeito de uma aplicação no solo de ácido salicílico em combinação com um agente de controle biológico, *T. harzianum*, concluíram que houve um acúmulo de conteúdo fenólico e enzimas de defesa (peroxidase e polifenoloxidase) das plantas de tomate infectadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. O teor de compostos fenólicos com o maior registro deu-se, nos tratamentos que combinavam *F. oxysporum* + *T. harzianum* + ácido salicílico. Estudos que apresentam resultados similares aos dos tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. inoculados via semente, mais que em contra partida se mostram contrários quando os tratamentos se dão por aspersão foliar de filtrados de isolados de *Trichoderma* spp. em feijoeiro.

Tabela 13. Teor de fenóis totais em tecido foliar de feijoeiro tratado via semente com esporos de isolados de *Trichoderma* spp.

Teor de Fenóis Totais (mg catecol g ⁻¹ tecido seco)			
Isolados	Espécies	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	27,15 a	25,95 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	27,00 a	33,10 a
TI3	<i>T. virens</i>	26,90 a	26,32 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	30,62 a	35,45 a
TM1	<i>T. virens</i>	29,20 a	32,97 a
TM2	<i>T. virens</i>	31,20 a	27,77 a
TM3	<i>T. virens</i>	29,97 a	33,70 a
TM4	<i>T. virens</i>	27,62 a	31,92 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	28,27 a	27,22 a
TLB3	<i>T. harzianum</i>	32,05 a	29,80 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	30,57 a	32,47 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	32,97 a	29,17 a
TLB9	<i>T. virens</i>	31,07 a	33,42 a
TLB12	<i>T. harzianum</i>	29,30 a	32,80 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	32,82 a	33,27 a
TLB15	<i>T. virens</i>	29,62 a	28,52 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	31,32 a	35,70 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	32,32 a	33,50 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	32,95 a	29,70 a
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	27,62 a	33,87 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	29,57 a	29,07 a
C.P ⁴	Controle Positivo	28,00 a	33,87 a
C.N ⁵	Controle Negativo	32,62 a	30,95 a
(CV%)	9,20		

2: coleta realizada após 15 dias de emergência foliar;

3: coleta realizada 72 horas após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista. presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista. ausência do patógeno).

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância respectivamente. Dados transformados por $\sqrt{x+0.5}$.

Para o experimento com aplicação em plantas de feijoeiro via pulverização foliar de filtrados de *Trichoderma* spp., pode-se observar que não houve diferença estatística para os teores de fenóis totais, não promovendo os tratamentos incremento de compostos fenólicos (Tabela 14).

Karthikeyan et al. (2006), ao trabalhar com os microrganismos: *Pseudomonas fluorescens*, *T. viride* e *T. harzianum*, usados em combinação com quitina, sobre a indução de enzimas de defesa e fenóis em raízes de coqueiro infectados com *Ganoderma lucidum* agente causal da *Ganoderma*. Notaram que a aplicação resultou em aumento significativo na atividade de peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, quitinase e β -1,3 glucanase e no acúmulo de fenóis, que continuou aumentado significativamente com o

passar dos dias decorridos da aplicação do tratamento, atingindo os níveis máximos de compostos fenólicos aos 9 dias após o tratamento, acarretando na redução da *Ganoderma*.

Contrários aos resultados do presente estudo, Rajeswari, (2014), ao examinar os efeitos de filtrado de cultura de *T. viride*, *T. harzianum*, *Pseudomonas fluorescens* em *Arachis hypogaea* (amendoim-comum) infectada com *Fusarium oxysporum*, agente causal da fusariose, pode concluir que houve um aumento de até três vezes nos teores de fenóis, em relação ao controle, e de três a cinco vezes para as enzimas antioxidantes: catalase, peroxidase e polifenoloxidase. Segundo o mesmo autor, o estudo em questão indica que a aplicação de agentes de biocontrole pode ser um método ecologicamente viável na gestão de doenças de plantas, pois induz o mecanismo de defesa.

Tabela 14. Teor de fenóis totais em tecido foliar de feijoeiro tratado via aspersão foliar com filtrado de isolados de *Trichoderma* spp.

Teor de fenóis totais (mg catecol g ⁻¹ tecido seco)				
Isolados	Espécies	Tempo (0) ¹	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	27,75 a	33,43 a	24,50 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	26,48 a	34,65 a	28,05 a
TI3	<i>T. virens</i>	25,25 a	32,78 a	24,80 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	27,60 a	36,93 a	26,93 a
TM1	<i>T. virens</i>	22,78 a	28,60 a	26,00 a
TM2	<i>T. virens</i>	23,70 a	31,90 a	25,45 a
TM3	<i>T. virens</i>	25,45 a	29,90 a	24,88 a
TM4	<i>T. virens</i>	28,45 a	26,68 a	29,35 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	27,30 a	27,05 a	31,33 a
TLB3	<i>T. harzianum</i>	26,08 a	31,18 a	24,78 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	27,03 a	30,88 a	22,40 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	29,85 a	35,98 a	32,23 a
TLB9	<i>T. virens</i>	21,75 a	35,53 a	24,30 a
TLB12	<i>T. harzianum</i>	29,98 a	30,88 a	28,33 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	23,63 a	35,18 a	27,68 a
TLB15	<i>T. virens</i>	27,13 a	37,80 a	25,25 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	22,25 a	29,43 a	25,73 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	24,05 a	32,98 a	27,20 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	25,58 a	31,95 a	30,00 a
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	25,68 a	32,55 a	25,05 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	27,33 a	34,03 a	26,85 a
C.P ⁴	Controle Positivo	23,98 a	29,80 a	23,33 a
C.N ⁵	Controle Negativo	21,58 a	26,25 a	34,08 a
(CV%)		9,84		

1: coleta realizada sem aplicação dos filtrados;

2: coleta realizada no terceiro dia após aplicação dos filtrados;

3: coleta realizada no terceiro dia após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

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

4.2.6 Teor de Lignina

Os teores de lignina foram determinados apenas no experimento com aplicação de filtrados de *Trichoderma* via pulverização foliar aos 15 dias após a emergência das plântulas de feijoeiro. Assim, avaliando-se os tratamentos empregados, observa-se que os mesmos não apresentaram diferença significativa, sendo os isolados testados no presente trabalho neste modo de aplicação, ineficientes no incremento de lignina em feijoeiro.

Discordando com os resultados aqui obtidos, El-Rahman e Mohamed (2014), ao testar indutores de resistência abióticos (benzotiadiazole) e bióticos (*T. harzianum*) em plantas de feijoeiro fava contra mancha de chocolate, verificaram redução na doença e associaram esta proteção com o aumento significativo na atividade de fenilalanina amônia-liase e peroxidase. Além disso, notaram que após o tratamento com os indutores e a inoculação do patógeno, o conteúdo de lignina e de pectina na parede celular das plantas aumentou significativamente, em comparação com as plantas infectadas e não tratadas.

Mandal e Mitra (2007) ao testar à ação dos elicitores a base de extrato de micélio *Fusarium* (FME), quitosana (CHT), filtrado de cultura de *Fusarium* (FCF) e extrato de micélio *Trichoderma* (TME) em *Lycopersicon esculentum*, notaram que o TME provocou alterações nos teores de compostos fenólicos, além de acarretar em aumento significativo na deposição de lignina nas paredes celulares de raízes de tomate após 12, 24 e 36 horas de elicitação, isso consequentemente provocou fortalecimento da parede celular, por meio da deposição de lignina, precedida pela indução das enzimas (fenilalanina amônia liase, peroxidase, polifenoloxidase e cinamil álcool desidrogenase) que parece desempenhar um papel importante na resposta de defesa de *Lycopersicon esculentum* potencial. Este estudo vem confirmar o potencial do *Trichoderma* spp. em alterar o metabolismo vegetal, sendo ele um aliado na defesa contra fitopatogenos.

Outros estudos comprovam a benéfica associação ecológica (simbiótica) de alguns microorganismos e plantas, tais como resistência a estresses de origem ambiental e fitopatogênica, em vista disto Rêgo et al. (2014) em seus estudos objetivando a caracterização de alterações anatômicas e bioquímicas em raízes de plantas de arroz tratadas na semeadura com rizobactérias (*Burkholderia pyrrocinia* (R-46) + *Pseudomonas fluorescens* (R-55)) e *Trichoderma asperellum* (Ta: mistura de estirpes T-06, T-09, T-12 e T-52), perceberam que os tratamentos a base de *Burkholderia pyrrocinia*+ *Pseudomonas fluorescens* e *Trichoderma asperellum* acarretaram em aumento do comprimento, do diâmetro e da expansão do córtex e do cilindro vascular. Os mesmos autores também notaram elevação no teor de fenóis totais, aumento nos flavonóides e incremento nos teores de lignina, resultado da interação vegetal e dos bioagentes (rizobactérias e *Trichoderma* spp.).

Tabela 15. Teor de lignina em tecido foliar de feijoeiro tratadas via aspersão foliar com filtrado de isolados de *Trichoderma* spp.

Teor de lignina (mg lignina g-1 tecido seco)				
Isolados	Espécies	Tempo (0) ¹	Tempo (1) ²	Tempo (2) ³
TI1	<i>T. virens</i>	12,15 a	16,98 a	18,00 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	14,18 a	15,88 a	20,28 a
TI3	<i>T. virens</i>	15,70 a	15,05 a	19,18 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	12,03 a	12,93 a	17,68 a
TM1	<i>T. virens</i>	10,75 a	16,78 a	20,18 a
TM2	<i>T. virens</i>	10,50 a	16,48 a	18,95 a
TM3	<i>T. virens</i>	13,13 a	15,78 a	23,80 a
TM4	<i>T. virens</i>	12,28 a	13,70 a	21,18 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	12,43 a	14,93 a	19,70 a
TLB3	<i>T. harzianum</i>	13,68 a	19,18 a	17,98 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	12,18 a	12,95 a	21,75 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	12,00 a	14,68 a	19,00 a
TLB9	<i>T. virens</i>	11,28 a	15,53 a	21,60 a
TLB12	<i>T. harzianum</i>	11,33 a	16,25 a	13,48 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	12,08 a	14,85 a	15,83 a
TLB15	<i>T. virens</i>	12,73 a	15,33 a	22,98 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	15,50 a	14,93 a	24,08 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	9,40 a	18,43 a	18,35 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	15,10 a	18,33 a	21,50 a
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	12,13 a	19,95 a	16,90 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	12,85 a	17,85 a	24,25 a
C.P ⁴	Controle Positivo	10,33 a	14,10 a	20,20 a
C.N ⁵	Controle Negativo	11,15 a	15,20 a	24,33 a
(CV%)		12,80		

1: coleta realizada sem aplicação dos filtrados;

2: coleta realizada no terceiro dia após aplicação dos filtrados;

3: coleta realizada no terceiro dia após a inoculação do patógeno;

4: controle positivo (ausência do antagonista, presença do patógeno);

5: controle negativo (ausência do antagonista, ausência do patógeno).

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

4.2.7 Severidade de Antracnose

A severidade não apresentou diferença significativa para os isolados testados no presente trabalho, tanto na aplicação no momento da semeadura, quanto para a pulverização de filtrados de isolados de *Trichoderma* spp. via foliar, com exceção do isolado TM4 (*T. virens*), que apresentou diferença significativa em relação ao modo de aplicação do tratamento, ao qual o tratamento via semente apresentou índices menores de severidade da antracnose em relação ao tratamento via foliar.

Os níveis de severidade mostraram-se no geral baixos variando entre 0,84% a 1,58% (TM4 e controle negativo respectivamente) nos tratamentos via semente, e de 0,84% a 1,76% (TLB9 e TM4/TOD2A) nos tratamentos via pulverização foliar (Tabela 16). Estes dados podem não ser conclusivos, devido à condição ambiental subsequente à inoculação do agente patogênico, já que a implantação dos experimentos deu-se nos meses de outubro a novembro de 2013, sendo a época com clima típico de temperaturas mais elevadas não propicia para o total estabelecimento da doença.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Dildey (2014), que ao trabalhar com estes mesmos isolados de *Trichoderma* spp., visando à indução de resistência a antracnose em feijoeiro, concluiu que os mesmos permaneceram com os níveis de severidade baixos, para todos os tratamentos incluindo os controles.

Resultados diferentes foram obtidos por Souza et al. (2012), que em seus trabalhos visando a promoção de crescimento e o controle da antracnose em feijoeiro a partir de isolados de *Trichoderma* spp., concluíram que os isolados pertencentes às espécies *Trichoderma harzianum*, *T. strigosum* e *T. theobromicola*, podem proporcionar aumento superiores a 30% na produção de matéria seca e reduzir a severidade da doença entre 63 e 98%.

Silva et al., (2011), obtiveram resultados satisfatórios ao trabalhar com as espécies *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. strigosum*, *T. longibrachiatum*, e *T. koningiopsis*, que foram inoculados no substrato por meio de grãos de arroz previamente colonizados, mostrando-se eficientes como indutores de resistência à antracnose em pepineiro, já que os mesmos reduziram as lesões da doença, com destaque para *T. harzianum* que foi eficaz na proteção do feijoeiro, reduzindo a severidade da antracnose entre 56,46% a 85,99%. No mesmo estudo, os autores verificaram também que, as espécies

T. asperellum e *T. atroviride* também apresentaram proteção contra *Coletotrichum lagenarium*, e conferiram redução da severidade entre de 56,36% a 87,30%.

Estes estudos reafirmam o potencial do *Trichoderma* spp. em conferir proteção a plantas contra fitopatógenos, o que não corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, sendo a época de implantação do experimento um dos possíveis motivos da severidade apresentar-se em níveis tão baixos.

O uso de espécies de *Trichoderma* spp. deve continuar a ser alvo de pesquisas, devido a já comprovada eficácia destes biogentes em conferir proteção das plantas a fitopatógenos. Outros mecanismos deste antagonista ainda necessitam serem avaliados e elucidados, para uma maior compreensão do modo de ação destes microrganismos, visando assim, se ter mais domínio para a utilização do mesmo em problemas rotineiros e persistentes de ordem sanitária na agricultura.

Tabela 16 Severidade de antracnose causada por *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas de feijoeiro tratadas via semente ou pulverização das folhas com filtrados de isolados de *Trichoderma* spp.

Severidade de Antracnose (%)			
Isolados	Espécies	Tratamento de Semente	Filtrados Via Foliar
TI1	<i>T. virens</i>	0,97 a	1,53 a
TI2	<i>T. harzianum</i>	1,07 a	1,07 a
TI3	<i>T. virens</i>	1,40 a	1,44 a
TI4	<i>T. harzianum</i>	1,02 a	0,98 a
TM1	<i>T. virens</i>	1,39 a	1,02 a
TM2	<i>T. virens</i>	1,16 a	0,88 a
TM3	<i>T. virens</i>	0,93 a	1,21 a
TM4	<i>T. virens</i>	0,84 a	1,76 a
TLB2	<i>T. harzianum</i>	1,58 a	0,93 a
TLB3	<i>T. harzianum</i>	1,25 a	1,20 a
TLB4	<i>T. harzianum</i>	1,11 a	0,84 a
TLB6	<i>T. asperellum</i>	1,43 a	1,16 a
TLB9	<i>T. virens</i>	1,21 a	0,84 a
TLB12	<i>T. harzianum</i>	1,11 a	1,43 a
TLB14	<i>T. koningiopsis</i>	1,30 a	1,25 a
TLB15	<i>T. virens</i>	0,88 a	1,30 a
TLB17	<i>T. koningiopsis</i>	1,62 a	1,11 a
TOD1	<i>T. harzianum</i>	1,35 a	1,16 a
TOD2A	<i>T. longibrachiatum</i>	1,44 a	1,76 a
TOD2B	<i>T. longibrachiatum</i>	0,93 a	1,06 a
TOD3	<i>T. harzianum</i>	1,43 a	1,25 a
C.P ⁴	Controle Positivo	1,07 a	1,11 a
C.N ⁵	Controle Negativo	1,58 a	1,48 a
(CV%)	14,93		

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

5 CONCLUSÕES

- 1- Em geral os filtrados obtidos a partir dos isolados de *Trichoderma* spp. reduziram o percentual de germinação do patógeno.
- 2- Os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram alta eficiência quando confrontados ao patógeno inibindo seu desenvolvimento.
- 3- O antagonista propiciou aumento significativo apenas à atividade enzimática da polifenoloxidase em feijoeiro tratado na semeadura, para as demais variáveis analisadas o mesmo não foi capaz de promover resultados significativos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5ed. San Diego, California: Elsevier Academic Press, p. 922, 2005.

ALMAGRO, L.; ROS, L. G.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; BARCELÓ, A. R.; PEDREÑO, M. A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**. v. 60, n. 2, p. 377-390, 2009.

ALMEIDA, W. K. D. S. da. Antagonismo de *Trichoderma viride* Sobre Fungos Fitopatogênicos, *Colletotrichum spp.*, *Cercospora musae* e *Asperisporium caricae* em Fruteiras Tropicais. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 4, n. 2, 2009.

ALMEIDA, D. G.; DA SILVA, M. D. G. C.; DE SOUZA, F. S.; DE LIRA, D. D.; SILVA, C. D. C. S. M.; DE CAMPOS TAKAKI, G. M.; DE GUSMÃO, N. B. Produção de celulase, polifenoloxidase e tanase por fungos filamentosos. In: **XIV Jornada de ensino pesquisa e extensão**, 2014. Recife. Disponível em: <http://eventosufrpe.com.br/>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2015.

ALVES, E.; PERINA, F. J. Extratos vegetais e óleos essenciais na indução de resistência em plantas contra patógenos. SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SILVA, C. M.; MAIA, A. J.; FARIA, C. M. D. R.; COLELLA, J. C. T. In: **Indução de resistência em plantas a patógenos**. UEM-centro de ciências agrárias-Programa de pós-graduação em agroecologia, 2014.

ANEJA, M.; GIANFAGNA, T. J.; HEBBAR, P. K. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 67, n. 6, p. 304-307, 2005.

ANGIOI, S. A.; RAU, D.; ATTENE, G.; NANNI, L.; BELLUCCI, E.; LOGOZZO, G.; NEGRI, V.; SPAGNOLETTI ZEULI, P. L.; PAPA, R. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 121, p.829-843, 2010.

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

ARGUMEDO-DELIRA, R.; ALARCÓN, A.; FERRERA-CERRATO, R.; PEÑACABRIALES, J. J. El género fúngico *Trichoderma* y su relación com contaminantes orgânicos e inorgânicos. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**., v. 24, n. 4, p. 257-269, 2009.

AYDIN, N.; KADIOGLU, A. Changes in the chemical composition, olyphenol oxidase and peroxidase activities during development and ripening of medlar fruits (*Mespilus germanica* L.). **Bulgarian Journal of Plant Physiology**. v. 27, p. 85-92, 2001.

BARBER, M. S.; RIDE, J. P. A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 32, p. 185-197, 1988.

BARBOSA, A. da. S.; MEDEIROS, M. B. de. Potencial de ação elicitora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência sistêmica vegetal. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 2, n. 2, p. 1453-1457, 2007.

BARROS, F. C. SAGATA, E.; DE CASTRO FERREIRA, L. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas à fitopatogênese=Induction of resistance in plants against phytopathogens. **Bioscience Journal**. v. 26, n. 2, 2010.

BATISTA FILHO, A. Controle Biológico: Alternativa para uma agricultura sustentável. In: **Controle Biológico de Insetos e Ácaros**. Boletim Técnico Instituto Biológico, São Paulo, n. 15, p. 1-3, julho 2006.

BERNARDS, M. A.; FLEMING, W. D.; LLEWELLYN, D. B.; PRIEFER, R.; YANG, X.; SABATINO, A.; PLOURDE, G. L. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato. **Plant Physiology**. v. 121, p. 135-145, 1999.

BERTI FILHO, E.; CIOCIOLA, A. I. Parasitóides ou predadores? Vantagens e desvantagens. In: PARRA, J.R.P. (ed.); BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. **Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores**. p. 29-41, 2002.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle biológico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Agronômicas Ceres. São Paulo 3 ed., p. 718, 1995.

BETTIOL, W.; STADNIK, M. J. Controle alternativo. In: STADNIK, M.J.; RIVERA, M.C. (Ed.) **Oídios**, EMBRAPA Meio Ambiente. Jaguariuna. 2001. p. 165-192.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B.; STADNIK, M. J.; KRAUS, U.; STEFANOVA, M.; PRADO, A. M. C. Controle Biológico de Doenças de Plantas na América Latina. In: ALVES, S.B.; LOPES, R.B.(EDs.) **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba: FEALQ, p. 303-331, 2008.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. In: (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. EMBRAPA Meio Ambiente. Jaguariuna. p. 8-14, 2009.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo Ceres. v. 2, p. 333, 2005.

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, p. 11-28. 2005.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A Cultura. In: VIEIRA, C.; JUNIOR, T. J. P.; BORÉM, A. **Feijão**. 2 ed Viçosa. UFV, p. 42, 2006.

BOZIKI, D.; BEROLDT, L. S.; PRINTES, R. C. Situação Atual da Utilização de Agrotóxicos e Destinação de Embalagens na Área de Proteção Ambiental Estadual Rota Sol. **Revista VITAS – Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade**. n. 1, 2011.

BOKSHI, A. I.; MORRIS, S. C.; DEVERALL, B. J. Effects of benzotriazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. **Plant Pathology**. v. 52, p. 22-27, 2003.

BOWLES, D. J. **Defense related proteins in higher plants**. **Biochemistry**, v. 59, p. 837-907, 1990.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BROETTO, L. **Antagonismo a *Macrophomina phaseolina* e Promoção do Crescimento em Feijoeiro Mediados por *Trichoderma* spp.** 2013. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Produção Vegetal) Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste, Marechal Cândido Rondon, 2013.

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**. v. 39, n. 7, p. 637-643, 2004.

CANTERI, M. G.; SILVA, O. C.; DALLA PRIA, M.; COSTA, J. L. S.; SOUZA, E. D. T.; BERNI, R. F. Principais medidas de controle. In: CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, M. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**. Ponta grossa, Editora: UEPG, p.139-159, 1999.

CHAMAN, M. E.; COPAJA, S. V.; ARGANDONÁ, V. H. Relationships between salicylic acid content, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, and resistance of barley to aphid infestation. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 2227-2231, 2003.

CHEN, J.; ZHANG, X.; JING, R.; BLAIR, M. W.; MAO, X.; WANG, S. Cloning and genetic diversity analysis of a new P5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**. v. 120, p. 1393-1404, 2010.

COLARES, M. R. N.; BONALDO, S. M. Uso de biofertilizantes na indução de resistência em plantas a patógenos. SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; SILVA, C. M.; MAIA, A. J.; FARIA C. M. D. R.; COLELLA, J. C. T. In: **Indução de resistência em plantas a patógenos**. UEM-centro de ciências agrárias-Programa de pós-graduação em agroecologia, 2014.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2014) **Acompanhamento da safra brasileira: grãos: decimo segundo levantamento**, setembro de 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 18 de maio. 2015.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**. v. 7, p. 210-216, 2002.

CONSTABEL, C. P.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 92, p. 407-411, 1995.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. da.; COSTA, J. L. da. S.; SOUZA, E. D. de. T.; BERNI, R. F. Diagnose das doenças. In: CANTERI, M. G; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. da. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**. Ponta Grossa: UEPG, p.18-20, 1999.

DEBOUCK, D. G. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. p. 55-118.

DIAS, P. P.; BERBARA, R. L. L.; FERNANDES, M. do.C de A. *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli control by biopreparation with *Trichoderma* spp. isolates. **Summa Phytopathologica**. v. 39, n. 4, p. 258-262, 2013.

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.

DILDEY, O. D. F. **Interação *Trichoderma*-feijoeiro e seus Efeitos na Fisiologia e Indução de Resistência contra Antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Produção Vegetal) Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste, Marechal Candido Rondon, 2014.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **Plant Cell**. v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**. 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. **Aplicação de fungicidas via tratamento de sementes para o controle da antracnose (*Colletotrichum***

lindemuthianum) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Aracaju, 2002. Disponível em: <http://http://www.cpatc.embrapa.br/>. Acesso em 24 Dez. 2014.

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**. v. 30 p. 127-133, 2005.

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

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.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e Fenologia. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de feijão**. Piracicaba, LIVRO CERES, p. 27, 2007.

FERREIRA, C. M.; SANTOS, M. L.; BRAGA, M. J.; DEL PELOSO, M. J. Aspectos Econômicos. In: VIEIRA, C.; JUNIOR, T. J. P.; BORÉM, A. **Feijão**. Viçosa 2 ed. UFV, p. 42, 2006.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FOSTER, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. **Bragantia**. v. 10, p. 139-148, 1950.

FREITAS, F. O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 41, n. 7, p. 1199-1203, 2006.

FRY, S. C. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell wall of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**. v. 37, p. 165-186, 1986.

GAUCH, F. **Micoparasitismo de espécies de *Pythium* com oogônio equinulado e o controle de *Pythium ultimum* Trow causador de tombamento de mudas, em hortaliças**. 1996. 94 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

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.

GOMES, N. S. B.; JUNIOR, A. G.; AUER, C. G. Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate. **Boletim de Pesquisa Florestal**. v. 43, n. 43, p. 123-138, 2001.

GOMES, M. R. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Propriedades Físico-Químicas de Polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência. Tecnologia de Alimentos**. v. 21, n. 1, p. 69-72, 2001.

GOMES, F. B.; MORAES, J. C.; SANTOS, C. D. D.; ANTUNES, C. S. Use of silicon as inductor of the resistance in potato to *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). **Neotropical Entomology**. v. 37, n. 2, p. 185-190, 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 Agrônomo de Campinas, Campinas, SP, 2008.

GÖRGEN, C. A.; SILVEIRA NETO, A. D.; CARNEIRO, L. C.; RAGAGNIN, V.; LOBO JUNIOR, M. Controle do mofo-branco com palhada e *Trichoderma harzianum* 1306 em soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, n. 12, p. 1583-1590, 2009.

GUZZO S. D.; HARAKAVA, R. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: Sinalização e expressão de genes de defesa. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R.S. (Eds.) **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema. p. 281-301, 2007.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUĆ, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology**. v. 20, p. 61-71, 1982.

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**. v. 37, n. 1, p. 285-306, 1999.

HARMAN, G. E.; PETZOLDT, R.; COMIS, A.; CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**. v. 94, n. 2, p. 147-153, 2004.

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

HOAGLAND, R. E. Biochemical responses of plants to pathogens. In: HOAGLAND, R.E. (Ed.). **Microbes and microbial products as herbicides**. Washington: American Chemical Society, p. 87-113, 1990.

IAPAR – Instituto Agrônomo do Paraná **Feijão Iapar 81**. Disponível em: http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/iapar81.pdf. Acesso em: 20/02/2015.

IAPAR - Instituto Agrônomo do Paraná. **Iapar 81**. Londrina-Paraná. 2014. Disponível em: http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/iapar81.pdf. Acesso em: 10 de outubro de 2014.

ITAKO, A. T.; TOLENTINO JUNIOR, J. B.; SCHWAN-STRADA, K. R. F.; BALBI-PEÑA, M. I. Polifenoloxidase induzida por óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em folhas de tomate inoculadas com *Alternaria solani*. **Summa Phytopathologica**. v. 34, p. 54, 2008.

INTRAPUK, C. I.; TAKANO, M.; SHINMYO, A. Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**. v. 104, p. 285-286, 1994.

IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; BALBI-PEÑA, M. I.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Histopatologia da interação entre *Alternaria solani* e tomateiro tratado com *Curcuma longa* e curcumina. **Summa Phytopathologica**. v. 32, p. 28, 2006.

JAYALAKSHMI S. K.; RAJU, S.; USHA RANI, S.; BENAGI, V. I.; SREERAMULU, K. *Trichoderma harzianum* L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. **Austr. Journal of Crop Science**. v. 3, p. 44-52, 2009.

JÚNIOR, T. J. P.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; JUNIOR, T. J. P.; BORÉM, A. **Feijão**. 2 ed. Viçosa: UFV, p. 363-364, 2006.

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.

KEXIANG, G.; XIAOGUANG, L.; YONGHONG, L.; TIANBO, Z.; SHULIANG, W. Potential of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* to control *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*, the cause of apple ring rot. **Journal of Phytopathology**. v. 150, n. 4-5, p. 271-276, 2002.

KONSTANTINIDOU-DOLTSINIS, S.; SCHMITT, A. Impact of treatment with plant extracts from *Reynoutria sachalinensis* Nakai on intensity of powdery mildew severity and yield in cucumber under high disease pressure. **Crop Protection**. v. 17, p. 649-656, 1998.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; CARDOSO FILHO, J. A.; PORTZ, R. L.; OSSWALD, W.; LUZ, W. Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 14, p. 249-300, 2006.

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**. 2007. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LEITE, B.; RONCATO, L.; PASCHOLATI, S.; LAMBAIS, M.; LUZ, C.; FERNANDES, J.; PICININI, E. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações plantas-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 5, p. 235-280, 1997.

LIU, H.; JIANG, W.; BI, Y.; LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**. v. 35, p. 263-269, 2005.

LO, L. C.; WEIERGANG, I.; BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R. L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 49, p. 21-31, 1996.

LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotropica**. 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**. v. 25, p. 244-249, 1999.
- MACIEL, C. G.; LAZAROTTO, M.; MEZZOMO, R.; POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; IPPERT, D. B. *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus saligna*. **Revista Árvore**. v. 36, n. 5, p. 825-832, 2012.
- MACIEL, C. G.; WALKER, C.; MUNIZ, M. F. B.; ARAÚJO, M. M. Antagonism of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* (UFV3918) to *Fusarium sambucinum* in *Pinus elliottii* engelm. **Revista Árvore**. v. 38, n. 3, p.505-512, 2014.
- MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F. D.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**. v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.
- MANDAL, S.; MITRA, A. Reinforcement of cell wall in roots of *Lycopersicon esculentum* through induction of phenolic compounds and lignin by elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 71, n. 4, p. 201-209, 2007.
- MEDEIROS, F. H. V. D.; MARTINS, S. J.; ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. D.; BATISTA, L. R.; MACHADO, J. D. C. Biological control of mycotoxin-producing molds. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 36, n. 5, p. 483-497, 2012.
- MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 4, p. 261–295, 1996.
- MELO, I. S. Agentes Microbianos de Controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa, v. 1, 1998. p. 18-60.
- MELO, I.S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, v. 1. p. 262, 1998.
- MENTEN, J. O. M.; MORAES, M. H. D. de.; NOVEMBRE, A. D. da. L. C.; ITO, M. A. Qualidade das Sementes de Feijão no Brasil. **Pesquisa e Tecnologia-APTA, Pesquisa & Tecnologia**. v. 3, n. 2, 2006.
- MONOT, C.; PAJOT, E.; LE CORRE, D.; SILUÉ, D. Induction of systemic resistance in broccoli (*Brassica oleracea* var *botrytis*) against downy mildew (*Peronospora parasitica*) by avirulent isolates. **Biological Control**. v. 24, p. 75-81, 2002.
- MORAES, W. B. C. Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. p. 175-190, 1992.
- MORALES, M.; ROS BARCELO, A. A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *Vitis vinifera*. **Phytochemistry**. v. 45, p. 229–232, 1997.

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**. Jaguariuna: editora EMBRAPA, p. 7-14, 2009.

MULLER, K. O., BORGER, H. Experimentalle untersuchungen uber die Phytophthora infestans Resistenz der Kartoffel. **Biol.Reichsant.** v. 23, p. 189-231. 1940.

NAVA, D. E. Controle biológico de insetos-praga em frutíferas de clima temperado: uma opção viável, mas desafiadora, **EMBRAPA**. Pelotas, 2007.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v. 30, p. 369-389, 1992.

NICHOLSON, R. L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**. v. 21, p. 95-99, 1995.

OJHA, S.; CHATTERJEE, N. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. **Journal of Plant Protection Research**. v. 52 n. 2, p. 220-225, 2012.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, v. 1, p. 193-217, 1995.

PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI. **Summa Phytopathologica**. v. 29, n. 1, p. 116-116, 2003.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**. v. 24, p. 255-265, 2005.

PASSARDI, F.; ZAMOCKY, M.; FAVET, J.; JAKOPITSCH, C.; PENEL, C.; OBINGER, C.; DUNAND, C. Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are these patches of order in chaos? **Gene**. v. 397, p. 101-113, 2007.

PASTOR-CORALES, M. A.; TU, J. C. Antracnose. In: PASTOR-CORALES, M. A.; SCHWARTZ, H. F. (eds). **Problemas de producción del frijol en los trópicos**. 2 ed. Cali, Colômbia, p. 87-119, 1994.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; TEIXEIRA, H.; COELHO, R. R.; CARNEIRO, J. E. S.; ANDRADE, M. J. B.; REZENDE, A. M. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro: comum na região central brasileira: 2007-2009**. Viçosa: Epamig-CTZM, 2008.

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

PESSOA, M. C. Y.; CHAIM, A. Programa computacional para estimativa de uniformidade de gotas de herbicidas aplicados por pulverização aérea. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 34, n. 1, p. 45-56, 1999.

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

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

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.

RÊGO, M. C. F.; ILKIU-BORGES, F.; FILIPPI, M. C. C. D.; GONÇALVES, L. A.; SILVA, G. B. D. Morphoanatomical and biochemical changes in the roots of rice plants induced by plant growth-promoting microorganisms. **Journal of Botany**, 2014.

RESENDE, M. de. L.; OLIVEIRA, J. A. de.; GUIMARÃES, R. M.; VON PINHO, R. G.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 28, n. 4, p. 793-798, jul./ago., 2004.

RESENDE, M. L. V.; ARAUJO, D. V.; COSTA, J. C. B.; DEUNER, C. C., FERREIRA, J. B., MUNIZ, M. F. S.; NOJOSA, G. B. A. Produtos comerciais à base de bioindutores de resistência em plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 14, p. 361-380, 2006.

RESENDE, M. L. V.; CAVALCANTI, F. R.; SANTOS, F. S.; AMARAL, D. R.; RIBEIRO JR, P. M.; COSTA, J. C. B.; SOUZA, R. M. Novos Indutores de resistência contra doenças em cafeeiro, cacauieiro, algodoeiro e tomateiro: Perspectiva de utilização. III REUNION BRASILEIRA SOBRE INDUCION DE RESISTENCIA EN PLANTAS A PATÓGENOS, **Anais...**, p. 161-182, 2007.

RIBAS, P. P. **Promoção de Crescimento, Indução de Resistência e Controle biológico de Fitopatógenos em Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.) Mediados por *Trichoderma* spp.** 2014. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande Do Sul de Porto Alegre, 2014.

RITTER, H.; SCHULZ, G. E. Structural basis for the entrance into the phenylpropanoid metabolism catalyzed by phenylalanine ammonia-lyase. **Plant Cell**. v. 16, p. 3426-3436, 2004.

RODRIGUES, F. A.; JURICK II, W. M.; DATNOFF, L. E.; JONES, J. B.; ROLLINS, J. A. Silicon influences cytological and molecular events in compatible and incompatible rice-*Magnaporthe grisea* interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 66, p. 144-159, 2005.

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

ROSOLEM, C. A.; MARUBAYASHI, O. M. Seja o doutor do seu feijoeiro. Potafos—**Encarte do informações agronômicas**. n. 68, p.1-18, 1994.

SALGADO, T. P.; SALLES, M. S.; MARTINS, J. V. F.; ALVES, P. L. C. A. Interferência das plantas daninhas no feijoeiro Carioca. **Planta Daninha**. v. 25, n. 3, p. 443-448, 2007.

SAMUEL, G. J. *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. **Journal of Mycology**. v. 100, p. 923-935, 1996.

SANTOS, H. A. *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporum*. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)-Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SCHENK, P. M.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M.; ANDERSON, J. P.; SIMPSON, R. S.; WILSON, I.W.; MACLEAN, D. J. Expressão gênica sistêmica em *Arabidopsis* durante uma interação incompatível com *Alternaria brassicicola*. **Plant Physiology**. v. 132, n. 2, p. 999-1010, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta patógeno: fisiologia bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248, 2008.

SHIRAISHI, T.; YAMADA, T.; NICHOLSON, R. L.; KUNOH, H. Phenylalanine ammonialyase in barley: activity enhancement in response to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (raça1) a pathogen, and *Erysiphe pisi*, a nonpathogen. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 46, p.153-162, 1995.

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**. 2008.

SNOWDON, A. L. **A colour atlas of post-harvest diseases and Disorders of fruits and vegetables: fruits and general introduction**. London: WolfeScientific, v.1, 1990. 302p.

SILVA, K. J. D., SOUZA E. A.; ISHIKAWA F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**. v.155, p.241-247, 2007

SILVA, E. G. D.; MOURA, A. B.; BACARIN, M. A.,; DEUNER, C. C. Alterações metabólicas em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas por *Pseudomonas* sp. e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**. v. 35, n. 2, p. 98-104, 2009.

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

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

SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris* Fabaceae). **Economic Botany**. v. 45, n. 3, p. 379-396, July/Sept. 1991.

SONG, J.; WANG, Z. Molecular cloning, expression and characterization of a phenylalanine ammonia-lyase gene (SmPAL1) from *Salvia miltiorrhiza*. **Molecular Biology Reports**. v. 36, n. 5, p. 939-952, 2009.

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

SOUSA, M. F.; SILVA, L. V.; BRITO, M. D.; FURTADO, D. C. M. Tipos de Controle Alternativo de Pragas e Doenças nos Cultivos Orgânicos no Estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 7, p. 132-138, 2012.

SRIRAM, S.; MANASA, S. B.; SAVITHA, M. J. Potential use of elicitors from *Trichoderma* in induced systemic resistance for the management of *Phytophthora capsici* in red pepper. **Journal of Biological Control**. v. 2, n. 4, p. 449-456, 2009.

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

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

STEFANELLO, L.; VAZ, V. F.; DILDEY, O. D. F.; KUNH, O. J.; HELING, A. L.; HENKEMEIER, N. P.; LORENZETTI, E.; COLTRO-RONCATO, S.; GONÇALVES, E. D. V.; MEINERZ, C. C. Indução de resistência em plantas de trigo pulverizadas com exsudatos de *Trichoderma* spp. In: **VII Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Maringá, 2014.

STICHER, L.; MAUCH, M. B.; METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**. v. 35, p. 235-270, 1997.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3.ed. p. 719, Porto Alegre: Artmed, 2004.

TRATCH, R.; BETTIOL, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. p. 1131-1139, 1997.

VAUGHN, K. C.; DUKE, S. O. Function of polyphenol oxidase in higher plants. **Physiologia Plantarum**. v. 60, p. 106-112, 1984.

VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de resistência em feijoeiro por filtrado de cultura de *Pycnoporus sanguineus* contra *Pseudocercospora griseola*. **Tropical Plant Pathology**. v. 34, n. 2, p. 87-96, 2009.

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. **Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos**. Organizações dos Estados Americanos, p. 1-3, 1993.

WANDER, A. E.; RAMALHO, M. A. P.; ANDRADE, M. J. B. **Cultivo do Feijão da Primeira e Segunda Safras na Região Sul de Minas Gerais**. EMBRAPA: Viçosa, 2005.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 12, p. 7343-7353, 2003.