

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON

OMARI DANGELO FORLIN DILDEY

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO POR FRAÇÕES
DE FILTRADO DE CULTURA E EXTRATO DE MICÉLIO DE *Trichoderma*
*longibrachiatum***

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2017

OMARI DANGELO FORLIN DILDEY

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À ANTRACNOSE DO FEJJOEIRO POR FRAÇÕES DE
FILTRADO DE CULTURA E EXTRATO DE MICÉLIO DE *Trichoderma*
*longibrachiatum***

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn

Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D576i

Dilley, Omari Dangelo Forlin

Indução de resistência à antracnose do feijoeiro por frações de filtrado de cultura e extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum*. / Omari Dangelo Forlin Dilley. Marechal Cândido Rondon, 2017.

100 f.

Orientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn

Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 2017.

Programa de Pós-Graduação em Agronomia

1. Feijão - Cultivo. 2. Doenças e pragas - Controle. I. Kuhn, Odair José. II. Stangarlin, José Renato. III. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 20.ed. 635.652

CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio – CRB 9ª/965

OMARI DANGELO FORLIN DILDEY

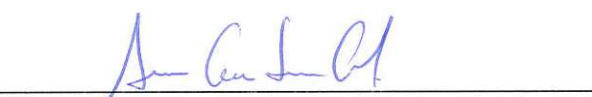
INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A ANTRACNOSE DO FEIJOEIRO POR
FRAÇÕES DE FILTRADO DE CULTURA E EXTRATO DE MICÉLIO DE
Trichoderma longibrachiatum

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

APROVADA: 12 de maio de 2017



Prof. Dr. José Renato Stangarlin
(Coorientador)
(UNIOESTE)



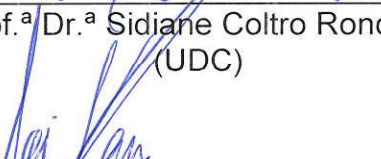
Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa
(UNIOESTE)



Prof. Dr. Roberto Luis Portz
(UFPR)



Prof.ª Dr.ª Sidiane Coltro Roncato
(UDC)



Prof. Dr. Odair José Kuhn
(Orientador)
(UNIOESTE)

À Deus Pai e a Jesus Cristo,

Que abençoou com a vida e com o equilíbrio de sua perfeita criação,

Ao meu avô Gentil Favero Forlin (*in memoriam*).

“Na simplicidade do conhecimento foi
exemplo de determinação, amor e bondade”.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço a minha família que me incentivou nos momentos de dificuldade, pela compreensão, apoio e incentivo, possibilitando a realização deste trabalho.

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

Ao professor coorientador Dr. José Renato Stangarlin pela disponibilidade, ensinamentos e incentivos.

Aos meus grandes amigos Edilaine D.V. Gonçalves-Trevisoli, Bruna B. Rissato, Tulya F.B. Webler, Laline Broetto, Sidiane Coltro-Roncato, Luciana Iurkiv, Cristiane C. Meinerz e Alice J. Moraes os quais estiveram constantemente presentes e colaboraram diretamente para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos André Spohr, Adriano Loch, Djenifer Probest, Tiago R. Trento e Raquel Baioco pela amizade e companheirismo, compartilhando todos os momentos, tristes ou felizes.

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

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

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos.

Aos membros da banca examinadora, pelas sugestões e considerações.

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

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta
ao seu tamanho original”
(Albert Einstein).

RESUMO

DILDEY, Omari D. F. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, maio de 2017. **Indução de resistência à antracnose do feijoeiro por frações de filtrado de cultura e extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum***. Orientador: Odair José Kuhn. Coorientador: José Renato Stangarlin.

O trabalho teve por objetivo purificar por cromatografia moléculas eliciadoras a partir de filtrado de cultura e extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum* e testá-las na indução de fitoalexina faseolina e com potencial indutor de resistência contra antracnose no feijoeiro. O tampão fosfato de sódio 0,05 M (TAP) foi utilizado como tratamento controle e ASM (Acibenzolar-S-Metil) foi utilizado como tratamento padrão de indução. Cromatografia de troca iônica (CTI) e cromatografia de filtração em gel (CFG) foram realizadas para separar frações com poder eliciador a partir de filtrado de cultura (FTC) e extrato de micélio (EXM) de *T. longibrachiatum*. Para a purificação de eliciadores por CTI, a partir de FTC, foram obtidos uma fração glicídica e cinco glicoproteicas, total de seis frações. Para a purificação a partir de EXM, foram obtidos três frações proteicas, uma glicídica e duas glicoproteicas, total de seis frações, em ambos foi totalizado doze frações obtidas por CTI. Estas, por sua vez, foram purificadas em CFG, sendo obtidos um total de trinta e sete frações. Entre essas, quatorze frações para FTC, as mesmas foram classificadas de acordo com sua natureza, sendo três proteicas, duas glicídicas e nove glicoproteicas. E vinte e três frações para EXM, as mesmas foram classificadas com sua natureza, sendo quatro proteicas, nove glicídicas e dez glicoproteicas. Das frações purificadas na CFG a partir de FTC e EXM, oito apresentaram potencial indutor de faseolina (F17, F23, F25, F27, F31, F38 e F46). Os 10 tratamentos constituíram de oito frações e dois controles: ASM e controle (TAP). Foram aplicados os tratamentos em uma das folhas primária (folha tratada (FT)), sendo que outra folha primária não recebeu tratamento (folha não tratada (FNT)) para verificar o efeito sistêmico. Foram realizadas três coletas de folhas para determinação da atividade enzimática, antes da aplicação das frações, depois da aplicação das frações e coleta após a inoculação do patógeno. Foi realizada análise enzimática (peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), catalase (CAT), fenilalanina amônia-liase (FAL) e β -1,3-glucanase (β -GASE)) e ao final, realizada avaliação de severidade no quinto dia após a inoculação da folha primária de feijoeiro. A purificação de amostras provenientes de FTC e EXM de *T. longibrachiatum*, por CTI e CFG indicaram frações com presença de moléculas eliciadoras. As frações F17, F23 e F25 de origem FTC e F27, F29, F31, F38 e F46 de origem EXM foram capazes de induzir a síntese de faseolina em hipocótilos de feijoeiro. A atividade de POX, PFO e β -GASE aumentou quando aplicado na FT após a aplicação das frações e após a inoculação do patógeno. As frações não alteraram a atividade enzimática de CAT e FAL. As frações F17, F23 e F27 reduziram a severidade da antracnose no efeito local.

Palavras-chave: Cromatografia de troca iônica, cromatografia de filtração em gel, *Phaseolus vulgaris* L., indução de resistência, fitoalexinas, *Colletotrichum lindemuthianum*.

ABSTRACT

DILDEY, Omari, D. F. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, in may 2017. **Induction of anthracnose resistance of common bean by fractions of culture filtrate and mycelial extract of *Trichoderma longibrachiatum***. Advisor: Odair José Kuhn. Co-Advisors: José Renato Stangarlin.

This study aimed to purify by chromatography elicitors from *Trichoderma longibrachiatum* culture filtrate and mycelium extract and to test them in phytoalexin phaseolin inducing and resistance induced to anthracnose in common bean. The sodium phosphate buffer at 0.05 M (SPB) was used as the control treatment and the ASM (Acibenzolar-S-Metil) was used as the standard induction treatment. Ion Exchange Chromatography (IEC) and Gel Filtration Chromatography (GFC) were performed to separate fractions with eliciting power from the culture filtrate (CF) and *T. longibrachiatum* mycelium extract (TME). For the purification of elicitors by IEC, from GFC, it were obtained one glycidic and five glycoproteins fractions, totaling six fractions. For purification from TME, it were obtained three protein, one glycidic and two glycoproteins fractions, totaling six fractions. In both, were obtained twelve fractions from IEC. These, in turn, were purified in GFC, being obtained a total of thirty seven fractions. Among these, there were fourteen fractions of TME were classified according to their nature, being three proteins, two glycogen and nine glycoproteins. There were twenty-three fractions from TME, wich were classified according to their nature, being four proteins, nine glycogen and ten glycoproteins. Of the fractions purified in CFG from FTC and TME, eight presented phaseolin inducer potential (F17, F23, F25, F27, F31, F38 and F46). The 10 treatments consisted of the eight fractions and two controls: ASM and control (TAP). Treatments were applied in one of the primary leaves (treated leaf (TL)), and the other primary leaf was not treated (untreated leaf (UL)) to verify the systemic effect. Three leaf samples were taken for determination of enzymatic activity: before applying the fractions, after application of the fractions and after the pathogen inoculation. The defense enzyme analysis was performed for Peroxidase (POX), Polyphenoloxidase (PFO), Catalase (CAT), Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and β -1,3-glucanase (β -GASE). At the end, it was performed an evaluation of severity in the primary leaf of common bean, on the fifth day after inoculation. The in vivo test data were subjected to analysis of variance. The purification of samples from FTC and EXM of *T. longibrachiatum*, from IEC and GFC indicated fractions with the presence of eliciting molecules. The fractions F17, F23 and F25 from FTC and F27, F29, F31, F38 and F46 from EXM were able to induce phaseolin synthesis in common bean hypocotyls. The POX, PFO and β -GASE Increased when applied in the TL after application of the fractions and after inoculation of the pathogen. The fractions did not alter CAT and FAL enzymatic activity. The fractions F17, F23 and F27 reduced the anthracnose severity in the local effect.

Keywords: Ion exchange chromatography; gel filtration chromatography; *Phaseolus vulgaris* L.; induction of resistance; phytoalexin, *Colletotrichum lindemuthianum*.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Curva padrão para a determinação de massa molecular em coluna de filtração em gel (1,5 cm x 50,0 cm) de Sephacryl S-100-HR. Padrões moleculares: tireoglobulina (670 kDa), globulina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa). O volume vazio (V_0) da coluna foi determinado com azul de dextrana. Amostra de 1,5 mL eluídas em fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0). Frações coletadas de 1 mL, a um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. 39

Figura 2 - Curva padrão para a dosagem de carboidratos redutores através do método de Lever (1972).40

Figura 3 - Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976), utilizando reagente concentrado.41

Figura 4 - Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999).46

Figura 5 - Cromatografia de troca iônica a partir de filtrado de cultura de *Trichoderma longibrachiatum*. Uma amostra de 1,5 mL foi aplicada sob coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), sendo coletadas frações de 6 mL, num fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 a 100%) no mesmo tampão. Proteína (verde) foi determinada em 280 nm e carboidratos em 410 nm (azul) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (vermelho) foram determinadas por condutividade (mS cm^{-1}).47

Figura 6 - Cromatografia de troca iônica a partir de extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum*. Uma amostra de 1,5 mL foi aplicada sob coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), sendo coletadas frações de 6 mL, num fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 a 100%) no mesmo tampão. Proteína (verde) foi determinada em 280 nm e carboidratos em 410 nm (azul) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (vermelho) foram determinadas por condutividade (mS cm^{-1}).48

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Frações, natureza, teor de proteína total, teor de carboidrato e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro, tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica, a partir de filtrado de cultura e extrato de micélio de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	49
Tabela 2 - Cromatogramas de frações proteicas, glicídicas e glicoproteicas provenientes da cromatografia de troca iônica com suas correspondentes frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel, a partir de filtrado de cultura de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	51
Tabela 3 - Frações, natureza, teor de proteína total, massa molecular, teor de carboidrato e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro, tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel, a partir de filtrado de cultura de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	53
Tabela 4 - Cromatogramas de frações proteicas, glicídicas e glicoproteicas provenientes da cromatografia de troca iônica com suas correspondentes frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel, a partir de extrato de micélio de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	54
Tabela 5 – Frações, natureza, teor de proteína total, massa molecular, teor de carboidrato e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro, tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel, a partir de extrato de micélio de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	56
Tabela 6 - Atividade de peroxidase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).....	64
Tabela 7 - Atividade de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).....	66
Tabela 8 - Atividade de catalase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).....	67
Tabela 9 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).	68
Tabela 10 - Atividade de β -1,3 glucanase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).....	70
Tabela 11 - Severidade em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação em folha não tratada (FNT) e folha tratada (FT) de frações purificadas a partir de filtrado de cultura e extrato de micélio de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 CULTURA DO FEIJOEIRO (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	15
2.2 ANTRACNOSE - <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	16
2.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS	17
2.4 <i>Trichoderma</i>	19
2.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA	20
2.5.1 Mecanismos de Indução de Resistência	22
2.5.2 Fitoalexinas	24
2.5.3 Elicidores	26
2.5.4 Peroxidases (POX)	29
2.5.5 Polifenoloxidasas (PFO)	30
2.5.6 Catalase (CAT)	31
2.5.7 Fenilalanina amônia-liase (FAL)	31
2.5.8 β -1,3 glucanases (β -GASE)	32
2.6 MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA E CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 OBTENÇÃO DO ISOLADO DE <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	36
3.1.1 Obtenção do Filtrado de Cultura	36
3.1.2 Obtenção do Extrato de Micélio	37
3.2 OBTENÇÃO DO INÓCULO DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	37
3.3 CROMATOGRAFIA	37
3.3.1 Cromatografia de Troca Iônica	37
3.3.1.1 Separação de Frações a Partir de Filtrado de Cultura e Extrato de Micélio de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	37
3.3.2 Cromatografia de Filtração em Gel	38
3.3.2.1 Metodologia de Calibração da Coluna de Filtração em Gel	38
3.3.2.2 Separação de Frações a Partir de Filtrado de Cultura e Extrato de Micélio de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	39
3.5 AÇÚCARES REDUTORES	40
3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	40

3.7 BIOENSAIO PARA INDUÇÃO DE FITOALEXINAS EM HIPOCÓTILOS DE FEIJOEIRO..	41
3.9 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE FEIJOEIRO TRATADO COM FRAÇÕES DE FILTRADO DE CULTURA E EXTRATO DE MICÉLIO E <i>Trichoderma longibrachiatum</i> CONTRA ANTRACNOSE.....	42
3.9 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA.....	43
3.9.1 Obtenção dos Extratos Proteicos.....	43
3.9.2 Determinação de Proteínas Solúveis Totais.....	43
3.9.3 Atividade de Peroxidase.....	44
3.9.4 Atividade de Polifenoloxidase.....	44
3.9.5 Atividade de Catalase.....	44
3.9.6 Atividade de Fenilalanina Amônia-liase.....	45
3.9.7 Atividade de β -1,3-glucanase.....	45
3.10 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE	46
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	47
4.1.1 Frações Obtidas a Partir de Filtrado de Cultura de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	47
4.1.2 Frações Obtidas a Partir de Extrato de Micélio de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	49
4.1.3 Bioensaio De Fitoalexinas em Hipocótilos De Feijoeiro	49
4.2. CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL.....	50
4.2.1 Frações Obtidas a Partir de Filtrado de Cultura de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	50
4.2.2 Frações Obtidas a Partir de Extrato de Micélio de <i>Trichoderma longibrachiatum</i>	54
4.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE FEIJOEIRO TRATADO COM FRAÇÕES DE FILTRADO DE CUTURA E EXTRATO DE MICÉLIO DE <i>Trichoderma longibrachiatum</i> CONTRA ANTRACNOSE.....	64
4.3.1 Enzimas Relacionadas a Defesa de Plantas.....	64
4.3.1.1 Atividade de peroxidase.....	64
4.3.1.2 Atividade de polifenoloxidase.....	65
4.3.1.3 Atividade de catalase.....	66
4.3.1.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase.....	68
4.3.1.5 Atividade de β -1,3 glucanase.....	69
4.4 SEVERIDADE DA DOENÇA	71
4.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS.....	78

5. CONCLUSÃO	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos com sustentabilidade e a contribuição para o avanço de uma agricultura sustentável, torna-se atualmente um desafio para a agricultura, que é um dos principais pilares para a economia mundial. Além disso, o aumento expressivo a cada ano da cadeia produtiva, vem juntamente com o objetivo de produzir alimentos com menores níveis de resíduos químicos e maior qualidade do produto. Assim, a utilização do controle alternativo e/ou agentes de biocontrole nas lavouras, é uma alternativa que conseqüentemente, torna os alimentos cada vez mais saudáveis, visando diminuir riscos aos consumidores e ao ambiente (GONÇALVES-TREVISOLI, 2016).

Para tanto, uma das abordagens para o controle de doenças, consiste na ativação dos mecanismos de defesa inerentes às plantas, por meio da aplicação prévia de produtos bióticos (microrganismos viáveis ou inativados) ou abióticos, não tóxicos, que atuam como indutores de resistência (PASCHOLATI, 2011). Desta maneira, a indução de resistência de plantas a doenças, torna-se uma das ferramentas fundamentais que auxilia nas pesquisas que buscam o controle de doenças de plantas pela indução de resistência em culturas de interesse econômico (ANDRADE et al., 2013).

A indução de resistência pode ser ativada por moléculas eliciadoras, capazes de ativar mecanismos de defesa latentes existentes na planta contra subseqüentes infecções causadas por fitopatógenos (STANGARLIN et al., 1999). A utilização de moléculas eliciadoras representa uma abordagem eficiente para o aumento do metabolismo secundário. Estas moléculas podem ser endógenas ou exógenas, dependendo de como atuam na célula vegetal e de acordo com sua origem que podem se bióticas ou abióticas (DÖRNENBURG; KNORR 1995).

Segundo Pitta-Alvarez, Spollansky e Giulietti (2000), extratos de diversos microrganismos (fungos e bactérias fitopatogênicas) e moléculas sinalizadoras dos mecanismos de defesa das plantas (ácido jasmônico e ácido salicílico), bem como enzimas (celulase e pectinase), são considerados como eliciadores bióticos e como eliciadores abióticos, pode-se citar radiação ultravioleta, compostos químicos e metais pesados. Entre os mecanismos de defesa vegetal, as moléculas eliciadoras induzem respostas na planta, tal como a síntese de produção das fitoalexinas (HAHN, 1996), que são compostos biocidas que atuam na defesa bioquímica da planta contra os patógenos (MAZARO et al., 2013).

O gênero *Trichoderma* é um dos fungos mais pesquisados, pelo fato que, suas principais características são a capacidade para atuar como um agente de controle biológico contra microrganismos fitopatogênicos, tais como *Alternaria brassicicola* (AMIN et al., 2010),

Colletotrichum lindemuthianum (DILDEY, 2014; PEDRO et al., 2012), *Colletotrichum capsici* (AMIN et al., 2010); *Fusarium* sp. (HOFFMANN et al., 2015; HARMAN, 2004), *Fusarium solani* (LOUZADA et al., 2009), *Fusarium oxysporum* (AMIN et al., 2010); *Helminthosporium oryzae* (AMIN et al., 2010); *Macrophomina phaseolina* (BROETTO et al., 2014), *Pythium* spp. (ETHUR, 2006), *Rhizopus stolonifer* (BOMFIM et al., 2010); *Rhizoctonia solani* (MAYO et al., 2015; PINTO et al., 2014; AMIN et al., 2010), *Sclerotinia sclerotiorum* (ZHANG et al., 2016; DILDEY et al., 2014; AMIN et al., 2010), *Sclerotium rolfsii* (AMIN et al., 2010; ISAIAS et al., 2014) e *Verticillium dahliae* (ISAIAS et al., 2014) entre outros.

Pesquisando a correlação positiva no potencial de antagonismo contra *Sclerotinia sclerotiorum*, Dildey et al. (2014) testaram diferentes isolados do gênero *Trichoderma*, demonstrando efetividade no controle do patógeno considerando os métodos de confrontação direta e produção de metabólitos voláteis.

O papel de cada enzima do complexo enzimático produzidos pelas espécies de *Trichoderma* possui modo de ação diferenciado, sendo este modo, requerido para o máximo efeito antifúngico em diferentes patógenos (VITERBO et al., 2002), podendo haver a liberação de peptídeos com atividade de antibióticos. A ação sinérgica entre enzimas hidrolíticas e metabólitos secundários confere ao micoparasita um nível de antagonismo maior do que quando estes dois mecanismos agem separadamente (BENÍTEZ et al., 2004; XIAO-YAN et al., 2006).

A capacidade de moléculas eliciadoras provenientes da purificação do fungo *Trichoderma* na produção de fitoalexinas e indução de mecanismos de resistência nas plantas ainda é escasso. Sendo assim, a separação de moléculas eliciadoras, por cromatografia, tem como objetivo obter frações de caráter proteicos e glicídicos, concentrar o princípio ativo e caracteriza-las como sendo moléculas de potencial indutor de defesa vegetal.

O presente estudo teve por objetivo separar por cromatografia frações eliciadoras a partir de filtrado de cultura e extrato de micélio de *Trichoderma* e testá-las na indução de fitoalexina faseolina e com potencial indutor de resistência contra antracnose no feijoeiro.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

O feijoeiro é uma dicotiledônia originária das Américas, pertencente à família Leguminosae da ordem Rosales, gênero *Phaseolus*, espécie *vulgaris* L.. É uma planta herbácea e seu ciclo de vida anual varia de, aproximadamente 60 a 120 dias, dependendo das condições ambientais, época de plantio e do cultivar (SANTOS et al., 2015).

Seu cultivo é bem adaptado em regiões de áreas que tenham outonos e primaveras mais ou menos longos, suficientes para completar o seu ciclo, não se prestando aquelas onde o verão e o inverno são muito rigorosos. A temperatura média durante o ciclo da cultura na América Latina varia de 17 a 25 °C. A alta temperatura superior a 29 °C, pode ocasionar, dependendo do cultivar, diminuição da percentagem de flores e do número de sementes por vagem. Por outro lado, as baixas temperaturas são desfavoráveis ao crescimento e as geadas podem causar enormes danos a cultura (ANDRADE et al., 2015).

No Brasil o cultivo do feijão é bastante difundido em todo o território nacional, tendo importância principalmente no cultivo de pequenas propriedades. A produção nacional se concentra nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, sul e leste do Paraná, Rio de Janeiro, sudeste de Minas Gerais e sul do Espírito Santo. No último ano foram consumidas aproximadamente 300 mil toneladas além do produzido. Diante disso, a produção brasileira é insuficiente para abastecer o mercado interno, necessitando importação destes produtos de outros países como Argentina, Chile e México (EMBRAPA, 2017).

Segundo dados da CONAB (2017), na safra de 2015/16 a área total cultivada de feijão chegou a 2.8 milhões de hectares, com uma redução de 6,2% em relação à safra do ano anterior. A produção nacional de feijão deverá ficar entre 2.5 milhões de toneladas, cerca de 21,6% menor que a última safra. No Paraná, a produtividade apresentou variações na qualidade dos grãos, devido fatores climáticas adversos (estiagem, excesso de chuvas e geada), durante o desenvolvimento das plantas, partindo de 720,2 mil toneladas na safra 2014/15 para 588,6 mil toneladas na safra 2015/16, retração de 18,3% em relação à safra passada.

Em todas as regiões onde a cultura do feijoeiro é cultivada, a mesma pode ser afetada por inúmeros fatores, entre os principais estão, as doenças (causada por vírus, bactérias, fungos e nematoides), acidez do solo, disponibilidade hídrica, condição nutricional, ataque de insetos pragas. Esses são alguns fatores que afetam a redução da produtividade da cultura do feijoeiro (PAULA JÚNIOR et al., 2015).

2.2 ANTRACNOSE - *Colletotrichum lindemuthianum*

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Lams. – Scrib., é responsável pela antracnose do feijoeiro, uma das principais doenças que atinge a cultura. O fungo é hemibiotrófico intracelular e se reproduz assexuadamente. O fungo produz micélio septado e ramificado, com coloração hialina a quase negra, na medida de seu envelhecimento, os conídios são hialinos, unicelulares oblongos a cilíndricos com ambas extremidades arredondadas, ou uma delas pontiaguda, os conidióforos apresentam-se envolvidos por uma massa gelatinosa de cor salmão, ocre ou rosa, agregados em 30 a 50 conidióforos por acérvulo (PAULA JÚNIOR et al., 2015; MEDEIROS, 2004).

A antracnose é uma das principais doenças foliares fúngicas causadora de grandes prejuízos na cultura do feijoeiro. As condições meteorológicas ideais para o desenvolvimento da doença são temperaturas entre 15 a 25 °C e umidade relativa do ar acima de 95%, chuvas frequentes e de baixa intensidade. Temperaturas superiores a 30 °C e inferiores a 13 °C limitam o desenvolvimento da infecção. A esporulação é abundante nas vagens em temperaturas entre 14 e 18 °C. É transmitido principalmente pelas sementes e possui grande capacidade de sobrevivência em restos culturais infectados, favorecendo o ponto inicial de epidemias (SANSIGOLO, 2007; PAULA JÚNIOR et al., 2015).

O patógeno *C. lindemuthianum* pode desenvolver sintomas em todos os órgãos da parte aérea da planta, dependendo da intensidade da doença. A infecção pela semente pode apresentar lesões escuras de tamanhos variáveis, observado facilmente em sementes de tegumento claros. As lesões no caule e no pecíolo são deprimidas e escuras, podendo aprofundar-se no tecido infectado quando as condições são favoráveis. Nas folhas, os sintomas mais característicos surgem na face inferior e escurecimento ao longo das nervuras. Nas vagens são encontradas lesões com características arredondadas, inicialmente de coloração marrom-clara, evoluindo, posteriormente, para lesões deprimidas e escuras, com o centro mais claro. Em condições favoráveis, desenvolve no centro das lesões, uma coloração rósea, produção de uma massa de esporos do fungo (PAULA JÚNIOR et al., 2015).

A grande variabilidade da espécie do *C. lindemuthianum*, está relacionada ao fator limitante para o controle da antracnose no feijoeiro, devido a um grande número de raças. Já foram identificadas aproximadamente 114 raças, o Brasil apresenta mais de 50 raças. No entanto, os patótipos mais frequentes no Brasil são os identificados como 65, 73, 77, 81 e o 87,

encontrados principalmente nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Goiás e no Distrito Federal (PAULA JÚNIOR et al., 2015).

O uso de variedades resistentes é uma alternativa importante que contribui para redução de danos causados pelo patógeno. No entanto, a grande variabilidade patogênica apresentada pela espécie do fungo *C. lindemuthianum* dificulta a obtenção de variedades com resistência duráveis (DI PIERO; GARDA, 2008). Porém, algumas alternativas na agricultura como o controle alternativo e o controle biológico são promissores e de grande importância para manejo de fitopatógenos em diversas culturas.

Medidas complementares como, tratamento de semente com fungicida, remoção dos restos culturais e rotação de culturas utilizando espécies não hospedeiras como, a cultura do milho e a utilização de incorporação de agentes de controle biológico, podem apresentar resultados promissores no controle da antracnose do feijão (WENDLAND et al., 2016).

2.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS

Novas alternativas de controle de doenças tem substituído a utilização de químicos e contribuído para uma agricultura com potencial moderna e sustentável (BORSATO; DI PIERO; STADNIK, 2010), com intuito de proteger as plantas e manter um sistema de defesa de doenças menos dependente de agroquímicas (BALLARÉ, 2014). Para tanto, uma das perspectivas do controle alternativo é o controle biológico e a indução dos mecanismos de defesa das plantas (MORAES, 1992), além da utilização de extratos naturais que apresentam propriedades antimicrobianas ou indutoras de resistência para as plantas (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008).

O controle biológico tem por objetivo estabelecer uma relação entre plantas e organismos não patogênicos (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005). Nesse sentido, os princípios dos mecanismos de controle baseiam-se na relação antagônica que busca proteger as plantas e controlar os agentes fitopatogênicos com outros organismos vivos, o qual podem atuar por antibiose, amensalismo, parasitismo, competição, predação, hipovirulência, resistência induzida ou pela produção de metabólitos que inibem o desenvolvimento de outro microrganismo. Entre eles, o parasitismo parece ser o mecanismo mais eficiente de antagonismo, pois dependem dos seus hospedeiros para sobrevivência (GRIGOLETTI JUNIOR; SANTOS; AUER, 2000).

A resistência induzida pode ser definida com relação do mecanismo de resistência que permanecem inativos ou latentes nas plantas e são acionados ou ativados por moléculas

indutoras ou com potencial eliciador, que induzem a resistência das plantas em presença de agentes bióticos ou abióticos (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

A ativação dos mecanismos de defesa ocorre nos sítios de infecção, bem como, nas proximidades do local em que foi induzida (BARROS et al., 2010). Nos mecanismos de indução várias são as respostas de defesa que as plantas produzem, como a resposta de hipersensibilidade (FILIPPI; SILVA; PRABHU, 2007), síntese de fitoalexinas (ARRUDA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2007; STANGARLIN et al., 2010) atividade de lipoxigenases, peroxidases, fenilalanina amônia-liase, quitinases, β -1,3 glucanases e síntese de fenóis (ALMEIDA et al., 2012; CAVALCANTI; RESENDE; OLIVEIRA, 2007; GUIMARÃES et al., 2015; PASCHOLATI, 2011), síntese de proteínas relacionadas à patogênese (BARROS et al., 2010) e de espécies reativas de oxigênio (BALDO et al., 2011; WU; SHAN; HE, 2014).

Vários são os métodos alternativos de controle e entre os potenciais estão os metabólitos e polímeros como de estruturas celulares de *Saccharomyces boulardii* com atividade eliciadora na indução de fitoalexinas e deoxiantocianidinas em soja e sorgo, respectivamente (STANGARLIN et al., 2010). Arelado aos benefícios a saúde, ao ambiente e ao menor custo de tecnologia, os fungos do gênero *Trichoderma* são amplamente empregados no controle biológico. Nesse sentido, a espécie *Trichoderma atroviride* apresenta potencial para reduzir a severidade da Sigatoka negra em bananeira, cuja ação deste isolado exibe uma semelhança comparado ao fungicida azoxistrobina (CAVERO et al., 2015).

A utilização de extratos naturais e óleo essencial de folhas de pitanga (*Eugenia uniflora*) e fração flavonoide rutina, essas moléculas bioativas foram potenciais para redução da severidade de mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em plantas de feijoeiro comum estudadas por Marques (2014). Extratos naturais de plantas com potencial antimicrobiano e indutor de defesa das plantas também foram testados anteriormente por Stangarlin, Kuhn e Schwan-Estrada (2008).

Siddiqui et al. (2008) estudando a campo, o efeito sinérgico de extratos de palha de arroz e óleo de frutos de palma enriquecidos com *Trichoderma harzianum* sobre o fungo *Choanephora cucurbitarum* (podridão úmida) em plantas de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.), observaram uma redução de 85,04% de incidência da doença.

Com o intuito de reduzir as práticas decorrentes do uso de agroquímicos no manejo de doenças, são ainda recentes as estratégias alternativas que vêm sendo propostas. A corrida por uma produção de alimentos mais saudáveis e conservação dos recursos naturais é uma das principais preocupações atualmente. Matiello e Bonaldo (2013) ressaltam a importância dos

métodos de controle baseados na indução dos mecanismos de resistência em plantas com produtos naturais. Embora seja alvo de estudos, poucos são os agentes de controle biológico disponíveis no mercado.

Dessa forma, a capacidade de atuação em diferentes culturas e um amplo espectro de ação, contra diferentes patógenos (BETTIOL, 1991), resulta na produção de alimentos com maior segurança alimentar e produtos agrícolas com baixa toxicidade ao homem e animais, isentos de resíduos tóxicos (ALMEIDA et al., 2012).

2.4 *Trichoderma*

Trichoderma sp. são fungos encontrados naturalmente na microbiota em quase todos os tipos de solos, principalmente nos solos orgânicos, na rizosfera de plantas, vivendo saprofiticamente ou parasitando outros fungos, estando entre os fungos mais pesquisados na atualidade como agente de biocontrole, sendo antagonista a vários fitopatógenos em diferentes culturas (PINTO et al., 2014; AMIN et al., 2010; SANTOS, 2008).

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

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

Existe aproximadamente 328 espécies de *Trichoderma* já descritas (INDEX FUNGORUM, 2017), várias são as espécies do *Trichoderma* sp. consideradas eficientes antagonistas contra inúmeros fungos fitopatogênicos (BERNARDES; SILVEIRA; MESQUITA, 2010). A ação do *Trichoderma* sp. ocorre por diferentes meios de associação ou não de mecanismos que podem ocorrer simultaneamente, potencializando a ação antagônica (MORANDI; BETTIOL, 2009), dos quais, destacam-se: antibiose, competição e parasitismo. Essa interação se inicia com a colonização da superfície externa das raízes e pode ser restrita ou ocorrer por todo o rizoplane, seguida da produção de celulasas (AHMAD; BAKER, 1987; KERSHAM; TALBOT, 1998), produção de diversas substâncias tóxicas, metabólitos voláteis e não voláteis, como os ácidos harziânico e heptelídico, enzimas tais como alameticinas, tricholinas, glisopreninas, compostos como pironas, terpenóides, esteroides (REINO et al.,

2008), gliotoxinas, gliovirinas (PATRON et al., 2007) e alguns peptídeos antibióticos, conhecidos como “peptaibols” (DANIEL; RODRIGUES FILHO, 2007). Peptaibols estão incluídos em uma classe de compostos chamados peptaibiotics. São definidos como peptídeos derivados do metabolismo secundário de fungos, consistindo de 4 a 21 resíduos de aminoácidos aproximadamente. Uma das suas principais características é a presença de aminoácidos não proteinogênicos como o ácido α -aminoisobutirato, isovalina, etilnorvalina e hidroxiprolina (STOPPACHER et al., 2013).

Diferentes espécies de *Trichoderma* estão associadas com o ecossistema radicular das plantas, por isso, além do controle biológico podem atuar também de forma semelhante aos fungos micorrízicos produzindo compostos metabólitos que podem estimular o crescimento e o mecanismo de defesa das plantas (BENÍTEZ et al. 2004).

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

2.5 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

A indução de resistência pode ser designada como proteção local, isto é, a indução de resistência apenas nos tecidos tratados com o agente indutor, mas também pode indicar resistência sistêmica, manifestando-se em outro local diferente daquele onde foi aplicado o indutor (MORAES, 1992). Essa indução baseia-se na ativação de mecanismos de defesa, associada a expressão de um conjunto de genes de defesa, que visa restringir o crescimento e ou atividade do patógeno, bem como diminuir a incidência da doença, porém raramente a indução promove controle completo da doença (MÉTRAUX, 2001).

A resistência das plantas podem ocorrer através da ativação de genes que codificam diversas respostas e mecanismos de resistência induzida, aumentando o nível de resistência por meio da indução de mecanismos de resistência (PASCHOLATI, 2011). Tais sinais são traduzidos em respostas celulares, genes de defesa são ativados e como resultado ocorre a indução de síntese de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) (β -1,3-glucanases, quitinases e peroxidases) (OSSWALD et al., 2004), aumento na atividade de enzimas oxidativas e glicoproteínas ricas em hidroxiprolinas (PASCHOLATI, 2011), enzimas que participam na rota de síntese de fitoalexinas, acúmulo de lignina nos tecidos localizados

próximos ponto de infecção, além de polifenoloxidasas e peroxidases (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; RESENDE et al., 2007).

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

A indução de resistência na proteção das plantas apresenta duas definições: a Resistência Sistêmica Adquirida (RSA) e a Resistência Sistêmica Induzida (RSI) (PASCHOLATI et al., 2010). A expressão desta pode levar a planta a ter uma proteção local e/ou sistêmica e de longa duração (DURRANT; DONG, 2004), uma vez que em ambas, a planta tem seu mecanismo de defesa ativado quando tratadas com agentes indutores ou na presença do patógeno que leva a mesma a reconhecer o agente invasor (VALLAD; GOODMAN, 2004).

A indução da resistência sistêmica adquirida depende da rota do ácido salicílico como via de sinalização para a expressão de genes para sintetizar proteínas-RP, como β -1,3 glucanases, quitinases e peroxidases. A planta em exposição de agentes virulentos ou avirulentos e a indutores químicos induz a RSA, que será estabelecida somente após o intervalo de tempo necessário para acumular proteínas-RP (PASCHOLATI et al., 2010).

A indução da resistência sistêmica induzida, depende do ácido jasmônico e etileno como vias de sinalização, sem envolver a síntese de proteínas-RP. Neste caso, a resistência do hospedeiro está ligada através do intervalo de tempo entre o tratamento com o eliciador e a inoculação do patógeno, envolvendo a síntese e/ou acúmulo de substâncias específicas e metabólicas da planta (PASCHOLATI, 2003) e o agente indutor geralmente é um microrganismo não patogênico (BONALDO et al., 2004).

Quando a planta tem seus mecanismos de defesa induzidos, vários são os eventos ativados, dentre eles se destacam-se a síntese de metabólitos secundários tóxicos a fitopatógenos, espécies reativas de oxigênio, ativação de genes que codificam proteínas-RP, tais como as β -1,3 glucanases (β -GASE), quitinases e ativação de enzimas como as peroxidases

(POX). A resposta de hipersensibilidade (RH), que leva o aumento da concentração de fenilpropanóides, produtos do metabolismo como fitoalexinas, compostos fenólicos, fenilalanina amônia-liase (FAL), síntese de proteínas-RP e alterações estruturais como lignificação, deposição de calose e formações de papilas (CAVALCANTI et al., 2006).

2.5.1 Mecanismos de Indução de Resistência

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

A indução de resistência do hospedeiro em contato com um patógeno é um processo contínuo e está fundamentada na expressão gênica dos mecanismos de defesa da planta, uma vez que, a natureza é dinâmica e coordenada e o nível de resistência do vegetal depende da velocidade, magnitude e localização da área infectada (PASCHOLATI, 2011), além da influência dos hormônios vegetais e do tipo de interação planta-patógeno (BRODERSEN et al., 2006).

As plantas aparentemente se mostram indefesas ao ataque de agentes fitopatogênicos, porém elas respondem contra invasores por estratégias de defesa, ou seja, pelos mecanismos relacionados com a ativação de genes que são capazes de reconhecer um patógeno invasor (FERNANDES et al., 2009; WU; SHAN; HE, 2014). As plantas possuem a capacidade de percepção de eliciadores e/ou moléculas associadas ao reconhecimento de ataque de um fitopatógeno, sejam eles, fungos, bactérias, vírus, nematoides e/ou insetos, nos tecidos do vegetal (PASCHOLATI, 2011; TON et al., 2002).

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

- Pré-formados (passivos ou constitutivos):
 - Estruturais: cutícula, tricômas, estômatos e fibras/vasos condutores.
 - Bioquímicos: fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos sulfurados, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas e inibidores proteicos/ peptídeos.
- Pós-formados (ativos ou induzíveis):
 - Estruturais: papilas, halos, lignificação, camadas de cortiça, tiloses e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina.
 Bioquímicos: fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese e espécies reativas de oxigênio.

Os mecanismos de defesa das plantas após o reconhecer da presença do patógeno, são desencadeadas cascatas de sinalização e estímulos químicos ou físicos provenientes da ativação dos mecanismos de defesa contra a ação do fitopatógeno (CAVALCANTI et al., 2005). Esta percepção resulta na transdução de sinais, que corre quando moléculas eliciadoras se ligam às moléculas receptoras presentes na membrana da célula vegetal e as informações são translocadas entre essas células, ao passo que, mensageiros secundários são ativados e genes específicos relacionados a defesa são expressos (DE WIT, 2007; MÉTRAUX, 2001).

Essa expressão de genes, funciona como a produção de um sinal inicial, o qual promove alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças nas atividades enzimáticas nas células, tal como a fenilalanina amônia-liase, no metabolismo secundário, bem como enzimas relacionadas a produção de compostos de defesa como as peroxidases e enzimas relacionadas diretamente na atividade de lise de compostos ou estruturas do patógeno, como as β -1,3-glucanases e quitinases (CAVALCANTI et al., 2005).

A mudança no fluxo iônico na membrana plasmática, leva a geração de espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e radical superóxido), resultado de sinais que são liberados próximos as células infectadas (MÉTRAUX, 2001), a produção e acúmulo de compostos fenólicos (BARROS et al., 2010) e ativação de proteínas relacionadas à patogênese, como quitinase (ALMEIDA et al., 2012) e a β -1,3 glucanases presentes na parede celular de patógenos fúngico (WU; BRADFORD, 2003).

As proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) são responsáveis pela resposta de defesa vegetal a fitopatógenos, sendo encontradas em várias espécies de plantas vegetais e estão agrupadas em 17 famílias distintas, ocorrendo grandes mudanças quantitativas nos teores de proteína solúvel (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; CAVALCANTI, BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). Pode-se dizer que essas proteínas são induzíveis no hospedeiro constituindo de resposta à infecção por um patógeno ou um composto abiótico e estão

relacionadas com a resistência não específica do hospedeiro ao patógeno (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Outro mecanismo de resistência é a reação de hipersensibilidade, que consiste na formação de barreiras químicas alocadas no ponto de penetração, sendo um dos mais eficientes mecanismos de defesa de planta contra patógeno, neste processo são sintetizadas espécies reativas de oxigênio, acúmulo de compostos fenólicos e fitoalexinas, as quais impedem o desenvolvimento de atividade biológica, matando não somente o patógeno como a própria célula vegetal (PASCHOLATI, 2011).

A interação planta patógeno pode levar a expressão de diferentes isoformas de proteínas relacionadas à patogenicidade (ELVIRA et al.; 2008), e esta condição está relacionada a capacidade da planta em expressar seus genes de defesa (YANG et al., 2007). Deste modo, a expressão dos mecanismos de resistência da planta, como a síntese de enzimas de defesa, pode variar por fatores associados em função da espécie, tecido vegetal infectado, nutrição e o estágio fisiológico, temperatura, umidade relativa do ar e pH (ALMEIDA et al., 2012).

2.5.2 Fitoalexinas

No século IX as fitoalexinas (*phyton* = planta; *alexin* = composto repelente) foram descobertas e no século XX esta passou a ser estudada quanto a sua síntese e respostas de defesa em plantas resistentes e suscetíveis a patógenos (VIVANCO et al., 2005).

As fitoalexinas são metabólitos secundários sintetizadas pelas plantas, sendo caracterizadas como moléculas de baixa massa molecular e com atividade antimicrobiana, podem acumular-se dentro das células vivas, temporariamente, próximo ou no local dos sítios de infecção, como resposta de defesa das plantas a exposição de patógenos (JEANDET, 2015; BRAGA, 2008).

A literatura ressalta que fitoalexina é um dos principais mecanismos de defesa das plantas, pois está relacionada com a prevenção de organismos invasores. Várias são as fitoalexinas que foram isoladas como, pisatina em ervilha (HADWIGER; TANAKA, 2014), gliceolina em soja (NWACHUKWU et al., 2013), faseolina em feijão (MADAKBAŞ; AWALE; KELLY, 2014), flavonóides de arroz (HASEGAWA et al., 2014), as deoxiantocianidinas em sorgo e milho (MATIELLO et al., 2016; IBRAHEEM et al., 2015) e mais de 300 tipos foram caracterizadas em diferentes classes de compostos químicos, como cumarinas, diterpenos, flavonóides, luteolinidina, apigenidina e apigeninidina (JEANDET, 2015; CAVALCANTI et al., 2005). Em plantas de feijoeiro, a fitoalexina de maior relevância

na interação patógeno-planta é a faseolina, identificada pela primeira vez por Müller (1958), mas Durango et al. (2002) passaram a estudar e demonstrar o seu efeito no controle de fitopatógenos.

A indução da síntese de fitoalexinas pode ocorrer por ação de agentes bióticos ou abióticos, em que moléculas, denominadas de eliciadores, são capazes de ativar esse mecanismo de resistência (BONALDO et al., 2004). Entre essas moléculas destacam-se os carboidratos, proteínas, enzimas, lipídios, glicoproteínas, polipeptídeos (PASCHOLATI, 2011) oligossacarídeos, oligopeptídeos e ácidos graxos (STANGARLIN et al., 1999), os quais podem ser de origem microbiana (eliciador exógeno) ou da própria planta (eliciador endógeno) (BRAGA, 2008; PASCHOLATI, 2011).

O acúmulo desse metabólito secundário no interior da planta, é capaz de limitar o crescimento do patógeno em função da sua toxidez e além disso, pode induzir a respostas de hipersensibilidade no tecido infectado que culmina em lesão do tipo necrótica (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012). Segundo Pascholati (2011), o principal modo de ação das fitoalexinas está atrelado as alterações na membrana plasmática do patógeno que resulta em perda de eletrólitos, morte celular, perda da integridade estrutural e funcional da membrana.

Em fungos o seu modo de ação é caracterizado pela desorganização do conteúdo celular, granulação citoplasmática, ruptura da membrana plasmática, além da inibição da atividade enzimática fúngica, esses efeitos refletindo na germinação dos esporos e alongação do tubo germinativo, além da redução do crescimento micelial (STANGARLIN et al., 2011; BRAGA, 2008).

De acordo com a literatura, vários são os trabalhos que apontam a capacidade de plantas em produzir e acumular fitoalexinas como mecanismo de defesa vegetal. A exemplo disso é extrato de própolis testado em plantas de pepino no controle de ódio e avaliado quanto a capacidade indutora de fitoalexinas. Como resultado, verificaram que o extrato apontou potencial para o controle da doença, via aplicação preventiva na concentração de 8% (GUGINSKI-PIVA et al., 2015).

A produção de fitoalexina em sorgo foi reportado por Moura et al. (2014), que verificaram a presença de compostos ativos, em hidrolato de carqueja por meio da extração de óleo essencial, com potencial de atividade antibacteriana de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*, *Erwinia carotovora* e *Bacillus subtilis* pela síntese de fitoalexinas.

A caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* por cromatografia de filtração em gel e por cromatografia de camada delgada foi estudada por Moreira et al. (2008), na indução da fitoalexina em sorgo e soja. Para soja, as frações purificadas

não induziram gliceolina e apontam que, possivelmente, o método empregado não foi capaz de extrair as moléculas eliciadoras desta fitoalexina. Para tanto, ao testar em sorgo, houve indução da deoxiantocianidine. Moreira et al. (2008) sugeriram ainda, sobre a necessidade de realizar novos estudos a fim de avaliar o potencial das frações, bem com a caracterização de moléculas eliciadoras presente nas mesmas.

Simões et al. (2005) descreveram a presença de fragmentos de polissacarídeo do tipo mucorano em esporos do fungo sapróbio *Mucor ramosissimus*, atuando como eliciadores na indução e acúmulo de fitoalexinas em soja. Entre estes estudos estão os de Beninca et al. (2008) que observaram a capacidade indutora de fitoalexina em soja e sorgo a partir de extratos aquosos dos basidiocarpos de *Agaricus blazei*, *Lentinula edodes* e *Pycnoporus sanguineus*. Arruda et al. (2012) estudaram o efeito de extrato de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio na soja e verificaram que, na concentração de 10% e 1% o extrato *A. blazei* induziu o maior acúmulo de gliceolina nos cotilédones da planta, ao passo que para os extratos de *L. edodes* e *P. sanguineus* a atividade indutora ocorreu a 2%.

Extratos de basidiocarpos de *P. sanguineus* obtidos com solventes orgânicos foram testados quanto a atividade indutora de fitoalexina. Beninca et al. (2008) verificaram que o extrato diclorometânico, hexânico e etanólico não induziram fitoalexinas em cotilédones de soja, mas sim a síntese de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo. Ruocco et al. (2015) purificaram uma proteína de 8 kDa (HYTLO1) do filtrado de cultura pura de *Trichoderma longibrachiatum*, pela metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida e a injeção foliar desta proteína induziu a ativação de várias respostas de defesa, entre elas a fitoalexina rishitin, proteínas relacionadas a patogênese, espécies reativas de oxigênio, superóxido dismutase e oxilipina.

2.5.3 Eliciadores

Os eliciadores são designados como moléculas capazes de induzir qualquer resposta de defesa em plantas, seja celular, como resposta de hipersensibilidade (HR) e/ou molecular, como a ativação de genes de defesa (DIXON; HARRISON; LAMB, 1994). Para tanto os eliciadores passaram a ser utilizados como tratamentos ou compostos capazes de influenciar na síntese e alterar as rotas metabólicas e moleculares em plantas (XU et al., 2008).

Para Kamoun (2006), os eliciadores podem ser definidos como moléculas de agentes patogênicos que sinalizam respostas de defesa nas plantas e com esse resultado, aumentam a resistência contra patógenos invasores. Suas funções são determinadas por várias características

estruturais, além de exibirem uma ampla natureza química (BONALDO et al., 2004). Resende et al. (2007), as definem como sendo moléculas capazes de induzirem a produção de fitoalexinas e de várias proteínas-RPs.

A capacidade da planta em expressar suas respostas de defesa contra agentes patogênicos, consiste do tratamento com eliciadores, que podem ser classificados de origem abióticas e bióticas. Por sua vez, a origem abiótica, pode-se incluir a luz ultravioleta e metal pesado (HgCl_2), que são agentes que induzem estresse nas plantas (PASCHOLATI, 2011; ZANARDO; PASCHOLATI; FIALHO, 2009), íons metálicos, moléculas orgânicas como Acibenzolar-S-Metil (ASM) (MÉTRAUX, 2007), temperatura, ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (RESENDE et al., 2007). Em relação aos agentes bióticos, esses são classificados como microrganismos viáveis ou inativados, ou mesmo seus metabólitos produzidos (PASCHOLATI, 2011).

Os eliciadores bióticos endógenos são de origem vegetal, que são moléculas produzidas e liberadas pela própria planta durante os eventos da interação patógeno-hospedeiro, tal como oligogalacturonídeos e outros oligômeros da parede celular (PASCHOLATI, 2011). Os eliciadores de origem microbiana, são conhecidos como exógenos, produzidos ou liberados pelos patógenos, sendo fragmentos de parede celular que pertencem a diferentes classes químicas como, polímeros de carboidratos, glicoproteínas, oligopeptídeos, lipopolissacarídeos peptídeos, proteínas, lipídios e ácidos graxos (PASCHOLATI, 2011).

Quando reconhecidos pelos receptores, os eliciadores desencadeiam respostas de defesa nas células das plantas que culminam síntese e o acúmulo de metabólitos secundários (fitoalexinas e compostos fenólicos), glicoproteína rica em hidroxiprolina, ativação de rotas do metabolismo secundários (ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno) que atuam como sinalizadores para a expressão de proteínas-RP (DURRANT; DONG, 2004; JALALI; BHARGAVA; KAMBLE, 2006), abertura de canais de íons, ativação de quinases no citoplasma, acidificação do citoplasma, alteração nos níveis de cálcio do citoplasma, cascata de sinalização via MAP-quinases, deposição de calose e lignificação de tecidos, como reforços da parede celular e resposta de hipersensibilidade (GRANT; LAMB, 2006). Outros mecanismos podem ser ativados pelos eliciadores, como a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-), os quais causam danos a nível celular (MARCHESE et al., 2008).

Os eliciadores estimulam os mecanismos de defesa da planta, de modo que na presença do patógeno as respostas a esta condição são mais rápidas e intensas, pois o reconhecimento do eliciador desencadeia uma completa cascata de sinalizações que ativam o sistema de defesa do

vegetal (LATIF et al., 2014). Segundo Walters et al. (2005), muitos dos eliciadores estudados tem um amplo espectro de indução de resistência de tempo prolongado, embora existam aqueles de efeito temporário. Essa característica irá depender da relação entre planta, patógeno e ambiente (LATIF et al., 2014).

As plantas desenvolveram mecanismos capazes de reconhecer quanto a presença de um microrganismo nos seus tecidos, processo adquirido durante sua evolução (GASSMANN; BHATTACHARJEE, 2012). Nesse processo, o reconhecimento está envolvido nos padrões moleculares associados aos microrganismos (MAMPs - *Microbe-Associated Molecular Pattern*) e patógenos (PAMPs - *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (NEWMAN et al., 2013). Os MAMPs ou PAMPs são moléculas que atuam como eliciadores de defesa vegetal (MITHÖFER; BOLAND, 2008), presentes na membrana celular ou no interior da célula, o reconhecimento destas moléculas ocorre pelos receptores, sendo normalmente proteínas transmembranas (BECK et al., 2012).

O metabolismo da planta hospedeira pode passar por rápidas alterações quando os PAMPs são reconhecidos por seus receptores, a exemplo disso, os PAMPs exibem função na indução de defesa em plantas, são a ativação de β -glucanas, ergosterol e quitina, (HE; SHAN; SHEEN, 2007), elicinas, flagelina, fucanas sulfatados, glicoproteínas, invertase, proteínas indutoras de necrose, transglutaminase e xilanase (NURNBERGER; LIPKA, 2005).

Uma das características comum das respostas da resistência induzida por microrganismos é o *priming*. Esta é uma condição na qual as plantas tratadas com um determinado eliciador tornam-se preparada a ativar as respostas de defesa mais rapidamente, quando expostos ao ataque de patógenos em comparação com as plantas não tratadas (CONRATH, 2011). O efeito do *priming* pode ser alcançado tanto por microrganismos ou por tratamento de compostos naturais e sintéticos (GOELLNER; CONRATH, 2008). O *priming* é uma alternativa a ativação da resistência induzida de longa duração, pois atenua os mecanismos de resistência através da modulação da “memória imunológica” das plantas. Visto que os recursos para a defesa não estão comprometidos até que a ameaça de nova infecção retorne, o *priming* é considerado um mecanismo de “custo” relativamente baixo no avanço para a defesa da planta (CONRATH, 2011; MEIRELLES, 2014).

Um exemplo de eliciadores de grande relevância para estudos de indução dos mecanismos de resistência de plantas é a proteína harpina, sintetizada por bactérias e utilizada como eliciador comercial, apresentando a capacidade de ativar a síntese de moléculas sinalizadoras, como o ácido salicílico, ácido jasmônico e o etileno (CLARKE et al., 2005).

Com objetivo de aprimorar os sistemas de cultivo por estratégias alternativas e mais sustentáveis economicamente, além de minimizar o uso de insumos químicos no controle de doenças em plantas de soja e feijoeiro, Gonçalves-Trevisoli et al. (2016), purificando 63 frações eliciadoras a partir de fêmeas de nematoides *Meloidogyne javanica* em cromatografia de filtração em gel (CFG) concluíram que, oito das frações obtidas apresentaram potencial de efeito indutor na produção de fitoalexinas faseolina, enquanto quinze frações apresentaram efeito indutor de fitoalexinas gliceolina. Os autores relatam que as frações que não influenciaram na indução de fitoalexinas na planta, acredita-se que há a necessidade de algumas dessas moléculas estarem atuando em conjunto e/ou agem separadamente, de modo para haver efeito eliciador e assim induzir a resposta de defesa no vegetal.

2.5.4 Peroxidases (POX)

A enzima peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) e suas isoformas a qual está presente nos tecidos das plantas, em determinadas células animais e em microrganismos participam de vários processos fisiológicos de grande importância, pela sua participação na hipersensibilidade, suberização, metabolismo de parede celular e produção de fitoalexinas, catalisando a oxidação e eventual polimerização de álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio originando lignina, importante mecanismo físico de defesa vegetal (STANGARLIN et al, 2011; GASPAR et al., 1982).

A POX está envolvida em diversas reações, entre elas, ligações de polissacarídeos, ligações de monômeros, lignificação, oxidação de ácido indol-3-acético, oxidação de fenóis, cicatrização de ferimentos, defesa contra patógenos e regulação da elongação de células entre outras (HSU; KAO, 2003). Além disso, as POX têm sido relacionadas à uma variedade de processos envolvidos na defesa, cujo interesse maior envolve o papel que elas desempenham no bloqueio de um patógeno (ALAMGRO, et al., 2009; PASCHOLATI et al, 2008).

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

aumento da resistência das paredes à difusão de toxinas produzidas pelo patógeno, impedindo que nutrientes do hospedeiro sejam utilizados pelo invasor (PASCHOLATI, 2011).

2.5.5 Polifenoloxidasas (PFO)

A polifenoloxidase (PFO, EC 1.14.18.1) é uma enzima que contém em sua estrutura o cobre como grupo prostético e possui o oxigênio molecular como co-substrato. As PFOs agrupam um conjunto de enzimas responsáveis pela catálise da reação de oxidação de polifenóis (*o*-difenois) transformando-os em quinonas (*o*-quinonas) constituindo uma atividade de difenolase (QUEIROZ et al, 2008). Porém, em algumas plantas, essas enzimas podem também catalizar a *o*-hidroxilação de monofenóis, constituindo atividade de monofenolase. São também referidas na literatura como fenol oxidases, catecolases, fenolases, catecol oxidases ou tirosinases (OKOT-KOTBER et al., 2002; MAYER; HAREL, 1979).

Existem quatro mecanismos potenciais pelos quais o PPO pode inibir agentes invasores patogênicos que incluem a toxicidade e atividade antimicrobiana de produtos de quinona, redução da biodisponibilidade de proteínas e nutrientes, criação de barreiras físicas similares à lignina e participação na produção de espécies reativas de oxigênio (FUERST et al., 2014).

Nas plantas, as PFOs estão envolvidas no desenvolvimento de necrose em torno de superfícies de folha danificadas, nos mecanismos de defesa contra o ataque de insetos e patógenos (AYDEMIR, 2004; AL-JASSABI, 2013), reações de imunidade, biossíntese de componentes da planta, eliminação de radicais livres de tecidos fotossintetizantes, controle dos níveis de oxigênio no cloroplasto e síntese de compostos fenólicos (FUERST et al., 2014). Os compostos fenólicos podem agir através da inibição de crescimento bacteriano ou servir como precursores na formação de barreiras físicas, limitando translocação do patógeno (AYDEMIR, 2004).

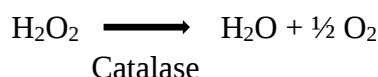
A PFO geralmente é abundante em tecidos infectados e tem grande importância para as plantas, com envolvimento nos mecanismos de defesa ou na senescência. A importância da atividade das PFOs na resistência a doenças, provavelmente, deve-se à sua propriedade em oxidar compostos fenólicos para quinonas, os quais são muito mais tóxicos aos microrganismos do que o fenol original. Por esta razão, o aumento na atividade das PFO resulta em altas concentrações de produtos tóxicos de oxidação, portanto, maior nível de resistência à infecção (FUERST et al., 2014; AGRIOS, 2005).

As PFO e POX lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximos ao local da descompartimentalização celular provocada por patógenos. A PFO está diretamente

envolvida no processo de escurecimento em alimentos, principalmente em frutas e hortaliças, durante o processamento e armazenamento (CARNEIRO, 2003).

2.5.6 Catalase (CAT)

Entre as enzimas antioxidantes, a Catalase (CAT, EC. 1.11.1.6), que foi a primeira enzima a ser descoberta e caracterizada (SHARMA et al., 2012), tem sido associada, principalmente, à remoção de H_2O_2 de peroxissomos, convertendo-o em H_2O e O_2 (RESENDE et al., 2003). Possui o mais alto número de turnover (K_{cat}) conhecido em enzimas, de modo que uma molécula pode catalisar a decomposição de até 40.000.000 moléculas de peróxido de hidrogênio. A CAT uma hemoproteína altamente específica, transforma o peróxido de hidrogênio em água (BROETTO, 2014):



O H_2O_2 está relacionado à inúmeras condições de estresse da planta (SHARMA et al., 2012). Enquanto as células das plantas estão gerando H_2O_2 através de processos catabólicos, a CAT é capaz de degradá-lo de forma eficiente em termos energéticos, visto que não requer o uso de qualquer poder redutor, resultando em um ganho líquido de energia celular (MALLICK; MOHN, 2000). Portanto, em suma, as CATs funcionam como um canal de limpeza do H_2O_2 celular (BREUSEGEM et al., 2001).

Todas as espécies de angiospermas já estudadas possuem três tipos de CAT (SHARMA et al., 2012). Sendo assim, para melhor compreensão e estudo, Willekens et al. (1997) propuseram uma classificação para as mesmas: CATs da classe 1 são expressas em tecidos fotossintéticos e reguladas pela luz, nos quais removem o H_2O_2 produzido durante a fotorespiração; CATs da classe 2 são produzidas em níveis elevados nos tecidos vasculares e podem exercer uma função de lignificação mas, sua exata função biológica permanece desconhecida; e na classe 3 estão as CATs presentes abundantemente em sementes e plantas jovens, cuja atividade está relacionada à remoção do H_2O_2 produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma.

2.5.7 Fenilalanina amônia-liase (FAL)

Estando relacionada ao sistema de defesa das plantas, a fenilalanina amônia-liase (FAL, EC 4.3.1.5) é a enzima chave do metabolismo dos fenilpropanóides na grande maioria das

plantas, devido do seu importante papel nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos em resposta à infecção e à facilidade de preparação para os ensaios enzimáticos (STANGARLIN et al., 2011; STRACK, 1997).

A FAL é uma enzima que está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que a mesma catalisa é uma etapa reguladora importante no aumento da produção de compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Sua atividade pode ser induzida pela suplementação exógena de eliciadores como o ácido salicílico e o metil jasmonato (YAO; TIAN, 2005) e reguladora da biossíntese de fitoalexinas derivadas dos fenilpropanóides (PASCHOLATI, 2011).

A FAL é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido caféico, ácido ferúlico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, flavonoides e ligninas (PASCHOLATI, 2011; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

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

2.5.8 β -1,3 glucanases (β -GASE)

As β -1,3 glucanases (β -GASE, EC 3.2.1.39), pertencentes à família PR-2 das proteínas-RP, atuam na ação catalítica da hidrólise do polímero β -1,3-glucana. Em plantas essa ação se torna importante, pois durante a invasão fúngica, ataca diretamente a estrutura da parede celular do patógeno degradando β -1,3-glucana, principal componente estrutural das paredes celulares dos fungos (PANG et al., 2004; PASCHOLATI, 2011).

As β -GASE são compostas por monômeros com massa molecular entre 25 a 35 kDa e que produzem oligômeros com 2-6 unidades de glicose a partir do substrato laminarina (uma β -1,3-glucana). Exibem formas básicas, que ocorrem normalmente intracelularmente (nos vacúolos), e ácidas, que ocorrem extracelularmente e possuem ação imediata na defesa das plantas, pela ação direta nas hifas invasoras (STANGARLIN et al., 2011; MARTINS, 2008).

São enzimas líticas que hidrolisam a quitina (um polímero de N-acetilglucosamina) e as β -1,3-glucanas. Essas hidrolases são encontradas normalmente em tecidos vegetais e estão principalmente envolvidas na defesa das plantas contra os fungos, uma vez que são constituintes da parede celular fúngica. A atividade destas enzimas pode ser desencadeada em resposta a

infecção de patógeno, metabólitos provenientes de microrganismos ou substâncias químicas que agem como indutores de resistência (PASCHOLATI, 2011).

Juntamente com quitinase, as β -GASE representam hidrolases antifúngicas, as quais atuam sinergisticamente, causando lise da hifa e inibindo o crescimento de fungos patogênicos. Além disso, β -GASE liberam fragmentos glicosídicos, tanto do patógeno, quanto da própria parede celular da planta, os quais podem atuar como eliciadores de defesas do hospedeiro (STANGARLIN et al., 2011; MARTINS, 2008).

2.6 MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA E CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL

O termo cromatografia surgiu das palavras gregas *chrom* (cor) e *grafe* (escrever) e foi estudado em 1906 pelo botânico Mikhail Semenovitch Tswett, considerado hoje, como pai da cromatografia. Com o avanço tecnológico e o potencial da técnica, a cromatografia se difundiu em várias áreas de estudo. Tswett contribuiu com o desenvolvimento do método ao descrever a separação de componentes de extratos de folhas, utilizando colunas de vidro preenchidas com carbonato de cálcio (fase estacionária) e o éter de petróleo como eluente (fase móvel) (COLLINS, 2006; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). Como resultado da purificação, Tswett observou bandas coloridas separadas ao longo da coluna, formados no adsorvente e eluídos em velocidades diferentes, para assim ocorrer a separação dos componentes (ETTRE, 2003).

A técnica cromatográfica pode ser classificada por critérios de:

1) Classificação pela forma física do sistema cromatográfico: pode ser dividida em cromatografia de coluna ou planar;

2) Classificação pela fase móvel empregada: caracterizada pela cromatografia gasosa, supercrítica e a líquida. A cromatografia líquida pode ainda ser subdividida em a cromatografia líquida clássica (CLC), de modo que, a fase móvel é arrastada ao longo da coluna apenas pela força da gravidade e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), onde se utilizam fases estacionárias de partículas menores e com auxílio de uma bomba de alta pressão a fase móvel é eluída;

3) Classificação pela fase estacionária utilizada: são utilizadas fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas;

4) Classificação pelo método de separação: destacam-se os métodos de adsorção, partição, troca iônica e exclusão molecular (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

A cromatografia é considerada como uma ferramenta analítica baseada na separação de moléculas e que engloba um conjunto de métodos físico-químicos que visam separar diferentes componentes de uma amostra (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998). A técnica de cromatografia se destaca por ser um método de análise de fácil separação, identificação e quantificação das diversas espécies químicas presentes nos componentes de uma mistura (COLLINS, 2006).

A separação dos componentes de uma mistura está fundamentada na sua migração, que envolve a interação destas com duas fases que estão em íntimo contato. A fase móvel pode ser uma solução de tampão fosfato, tris, borato, citrato, entre outras, eluídas por uma coluna em fluxo contínuo, sendo monitorada por um detector de luz ultra-violeta (UV). Para a purificação de proteínas e ácidos nucleicos existe um comprimento de onda já definido, sendo 280 nm e 260 nm, respectivamente. A coluna preenchida por uma matriz sólida e porosa é chamada de fase estacionária, cujo papel é retardar a passagem dos componentes, resultando em diferentes velocidades de migração das moléculas carregadas pela fase móvel (COLLINS, 2006).

Dentro da cromatografia líquida destaca-se a cromatografia de troca iônica, que foi registrada na literatura, pela primeira vez, pelos químicos Way e Thompson em 1850, a partir de observações feitas sobre a capacidade do solo em remover íons de amônia e de potássio (SPADARO, 2006). A sua fase estacionária possui trocadores aniônicos, com sítios carregados positivamente, retendo ânions e os trocadores catiônicos, carregados negativamente e retendo cátions. As proteínas, bem como outras moléculas, se ligam aos trocadores de cátions e ânions de acordo com a sua afinidade. A variação das cargas dos polímeros que apresentam em sua estrutura ácido-base são dependentes do pH, o qual pode influenciar na separação de uma proteína pelas diferenças de afinidade entre os trocadores de íons. No processo de eluição, a fase móvel carrega primeiramente as proteínas que tem baixa afinidade pelo trocador de íons e o eluato é obtido primeiro, ao contrário das proteínas de maior afinidade em que sua separação é retardada pela interação com o trocador (fase estacionária). Por sua vez, as proteínas que ficaram adsorvidas à resina são eluídas através de um gradiente contínuo de concentração de sal, melhorando a purificação das proteínas (SPADARO, 2006).

A cromatografia de filtração em gel, chamada também de exclusão molecular, separa as moléculas de acordo com o seu volume hidrodinâmico e massa molar. A fase estacionária se caracteriza por ser inerte e apresenta características que definem a distribuição e a velocidade de separação das substâncias. A matriz (fase estacionária), por onde a fase móvel é eluída, é formada de poros que interagem com a distribuição das partículas, pois aquelas de maior tamanho migram com velocidade superior e são separadas primeiro, ao ser comparada às de menor tamanho. Isso ocorre porque as moléculas de menor massa molecular penetram nos poros

e percorrem um caminho maior pela fase estacionária, de maneira que moléculas de maior massa levam um tempo maior para ser detectada pela UV (ROTHSCHILD, 2006).

Dada sua importância, vários são os trabalhos reportados na literatura, cujo método empregado na purificação de molécula foi a cromatografia. Meinerz et al. (2014) purificaram e selecionaram frações de extrato bruto de folhas da planta *Adiantum capillus-veneris*, por precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de filtração em gel e verificaram a capacidade das mesmas na síntese de fitoalexinas deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo. Gonçalves et al. (2014) testaram a metodologia de purificação de moléculas de caráter eliciador, a partir de fêmeas de nematoides fitopatogênicos por cromatografia de filtração em gel.

Di Piero, Wulff e Pascholati (2006) utilizaram cromatografia de troca iônica para obter frações do fungo shiitake (*Lentinula edodes*) e avaliaram a atividade de peroxidase no controle de *Colletotrichum lagenarium* em mudas de pepino. Bonaldo e Pascholati (2007) purificaram frações de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliaram sua influência na germinação de conídios e formação de apressórios de *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. Já Iurkiv (2009), avaliou a purificação parcial de compostos a partir *Pycnoporus sanguineus* por cromatografia de troca iônica e de exclusão molecular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO ISOLADO DE *Trichoderma longibrachiatum*

O isolado de *Trichoderma* utilizado para o estudo é pertencente a coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* de Marechal Cândido Rondon, PR. O isolado selecionado para o trabalho possui característica de produção de substância secundária de cor amarelada no meio de cultura. O isolado de *Trichoderma* está identificado como TOD2B da espécie *Trichoderma longibrachiatum* (DILDEY et al., 2016).

3.1.1 Obtenção do Filtrado de Cultura

O filtrado de cultura (FTC) são metabólitos produzidos pela espécie *T. longibrachiatum* e podem ser chamados também de exsudatos ou filtrados fúngicos. O filtrado foi produzido em 200 mL de meio de cultura líquido BD (Batata-Dextrose), conforme descrito por Mello et al. (2007). Dois discos de meio BDA (5 mm de diâmetro) contendo micélio com esporos e hifas do *T. longibrachiatum* foi adicionado em Erlenmeyer (500 mL). Em seguida, transferidos em agitador orbital constantemente a 180 rpm em temperatura de 25 °C, em fotoperíodo de 12 horas.

Após 12 dias de cultivo em agitação, a cultura foi filtrada em gaze, em seguida em papel de filtro qualitativo Whatman nº 1 (11 µm de diâmetro de poro), com auxílio de bomba a vácuo, para retirada de hifas e esporos da solução e em seguida armazenado e congelado a -20 °C.

Foi utilizado para a purificação 20 mL de filtrado de cultura (FTC) de *T. longibrachiatum*, o mesmo foi concentrado em polietilenoglicol 20'000 em membrana de diálise (limite de exclusão molecular de 12-16 kDa). Posteriormente, a alíquota obtida na concentração foi ajustada para um volume final de 3 mL com tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0). Em seguida foi filtrado em membrana Millipore 0,45 µm diâmetro e armazenado em tubo de microcentrífuga, sendo congelado a -20 °C para posterior utilização.

3.1.2 Obtenção do Extrato de Micélio

O extrato de micélio (EXM) do isolado de *T. longibrachiatum* foi obtido a partir de colônias com sete dias de crescimento em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agár), essas mantidas em câmara de crescimento (BOD), em temperatura de 25 ± 2 °C no escuro (DILDEY et al., 2016).

Após os sete dias de crescimento, foi retirado da placa de Petri com auxílio de pinça, três gramas de micélio contendo hifas e esporos do *T. longibrachiatum*. Posteriormente foi macerada mecanicamente e homogeneizada em 6 mL de Tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) com auxílio de almofariz de porcelana e pistilo. A mistura foi centrifugada a 20.000g durante 25 min a 4 °C. O sobrenadante foi considerado como extrato de micélio do isolado de *T. longibrachiatum*.

O extrato de micélio (EXM) utilizado para a purificação foi concentrado em polietilenoglicol 20'000 em membrana de diálise (limite de exclusão molecular de 12-16 kDa). A alíquota obtida na concentração foi ajustada para um volume final de 3 mL com tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0). Em seguida foi filtrado em membrana Millipore 0,45 µm de diâmetro. Posteriormente, armazenado em tubo de microcentrífuga e congelado a -20 °C para posterior utilização.

3.2 OBTENÇÃO DO INÓCULO DE *Colletotrichum lindemuthianum*

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

3.3 CROMATOGRAFIA

3.3.1 Cromatografia de Troca Iônica

3.3.1.1 Separação de Frações a Partir de Filtrado de Cultura e Extrato de Micélio de *Trichoderma longibrachiatum*

A separação por cromatografia de troca iônica (CTI) foi realizada em coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) (fase estacionária) (GONÇALVES-TREVISOLI, 2016), e equilibrada com o

tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) (fase líquida) (CELESTINO; FERREIRA FILHO, 2005).

Uma amostra de 1,5 mL da preparação (FTC/EXM) foi aplicada e eluída com o tampão de equilíbrio, com fluxo de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, sendo coletadas frações de 6 mL. Após a saída do material não adsorvido, o material retido foi deslocado por gradiente linear de NaCl, no tampão de equilíbrio, nas concentrações subsequentes de 0 a 100%, sendo que a determinação foi medida pela condutividade elétrica das frações eluídas em gradiente salino. O monitoramento das frações proteicas foi detectado em espectrofotômetro a 280 nm e a de carboidratos foi determinado segundo o método descrito por Lever (1972). As frações foram reunidas de acordo com o perfil de distribuição de proteínas e de carboidratos.

Para a eliminação do NaCl, as frações foram dialisadas em membrana de limite de exclusão molecular de 12-16 kDa contra polietilenoglicol 20'000 em água destilada em um volume de 4 L a 4 °C, com 6 horas de intervalo entre as trocas de água (três trocas) (FRANZENER, 2011). As frações eluídas somente em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) também foram concentradas nas membranas de diálise. As alíquotas das frações obtidas foram ajustadas para um volume final de 3 mL com tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0). O tampão de equilíbrio foi deaerado por bomba de vácuo antes de ser eluído pela coluna.

Deste perfil de eluição foram obtidas um total de seis frações para FTC e seis frações para EXM, que foram testadas quanto à capacidade de induzir as fitoalexinas de faseolina em hipocótilos de feijão, respectivamente.

3.3.2 Cromatografia de Filtração em Gel

3.3.2.1 Metodologia de Calibração da Coluna de Filtração em Gel

Para a calibração da coluna da cromatografia de filtração em gel (CFG) utilizou-se Blue Dextrana (2000 kDa) para determinar o *void volume* (V_0): 5 mg dissolvido em 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) (tampão de equilíbrio). O grupo de proteínas padrão utilizado foi: tireoglobulina (670 kDa), globulina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa), solubilizadas em 500 μL de tampão fosfato de sódio. Cerca de 250 μL deste homogeneizado, mais 1.250 μL de água destilada foram aplicadas sobre o leito da coluna e eluída com tampão de equilíbrio. A cromatografia das proteínas padrões foi realizada nas mesmas condições que a cromatografia das proteínas (mesmo fluxo, absorção ótica, tampão e coluna), conforme descrito a seguir (GONÇALVES et al., 2014).

3.3.2.2 Separação de Frações a Partir de Filtrado de Cultura e Extrato de Micélio de *Trichoderma longibrachiatum*

A separação por CFG foi realizada em coluna de vidro (1,5 cm x 50,0 cm) preenchida com Sephacryl S-100-HR (Sigma Aldrich), formando um gel sedimentado (fase estacionária). A coluna foi equilibrada (fase móvel) com tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) (CELESTINO; FERREIRA FILHO, 2005). Aplicou-se 1,5 mL das frações reunidas da CTI sobre o leito da coluna e eluiu-se com o tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), sendo coletadas frações de 1 mL, num fluxo de 0,5 mL min⁻¹ (GONÇALVES et al., 2014). As frações proteicas foram detectado em espectrofotômetro a 280 nm e a de carboidratos foi determinado segundo o método descrito por Lever (1972). As frações foram reunidas de acordo com o perfil de distribuição de proteínas e de carboidratos.

A massa molecular relativa de cada fração detectada foi estimada por uma curva de calibração. Para proteína a curva foi construída plotando-se em um gráfico o log das massas moleculares das proteínas e o quociente do volume de eluição dessas proteínas pelo “void volume” (Ve/Vo) ($y = 8867,4e^{-3,231x}$) (Figura 1). A curva padrão de açúcares redutores (glicose) foi obtida pelo método de Lever (1972) ($y = 0,0414x - 0,0297$) (Figura 1).

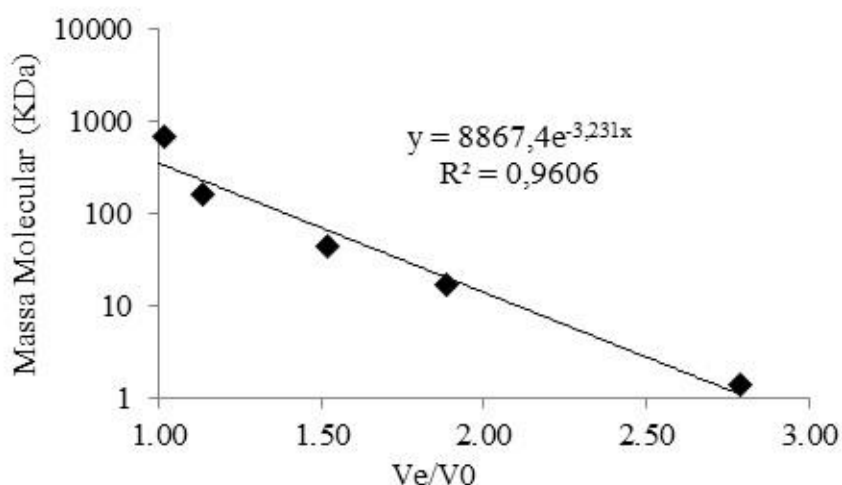


Figura 1 - Curva padrão para a determinação de massa molecular em coluna de filtração em gel (1,5 cm x 50,0 cm) de Sephacryl S-100-HR. Padrões moleculares: tireoglobulina (670 kDa), globulina (158 kDa), ovalbumina (44 kDa), mioglobina (17 kDa) e vitamina B12 (1,35 kDa). O volume vazio (Vo) da coluna foi determinado com azul de dextrana. Amostra de 1,5 mL eluídas em fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0). Frações coletadas de 1 mL, a um fluxo de 0,5 mL min⁻¹.

3.5 AÇÚCARES REDUTORES

O conteúdo de açúcares redutores foi determinado pelo método de Lever (1972). A reação envolveu a adição de 200 μL da amostra e 50 μL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), mais 750 μL de solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (PAHBAH) 0,5% (0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico diluída em 10 mL de HCl 0,5 M e acrescida de 40 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi mantida em banho maria a 100 °C durante 5 min e resfriada em banho de gelo. Para a calibração da amostra utilizou-se 500 μL do tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) mais 500 μL de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico. A leitura da absorbância foi realizada a 410 nm, em espectrofotômetro, descontando-se os valores de absorbância do branco. A quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se curva-padrão de concentrações de glicose, sendo: ($y = 0,0414x - 0,0297$) (Figura 2).

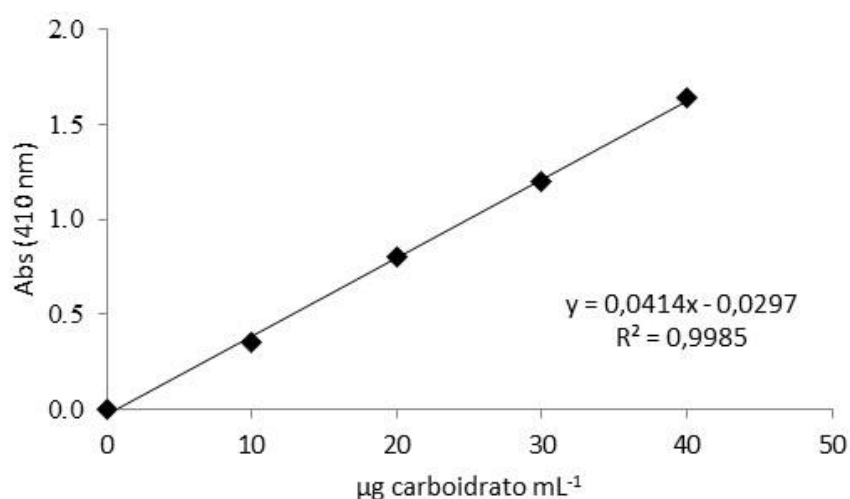


Figura 2 - Curva padrão para a dosagem de carboidratos redutores através do método de Lever (1972).

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A metodologia de Bradford (1976) foi empregada para a quantificação do teor totais de proteínas. Deste modo, foram homogeneizados 400 μL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), 400 μL da amostra de e 200 μL de reagente de Bradford. O reagente de Bradford foi preparado em um balão volumétrico adicionando-se 250 mg de corante azul de coomassie brilhante G-250, 125 mL de etanol P.A, 250 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e completado o volume com água destilada para 500 mL. Após adicionar o reagente sob agitação e incubar por 5 min, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro. Cada amostra foi

analisada em triplicata. A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína com base em albumina de soro bovino ($y = 0,0434x + 0,0431$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína (μg)) (Figura 3).

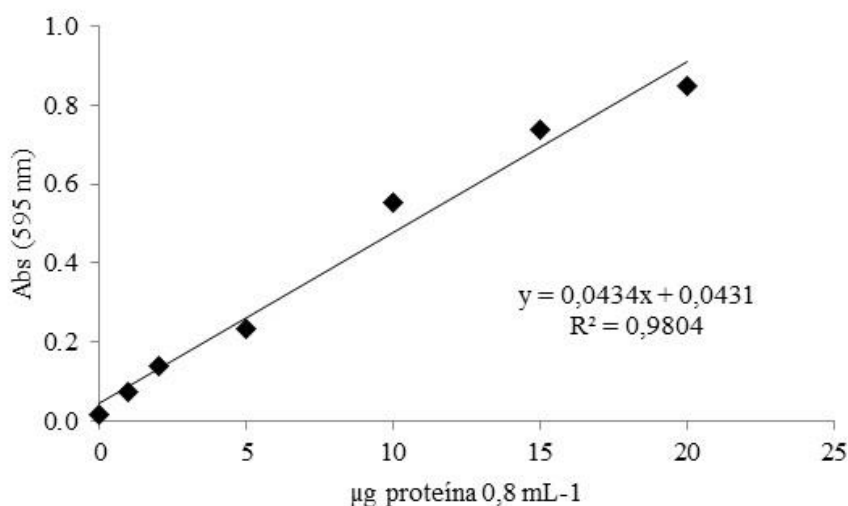


Figura 3 - Curva padrão para a dosagem de proteínas através do método de Bradford (1976), utilizando reagente concentrado.

3.7 BIOENSAIO PARA INDUÇÃO DE FITOALEXINAS EM HIPOCÓTILOS DE FEIJOEIRO

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar IPR-Colibri foram sanitizadas em hipoclorito de sódio 1% por 5 min e lavadas em água destilada esterilizada, semeadas em bandejas contendo areia autoclavada (três vezes à temperatura de 121 °C e 1 atm) e mantidas no escuro. Após sete dias, segmentos de hipocótilos estiolados com 0,5 cm foram destacados das plantas, lavados em água estéril e secos à temperatura ambiente sobre papel filtro estéril. Quatro segmentos de hipocótilo foram colocados em tubo para microcentrifuga e imersos em 500 μL das frações purificadas. Os tubos foram mantidos a 25 °C no escuro por 48 horas. Os hipocótilos tratados foram transferidos para frascos contendo 4 mL de etanol 80%, mantidos a 4 °C, por 48 horas e agitados (agitador orbital/150 rpm) por 1 hora para extração da faseolina. Em seguida, a partir do sobrenadante a fitoalexina (faseolina) foi mensurada em espectrofotômetro a 280 nm. Em seguida os hipocótilos foram lavados em água destilada, retirado excesso de umidade em papel toalha e pesados. O teor de faseolina na amostra foi obtido pelo valor de absorbância dividido pela massa dos hipocótilos (Abs.g.m f^{-1}) (GONÇALVES-TREVISOLI, 2016; BAILEY; BURDEN, 1973).

Os ensaios de fitoalexinas foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Como tratamento controle foi utilizada a solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (TAP) e água destilada estéril (H₂O) e como tratamento padrão de indução, utilizado o indutor de defesa vegetal Acibenzolar-S-Metil (ASM) (50 mg i.a. L⁻¹ do produto comercial Bion[®]) (KUHN, 2007), diluído em duas formas, em água destilada estéril (ASM/ H₂O) e tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) (ASM/TAP).

3.8 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE FEJOEIRO TRATADO COM FRAÇÕES DE FILTRADO DE CULTURA E EXTRATO DE MICÉLIO DE *Trichoderma longibrachiatum* CONTRA ANTRACNOSE

O experimento foi conduzido no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mario César Lopes, pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Campus de Marechal Cândido Rondon, PR, durante o mês de setembro a outubro de 2015.

O ensaio foi realizado em delineamento experimental em blocos casualizados, com quatro repetições por tratamento. Os tratamentos constituíram de oito frações obtidas da CFG, frações selecionadas pela capacidade de indução de faseolina (F17, F23, F25, F27, F29, F31, F38 e F46) e dois controles, ASM/TAP: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i.a. L⁻¹ do produto comercial Bion[®]), tratamento utilizado como indutor de resistência padrão de defesa vegetal diluído em tampão fosfato de sódio (0,05 M, pH 7,0) e TAP: solução tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,0).

As sementes de feijão foram semeadas em vasos de polipropileno, cilíndrico, com capacidade de 2 L, contendo substrato solo:areia:matéria orgânica na proporção de 3:2:1, essa mistura autoclavada por 25 minutos a 120°C repetindo-se a operação em 24 horas. Foram semeadas cinco sementes de feijão do cultivar IPR-Colibri, com posterior desbaste, deixando-se apenas três plantas por vaso.

Os tratamentos foram aplicados após 10 dias da emergência das plantas de feijoeiro, através de pincelamento (Pincel roliço, marca Condor 456 nº10) em uma das folhas primárias para verificar o efeito local (folha tratada (FT)), sendo que a outra folha primária não recebeu tratamento (folha não tratada (FNT)) para verificar a ocorrência de indução sistêmica.

A suspensão de esporos do patógeno foi ajustada para 1,4x10⁶ conídios mL⁻¹, suspensão preparada de acordo com o item 3.2 (CAMPOS et al., 2004). A inoculação do patógeno *C. lindemuthianum*, foi realizada 72 horas após a aplicação dos tratamentos, sendo realizado pelo

processo de aspersão foliar nas plantas de feijoeiro, que foram borrifados na parte aérea até o ponto de escorrimento. Após a inoculação, as plantas de feijoeiro foram mantidas em câmara úmida por 18 horas e em temperatura de aproximadamente 22 °C (DALLA PRIA; AMORIM; BERGAMIN FILHO, 2003).

Para análises bioquímicas, foram realizadas três coletas de amostras de tecido foliar, sendo que para cada coleta, foi retirado uma amostra de FT e uma de FNT, proveniente da mesma planta: 1ª coleta (sem aplicação dos tratamentos, 2ª coleta (72 horas após a aplicação dos tratamentos) e 3ª coleta (72 horas após a inoculação do patógeno *C. lindemuthianum*).

As amostras de tecido foliar foram coletadas, pesadas (0,5 g) e acondicionadas em envelopes de alumínio, congelado a -20 °C e mantidas em freezer até o momento da extração para determinação das análises bioquímicas.

3.9 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS RELACIONADAS À DEFESA

3.9.1 Obtenção dos Extratos Proteicos

Os extratos proteicos foram obtidos de acordo com a metodologia de Lusso e Pascholati (1999). Amostras com peso aproximadamente 0,5 g foram trituradas e homogeneizadas mecanicamente em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), em almofariz de porcelana e acrescentado 0,04 g de polivinil pirrolidona durante a maceração. O homogeneizado foi centrifugado a 20.000g durante 25 min a 4 °C. O sobrenadante foi considerado como extrato enzimático, congelado a -20 °C, para posterior determinação da atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), catalase (CAT), fenilalanina amônia-liase (FAL) e β -1,3 glucanases (β -GASE).

3.9.2 Determinação de Proteínas Solúveis Totais

O teor de proteínas solúveis totais foi determinado pela metodologia de Bradford (1976), constitui-se de 785 μ L de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), 15 μ L da amostra enzimática e 200 μ L de reagente de Bradford (250 mg de corante azul coomassie brilhante G-250, 125 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 125 mL de água destilada). Após adicionar o reagente sob agitação e incubar as amostras por 5 min, foi efetuada leitura na absorbância de 595 nm em espectrofotômetro. Cada amostra foi formada por três réplicas. A cubeta de referência consistiu de 800 μ L de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200 μ L do reagente. A absorbância foi plotada

em curva padrão para proteína ($y=0,0483x + 0,0275$, onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína com base em albumina de soro bovino). Os resultados foram expressos em $\text{mg mL}^{-1} \text{ g massa fresca}^{-1}$.

3.9.3 Atividade de Peroxidase

A atividade de POX foi determinada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm, por um período de 2 min, com medidas de densidade ótica a cada 15 segundos (HAMMERSCHMIDT; NUCLES; KUC, 1982). A mistura da solução consistiu de 900 μL do substrato para enzima (306 μL de peróxido de hidrogênio p.a., 12,5 mL de guaiacol 2% e 87,5 de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 100 μL da preparação enzimática. Os resultados foram expressos pela atividade na variação entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear unidade de enzima $\text{U.E. min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$. Uma unidade da enzima (U.E.) é definida como a quantidade de enzima necessária para elevar a absorbância de 0,001 unidade por minuto (CAMPOS et al., 2004).

3.9.4 Atividade de Polifenoloxidase

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

3.9.5 Atividade de Catalase

A atividade de CAT foi determinada como descrito por Havir e McHale (1987). Uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático foi adicionada a 950 μL tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 12,5 mM) e o decaimento da

absorbância a 240 nm foi acompanhado durante 80 segundos, com leituras a cada 10 segundos. A atividade da enzima foi, calculada com base no coeficiente de extinção molar do H_2O_2 de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 240 nm e a atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores situados na faixa de incremento linea U.E. (unidade de enzima) $\text{min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

3.9.6 Atividade de Fenilalanina Amônia-liase

A atividade da FAL foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina, metodologia descrita por Umesha (2006), a qual 50 μL da preparação enzimática 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. A mistura da reação, foi incubada a 40 °C por 2 horas. No final desse período, adicionou-se 60 μL de HCl 5 M para cessar a reação, seguindo-se a leitura em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade de FAL constituiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle (50 μL de extrato proteico e 950 μL de tampão Tris-HCl 0,025 M (pH8,8)), a qual foi plotada em curva padrão para ácido *trans*-cinâmico ($y = 0,0095x + 0,0255$, onde y é a absorbância a 290 nm e x a concentração de ácido *trans*-cinâmico (mg)), expressa em mg ácido *trans*-cinâmico $\text{h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$.

3.9.7 Atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -GASE foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina (VOGELSANG; BARZ, 1993). A reação envolveu 100 μL da preparação enzimática, 50 μL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 150 μL de laminarina (2 mg mL^{-1}), que foi desenvolvida a 40 °C durante 1 hora. No controle passou pelo mesmo processo, porém a adição de laminarina foi feita somente após a incubação. Os açúcares formados foram quantificados pelo método de Lever (1972), que consiste em extrair uma alíquota de 30 μL da solução anterior e acrescentar a esta 1,5 mL da solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 0,5% (PAHBAH) (0,5 g de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico diluída em 20 mL de HCl 0,5 M e acrescida de 80 mL de NaOH 0,5 M). A mistura foi mantida a 100 °C durante 10 min, resfriada em gelo por 10 min e determinada a absorbância a 410 nm. A atividade de β -GASE consistiu da diferença entre a absorbância da mistura contendo amostra e do controle, a qual foi plotada em curva padrão para glicose ($y = 0,002x + 0,0046$, onde y é a

absorbância e x a concentração de açúcares redutores (mg)) e expressa em equivalente mg glicose mL⁻¹ h⁻¹ mg proteína⁻¹.

3.10 AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE

A avaliação da severidade da doença foi realizada 5 dias após a inoculação do patógeno *C. lindemuthianum*, através da área lesionada no par de folhas primárias utilizando a escala diagramática (Figura 4), descrita por Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999).

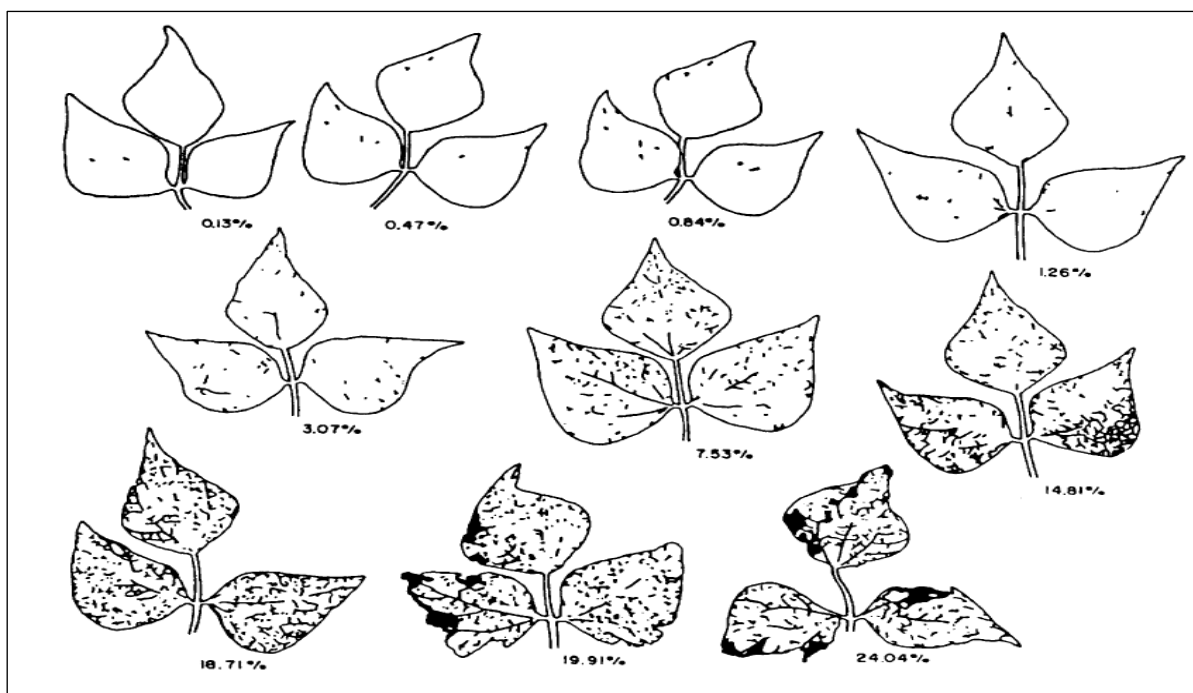


Figura 4 - Escala diagramática para antracnose do feijoeiro. Fonte: Dalla Pria, Amorin e Canteri (1999).

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados *in vitro* do bioensaio de fitoalexina foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias referências aos tratamentos aplicados ao teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. O programa utilizado para análise foi software estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

Para o ensaio *in vivo* na indução de resistência, após tabulados os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias referentes aos tratamentos foram aplicadas ao teste de Scott-Knott e as médias referentes à forma de aplicação nas folhas comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

4.1.1 Frações Obtidas a Partir de Filtrado de Cultura de *Trichoderma longibrachiatum*

Os picos para carboidratos e proteínas purificados apresentaram menores magnitudes, porém, a presença de um pico de natureza glicoproteica de alta absorbância foi registrada (1,182 nm), ao passo que, também foi verificado a presença de um pico proteico (0,0104 nm), correspondente ao material retido, inicialmente, na resina. Como a resina utilizada é de troca aniônica, os carboidratos que ficaram ligados nela apresentam carga líquida negativa, sendo necessário serem eluídos em gradiente de concentração de NaCl. Quando eluídos pelo gradiente de concentração, verificou-se a presença de um pico de maior absorbância em 0,1167 nm de natureza glicoproteico. Para os picos proteicos que coincidiram com os glicídicos, estes foram considerados como sendo glicoproteicos, enquanto aqueles que não coincidiram com os picos proteicos, estes foram considerados como sendo glicídicos (Figura 5).

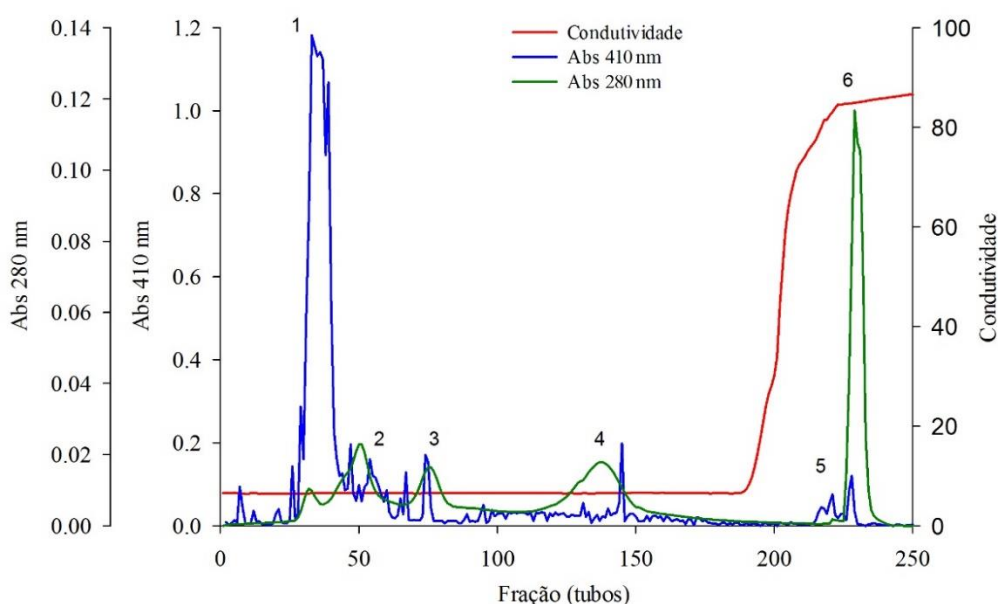


Figura 5 - Cromatografia de troca iônica a partir de filtrado de cultura de *Trichoderma longibrachiatum*. Uma amostra de 1,5 mL foi aplicada sob coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), sendo coletadas frações de 6 mL, num fluxo de 1,5 mL min⁻¹. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 a 100%) no mesmo tampão. Proteína (verde) foi determinada em 280 nm e carboidratos em 410 nm (azul) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (vermelho) foram determinadas por condutividade (mS cm⁻¹).

A partir da separação de moléculas de FTC de *T. longibrachiatum* por CTI, as frações que apresentaram caráter de natureza semelhante foram reunidas em quatro frações de natureza glicoproteicas (Frações: 1, 2, 3 e 4) para aquelas não ligadas à resina e que apresentaram carga líquida positiva. Para as frações em que as moléculas foram ligadas à resina (eluídas contra um gradiente de concentração de NaCl e, em seguida, dialisada em água destilada) foi registrada uma fração de natureza glicídica e outra de natureza glicoproteica (Frações: 5 e 6) (Figura 5; Tabela 1).

4.1.2 Frações Obtidas a Partir de Extrato de Micélio de *Trichoderma longibrachiatum*

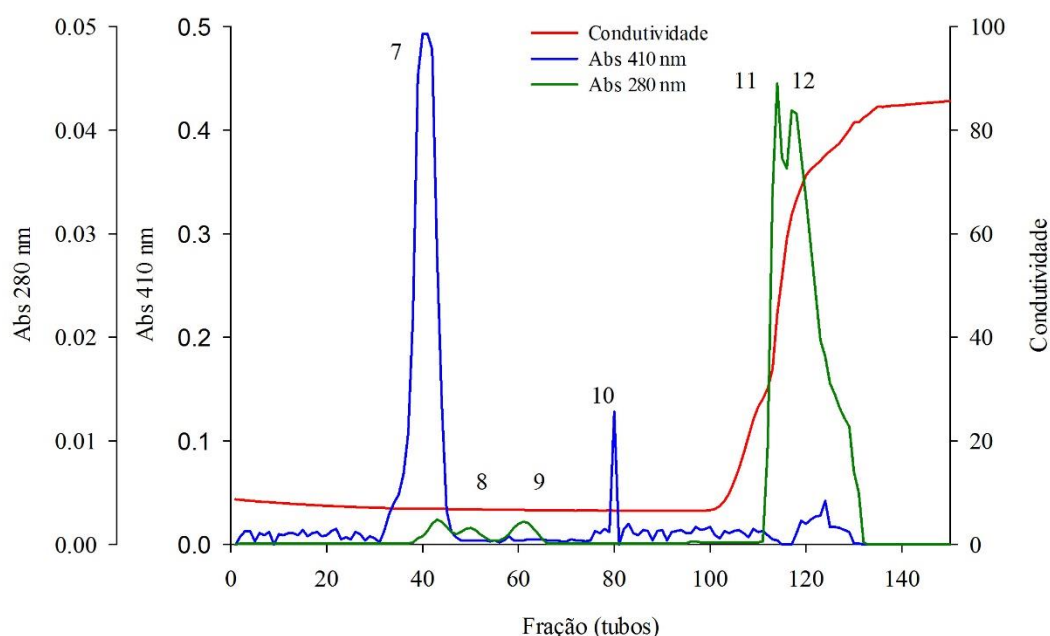


Figura 6 - Cromatografia de troca iônica a partir de extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum*. Uma amostra de 1,5 mL foi aplicada sob coluna de vidro (5 cm x 20 cm) preenchida com resina de troca iônica (UNOsphere™ Q Strong Anion Exchange) equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), sendo coletadas frações de 6 mL, num fluxo de 1,5 mL min⁻¹. O material adsorvido foi eluído com gradiente linear de NaCl (0 a 100%) no mesmo tampão. Proteína (verde) foi determinada em 280 nm e carboidratos em 410 nm (azul) pelo método de Lever (1972). Concentrações de NaCl (vermelho) foram determinadas por condutividade (mS cm⁻¹).

A partir da purificação de moléculas de EXM de *T. longibrachiatum* por CTI, em primeiro momento, foram obtidas frações não ligadas a resina, sendo coletadas quatro frações, uma de natureza glicoproteica (Fração 7) com maior absorbância de 0,493 nm, duas de natureza proteica (Fração 8 e 9), cuja absorbâncias foram 0,0016 nm e 0,0022 nm e uma fração de

natureza glicídica com 0,128 nm. Todas as frações purificadas apresentam carga líquida positiva (Figura 6).

As frações que ficaram retidas na resina (eluídas contra um gradiente de concentração de NaCl e, em seguida, dialisadas em água destilada) foram separadas em duas frações, uma de natureza proteica com absorbância de 0,044 nm (Fração 11) e o outro de natureza glicoproteica de 0,041 nm (Fração 12), ambas caracterizadas como sendo moléculas de carga líquida negativa (Figura 6, Tabela 1).

4.1.2 Bioensaio De Fitoalexinas em Hipocótilos De Feijoeiro

As frações purificadas pela CTI a partir de FTC e EXM e testadas em bioensaios para produção de fitoalexinas faseolina em hipocótilos de feijoeiro, são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Frações, natureza, teor de proteína total, teor de carboidrato e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de troca iônica, a partir de filtrado de cultura e extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum*.

Frações CTI	Amostra	Natureza	Teor de Proteína Total (μg proteína mL^{-1})	Teor de Carboidrato (μg glicose mL^{-1})	Faseolina (280 nm.g.m f^{-1})
1	FTC	Glicoproteica	24,86	94,36	6,64 B
2		Glicoproteica	39,37	15,43	6,28 B
3		Glicoproteica	16,88	6,15	5,25 C
4		Glicoproteica	9,77	13,01	7,70 A
5		Glicídica	11,90	16,20	8,10 A
6		Glicoproteica	6,45	16,20	7,12 A
7	EXM	Glicoproteica	19,82	10,88	6,40 B
8		Proteica	24,02	11,56	6,88 B
9		Proteica	17,48	9,24	6,35 B
10		Glicídica	6,91	7,60	6,18 B
11		Proteica	33,38	6,34	6,17 B
12		Glicoproteica	10,43	17,36	7,07 A
ASM/H ₂ O ¹	--	--	--	--	6,31 B
ASM/TAP ²	--	--	--	--	5,56 C
H ₂ O ³	--	--	--	--	4,47 C
TAP ⁴	--	--	--	--	4,08 C
CV (%)					13,88

¹ASM/H₂O: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i.a, L⁻¹) diluído em água esterilizada; ²ASM/TAP: Acibenzolar-S-metil (50 mg i.a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), utilizado como indução de resistência padrão; ³H₂O: Água esterilizada utilizada como tratamento controle; ⁴TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) utilizado como tratamento controle; Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

As frações 4, 5 e 6 de FTC e a fração 12 de EXM (Fração 4, não ligada a resina; Fração 5, 6 e 12, ligadas a resina) foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, os quais apresentaram carácter eliciador, com potencial ativador da fitoalexina faseolina, das quais, as concentrações do teor de proteína total detectadas foram de 9,77 μg proteína mL^{-1} ; 11,90 μg proteína mL^{-1} ; 6,45 μg proteína mL^{-1} ; 33,38 μg proteína mL^{-1} e 10,43 μg proteína mL^{-1} , respectivamente. Para teores de carboidratos as concentrações obtidas foram 13,01 μg glicose mL^{-1} ; 16,20 μg glicose mL^{-1} ; 16,20 μg glicose mL^{-1} ; 6,34 μg glicose mL^{-1} e 17,36 μg glicose mL^{-1} , respectivamente. De modo geral, a fração 5 foi de maior indução de síntese de faseolina, com 28,36 % maior em relação ao tratamento padrão de indução resistência ASM/H₂O (Acibenzolar-S-Metil + água esterilizada). Com relação as frações 4, 6 e 12 o efeito indutor de fitoalexinas foi 22,02%, 16,15% e 15,33% respectivamente, maiores em relação ao ASM/H₂O.

Em relação as frações 1 e 2 (FTC), 7, 8, 9, 10 e 11 (EXM) estas foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott no segundo grupo, a qual responderam de maneira semelhante ao tratamento padrão de indução resistência ASM+H₂O. A fração 3 (FTC) não demonstrou indução da síntese de fitoalexinas nos hipocótilos de feijoeiro, sendo os valores semelhante ao tratamento controle ASM/TAP (Acibenzolar-S-Metil + Tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0)).

4.2. CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL (CFG)

Com finalidade de purificar novas frações a partir de filtrado de cultura (FTC) e extrato de micélio (EXM) de *T. longibrachiatum*, com potencial indutor de fitoalexinas faseolina, as frações obtidas pela CTI foram submetidas a purificação em CFG, sendo assim, possível obter novos picos de carácter diferentes e de natureza variada. Os picos de frações obtidos da CFG de FTC foram 14 e os picos de EXM foram 24, sendo esses testados quanto à capacidade de induzir faseolina em hipocótilos de feijão, respectivamente.

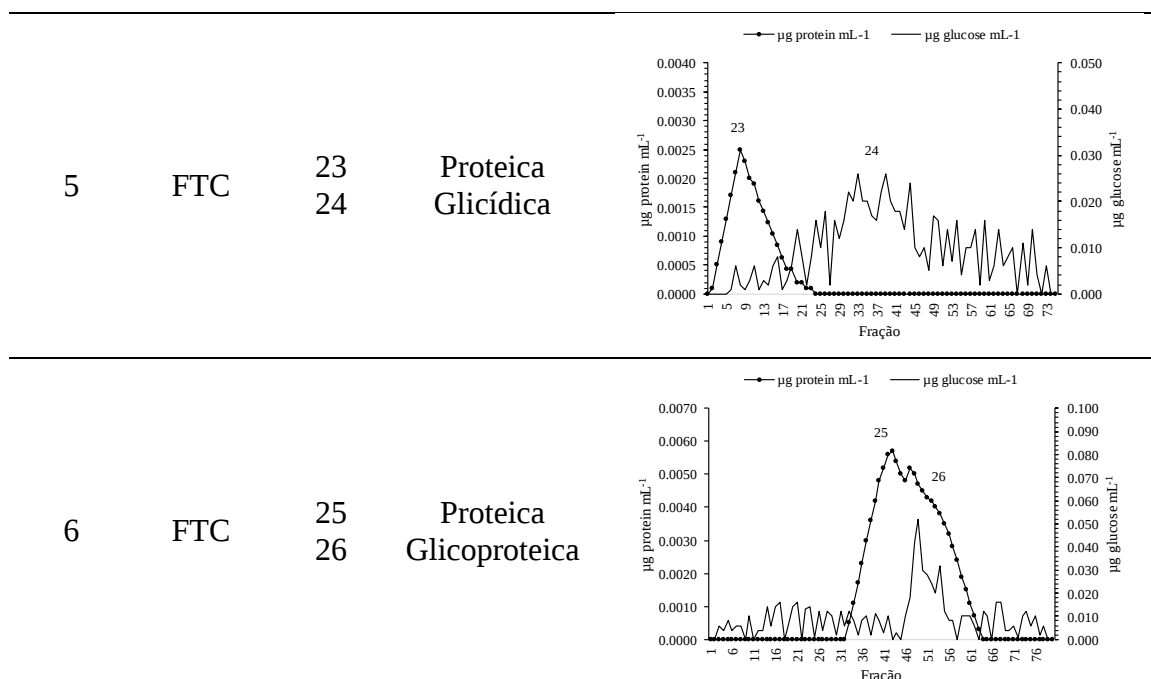
4.2.1 Frações Obtidas a Partir de Filtrado de Cultura de *Trichoderma longibrachiatum*

Para a separação de novas frações de carácter eliciador a partir de FTC, com potencial de atividade indutora de fitoalexinas, as frações obtidas pela purificação da CTI foram submetidas à técnica de CFG. A purificação das frações de FTC (1, 2, 3, 4, 5 e 6) por meio da CFG resultaram em 14 frações (Tabela 2). A purificação das moléculas pela técnica, apresentou um grupo de natureza proteica, glicídica e glicoproteica, de massa moleculares conhecida, das

quais, foram testadas em bioensaio de indução da fitoalexina faseolina em hipocótilo de feijoeiro.

Tabela 2 - Cromatogramas de frações proteicas, glicídicas e glicoproteicas provenientes da cromatografia de troca iônica com suas correspondentes frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel, a partir de filtrado de cultura de *Trichoderma longibrachiatum*.

Frações CTI	Amostra	Frações CFG	Natureza	Cromatograma
1	FTC	13 14	Proteica Glicoproteica	
2	FTC	15 16 17	Glicídica Glicoproteica Glicoproteica	
3	FTC	18 19	Glicoproteica Glicoproteica	
4	FTC	20 21 22	Glicoproteica Glicoproteica Glicoproteica	



Perfil proteico (lido diretamente a 280 nm de absorvância) e glicídico (lido indiretamente a 410 nm de absorvância) obtido por cromatografia de filtração em gel a partir das frações 1, 2, 3, 4, 5 e 6 da cromatografia de troca iônica.

A maioria das frações purificadas apresentaram em sua composição uma maior concentração de teor de proteínas em relação ao teor de carboidratos (Tabela 3), cujo o maior teor de proteína total foi observado para a fração 17 (12,53 μg proteína mL⁻¹ contra 3,83 μg glicose mL⁻¹), respectivamente e de natureza glicoproteica.

A utilização da técnica de CFG foi eficiente para a purificação de moléculas provenientes da CTI, com potencial de indução da produção de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro. A partir das 14 frações obtidas, 3 delas apresentaram potencial de indução (Tabela 3). Pelo teste de Scott-Knott as frações 17, 23 e 25 foram agrupadas no grupo I, com potencial indutor da fitoalexina faseolina, caracterizando-as como eliciadores de natureza glicoproteica e proteica, com valores de 5,27, 5,49 e 6,13 Abs.g.m f⁻¹, respectivamente, valores estes, semelhante ao tratamento padrão de indução de resistência ASM (6,31 Abs.g.m f⁻¹).

As frações 5 e 6 purificadas na CTI (moléculas ligadas à resina), apresentaram atividade de produção de fitoalexinas faseolina discutido anteriormente no item 4.1.2, as mesmas, quando submetido à purificação pela CFG, resultaram nas frações 23 e 25 que foram capazes de induzir a resposta de defesa nos hipocótilos de feijoeiro pela produção da síntese de faseolina, os quais, apresentam massa molecular em torno de 3.3281,26 kDa e 45,09 kDa, respectivamente. Já a fração 2 purificada pela CTI (moléculas não ligadas à resina), não apresentou efeito de indução

de faseolina, porém quando submetido a CFG resultou na fração 17 de carácter eliciador de fitoalexina, com massa molecular de 33,16 kDa e de natureza glicoproteica.

Tabela 3 - Frações, natureza, teor de proteína total, massa molecular, teor de carboidrato e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel, a partir de filtrado de cultura de *Trichoderma longibrachiatum*.

Frações CFG	Natureza	Teor de Proteína Total (μg proteína mL^{-1})	Massa Molecular (kDa)	Teor de Carboidrato (μg glicose mL^{-1})	Faseolina (280 nm.g.m f^{-1})
13	Proteica	11,38	413,4	4,02	4,77 B
14	Glicoproteica	9,68	1,67	4,41	5,09 B
15	Glicídica	11,02	--	5,86	4,56 B
16	Glicoproteica	11,03	576,0	4,12	4,41 B
17	Glicoproteica	12,53	33,16	3,83	5,27 A
18	Glicoproteica	8,87	257,7	4,51	4,37 B
19	Glicoproteica	10,49	350,4	4,31	4,83 B
20	Glicoproteica	10,28	1.656,5	3,83	4,98 B
21	Glicoproteica	9,85	350,4	4,02	4,40 B
22	Glicoproteica	9,10	1,67	3,73	5,07 B
23	Proteica	11,46	3.281,2	4,60	5,49 A
24	Glicídica	9,30	--	3,64	4,33 B
25	Proteica	7,37	45,09	3,06	6,13 A
26	Glicoproteica	9,88	25,77	2,87	4,75 B
ASM/H ₂ O ¹	--	--	--	--	6,31 A
ASM/TAP ²	--	--	--	--	5,56 A
H ₂ O ³	--	--	--	--	4,08 B
TAP ⁴	--	--	--	--	4,47 B
CV (%)					18,11

¹ASM/H₂O: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i.a, L⁻¹) diluído em água esterilizada; ²ASM/TAP: Acibenzolar-S-metil (50 mg i.a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), utilizado como indução de resistência padrão; ³H₂O: Água esterilizada utilizada como tratamento controle; ⁴TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) utilizado como tratamento controle; Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

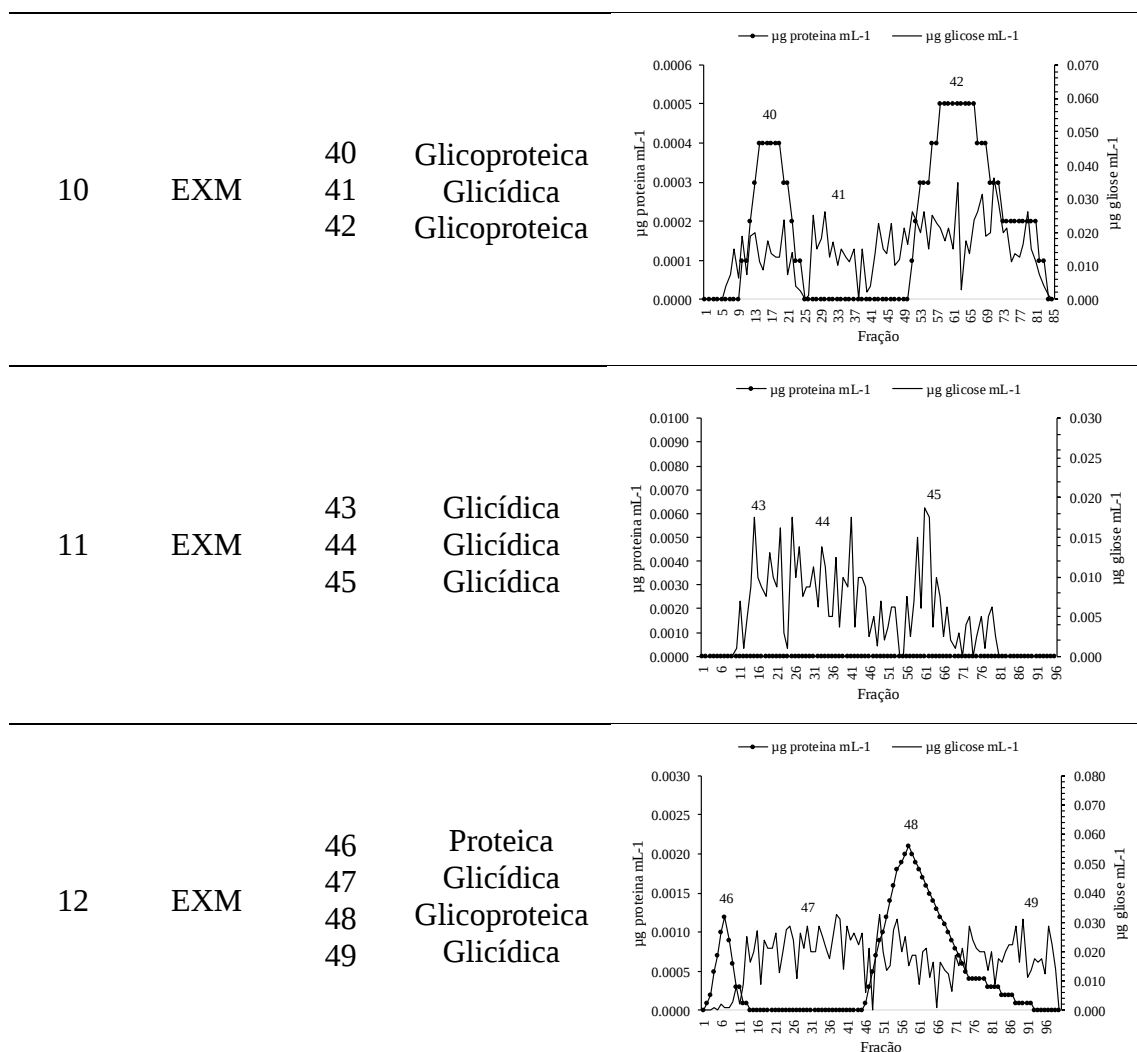
As frações 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24 e 26 foram agrupadas pelo teste Scott-Knott no grupo II, que por sua vez, apresentaram valores próximos da atividade de faseolina em relação aos tratamentos controle (H₂O - Água esterilizada; Fosfato - Tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH 7,0)), com valores de faseolina semelhante a 4,08 e 4,47 Abs.g.m f^{-1} , de modo que, as frações apresentadas não induziram fitoalexinas, sendo elas de natureza proteicas, glicídicas e glicoproteicas e suas massas moleculares 413,47 kDa, 1,67 kDa, -- kDa, 576,06 kDa, 257,77 kDa, 350,42 kDa, 1656,56 kDa, 350,42 kDa, 1,67 kDa, -- kDa e 25,77 kDa, respectivamente.

4.2.2 Frações Obtidas a Partir de Extrato de Micélio de *Trichoderma longibrachiatum*

Para a purificar de novas frações de carácter eliciador a partir de EXM, com potencial de atividade indutora de fitoalexinas, as frações obtidas pela purificação da CTI foram submetidas à técnica de CFG. A purificação das frações de EXM (7, 8, 9, 10, 11 e 12) por meio da CFG resultaram em 24 frações (Tabela 4). De modo que, o grupo de frações purificadas apresentam natureza proteica, glicídica e glicoproteica, de massas moleculares conhecidas, das quais, foram testadas em bioensaios de indução de fitoalexinas faseolina em hipocótilo de feijoeiro.

Tabela 4 - Cromatogramas de frações proteicas, glicídicas e glicoproteicas provenientes da cromatografia de troca iônica com suas correspondentes frações obtidas pela cromatografia de filtração em gel, a partir de extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum*.

Frações CTI	Amostra	Frações CFG	Natureza	Cromatograma
7	EXM	27	Glicoproteica	
		28	Glicoproteica	
		29	Glicoproteica	
		30	Proteica	
		31	Glicoproteica	
8	EXM	32	Glicoproteica	
		33	Glicídica	
		34	Proteica	
		35	Glicoproteica	
9	EXM	36	Glicídica	
		37	Proteica	
		38	Glicídica	
		39	Glicoproteica	



Perfil proteico (lido diretamente a 280 nm de absorbância) e glicídico (lido indiretamente a 410 nm de absorbância) obtido por cromatografia de filtração em gel a partir das frações 7, 8, 9, 10, 11 e 12 da cromatografia de troca iônica.

A partir das frações purificadas, pode-se observar, uma maior concentração de teor de proteínas do que teor de carboidratos (Tabela 5), tal como apresentado para as frações 35 (9,77 μg proteína mL^{-1} e 5,76 μg glicose mL^{-1}) e fração 40 (10,14 μg proteína mL^{-1} contra 4,31 μg glicose mL^{-1}), cujo teor de proteínas apresentaram-se maiores para esses picos em relação ao teor de carboidratos, sendo ambos de natureza glicoproteica.

Tabela 5 – Frações, natureza, teor de proteína total, massa molecular, teor de carboidrato e acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro, tratados com as frações glicoproteicas e glicídicas provenientes da cromatografia de filtração em gel, a partir de extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum*.

Frações CFG	Natureza	Teor de Proteína Total (μg proteína mL^{-1})	Massa Molecular (kDa)	Teor de Carboidrato (μg glicose mL^{-1})	Faseolina (280 nm.g.m f^{-1})
27	Glicoproteica	8,04	1.875,7	3,93	5,84 A
28	Glicoproteica	7,89	273,3	4,51	3,69 B
29	Glicoproteica	6,14	1,89	3,73	6,20 A
30	Proteica	9,30	0,794	4,70	5,06 B
31	Glicoproteica	4,75	0,202	4,12	5,69 A
32	Glicoproteica	5,68	449,2	3,93	4,12 B
33	Glicídica	5,82	--	4,51	3,89 B
34	Proteica	7,58	3,11	4,41	4,52 B
35	Glicoproteica	9,77	2,01	5,76	5,01 B
36	Glicídica	7,98	--	4,12	4,56 B
37	Proteica	8,21	478,0	4,60	4,94 B
38	Glicídica	5,99	--	4,80	6,51 A
39	Glicoproteica	8,21	4,52	3,15	4,17 B
40	Glicoproteica	10,14	694,1	4,31	4,30 B
41	Glicídica	5,96	--	4,80	4,13 B
42	Glicoproteica	6,11	4,52	3,35	4,76 B
43	Glicídica	4,49	--	4,60	4,27 B
44	Glicídica	3,89	--	3,93	5,03 B
45	Glicídica	4,29	--	4,22	4,99 B
46	Proteica	4,84	3.491,6	3,93	5,78 A
47	Glicídica	5,07	--	4,12	4,90 B
48	Glicoproteica	5,82	4,81	2,87	4,45 B
49	Glicídica	5,56	--	3,64	4,97 B
ASM/H ₂ O ¹	--	--	--	--	6,31 A
ASM/TAP ²	--	--	--	--	5,56 A
H ₂ O ³	--	--	--	--	4,08 B
TAP ⁴	--	--	--	--	4,47 B
CV (%)					18,11

¹ASM/H₂O: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i,a, L⁻¹) diluído em água esterilizada; ²ASM/TAP: Acibenzolar-S-metil (50 mg i,a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0), utilizado como indução de resistência padrão; ³H₂O: Água esterilizada utilizada como tratamento controle; ⁴TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,0) utilizado como tratamento controle; Médias seguidas pelas mesmas letras maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

Quando as frações da CTI foram purificadas pela CFG, após reunir os picos, resultaram em frações com características indutoras de atividade da fitoalexina faseolina. Por meio do teste de Scott-Knott, o tratamento padrão de indução ASM+H₂O, apresentou maior resposta, com valor médio de 6,31 Abs.g.m f^{-1} e as frações 27 (5,84 Abs.g.m f^{-1}), 29 (6,20 Abs.g.m f^{-1}), 31 (5,69 Abs.g.m f^{-1}), 38 (6,51 Abs.g.m f^{-1}) e 46 (5,78 Abs.g.m f^{-1}) reunidas no grupo I, demonstrando maior indução de faseolina em até 59,55% em relação ao tratamento controle (H₂O e Fosfato), como é o caso da Fração 38.

As frações 7, 9 (moléculas não ligadas à resina) da CTI, não apresentaram atividade de produção da fitoalexina faseolina discutido no item 4.1.2, porém quando submetido à purificação pela CFG resultaram nas frações 27, 29 e 31, com massa molecular de 1.875,76 kDa, 1,89 kDa, 0,202 kDa de natureza glicoproteica e a fração 38 de natureza glicídica (-- kDa), respectivamente foram capazes de induzir a resposta de defesa nos hipocótilos de feijoeiro pela produção da síntese de faseolina. Já para a fração 12 (moléculas ligadas à resina) purificada pela CTI, a qual, apresentou efeito de indução de faseolina e quando submetido a CFG resultou na fração 46 de carácter eliciador e indutor de faseolina, de natureza proteica, com massa molecular de 3.491,60 kDa, caracterizada como de maior peso em relação a demais frações.

Para as frações 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48 e 49, agrupadas no grupo II, não apresentaram efeito indutor da fitoalexina, sendo seus valores menores que o tratamento padrão de indução de resistência (ASM) e semelhantes ao tratamento controle (H₂O e TAP).

A separação de moléculas, por ser de fácil utilização e carácter prático, o método de cromatografia baseia-se na rapidez e simplicidade na purificação de moléculas de características eliciadoras e potenciais para ativação dos mecanismos de resistências na planta, tal como foi empregada no presente estudo (COLLINS, 2006; GONÇALVES-TREVISOLI, 2016).

A purificação de moléculas a partir de um microrganismo é realizada pelo método da cromatografia, essa técnica, foi utilizada neste trabalho, permitindo a separação de moléculas potencias do fungo antagonista *Trichoderma*, separação no qual, o mesmo é considerado importante estudo para o mecanismo de resistência em plantas de feijoeiro.

Para as frações de FTC e EXM purificadas da CTI e testadas no bioensaio de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro, apresentaram resposta efetiva para indução do mecanismo de resistência vegetal, pela qual é observado a presença de moléculas eliciadoras que ativaram a produção de fitoalexinas. Segundo Gonçalves-Trevisoli (2016), esse resultado está atrelado à atividade conjunta de moléculas, a partir dos picos obtidos na purificação por cromatografia. Do mesmo modo, as diferentes frações da CTI, quando submetidas à purificação da CFG, resultaram um grupo de frações de características efetivas, que apresentaram atividade eliciadora, com capacidade de induzir a produção de fitoalexinas faseolina no feijoeiro, com similaridade de indução em comparação ao ASM, tratamento padrão de indução de resistência.

Gonçalves-Trevisoli et al. (2016), pesquisando 12 frações eliciadoras purificadas a partir de fêmeas de nematoides *Meloidogyne javanica* em cromatografia troca iônica (CTI), concluíram que, três frações obtidas (1, 3 e 5), apresentaram potencial de efeito indutor na

síntese de faseolina em 35%, 29% e 28%, respectivamente, maiores em relação ao ASM. Porém, foi observado efeito de supressão na indução de fitoalexinas por quatro frações obtidas (11, 8, 12 e 9), com porcentagem de 28%, 37%, 40% e 45%, menor que tratamento controle.

Esses mesmos autores, na tentativa de obter novas frações das obtidas pela CTI, quando submetidas à CFG, de modo que, obtiveram frações de natureza glícídica e glicoproteica com potencial indutor de fitoalexinas em hipocótilos de feijoeiro. Pela purificação, das 63 frações totalizadas, cinco frações, 2, 6, 15, 17 e 22, apresentaram efeito eliciador induzindo a atividade de faseolina em 86%, 124%, 98%, 94% e 77%, respectivamente maiores que o tratamento ASM, sendo essas frações de carácter glicoproteica.

O mesmo pode ser observado para o presente estudo, sendo que as frações obtidas de FTC e EXM, apresentaram indução de fitoalexina faseolina a partir da purificação da CTI, quando as frações foram submetidas à CFG, a purificação foi eficiente, as quais apresentou frações indutoras de fitoalexinas faseolina em hipocótilos de feijoeiro.

Para as frações 17, 23 e 25 obtidas de FTC purificadas na CFG, em média as respectivas frações induziram 38% superior a atividade de síntese de faseolina em relação a testemunha água, sendo essas moléculas de natureza glicoproteica e proteica. O mesmo pode ser observado para as frações 27, 29, 31, 38 e 46 obtidas de EXM e purificadas na CFG, apresentaram valor médio de 47% superior em relação a testemunha água, indicando potencial de atividade indutora no acúmulo de faseolina em hipocótilos de feijoeiro, caracterizando essas moléculas como eliciadora de natureza proteica, glícídica e glicoproteica.

Em estudo realizado com cromatografia de troca iônica seguida de cromatografia de filtração em gel de extrato bruto de dois isolados de cogumelos shiitake (*Lentinula edodes*), Fiori-Tutida (2003) obteve 23 frações proteicas para o isolado LE 96/17 e 15 frações para o isolado LE 95/01, comprovando a eficiência do método de purificação do extrato aquoso de basidiocarpos do cogumelo shiitake.

A caracterização e purificação de frações de decocto de *Adiantum capillus-veneris* (avenca) provenientes da CFG, Meinerz et al. (2014) verificaram a capacidade de indução eliciadora na síntese de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. Os autores encontraram pico proteico, com 0,09 kDa do decocto não precipitado com sulfato de amônio (SA), induzindo fitoalexinas, em torno de 6,68% superior a ASM. Entre as frações precipitadas de concentração 60-80% de sulfato de amônio, mostraram-se superiores, promovendo atividade indutora de 76% maior que o tratamento ASM. As características das frações obtidas pela precipitação eram de natureza proteicas e glícídicas, sendo possível verificar efeito indutor de fitoalexinas em sorgo

de maneira superior ao extrato originária, do qual não era precipitado, indicando o potencial dessas moléculas para estudos futuros de indução de resistência em plantas.

Yedidia et al. (2003), ao caracterizar a resposta sistêmica induzida em plantas de pepino inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* pela proteção do fungo *Trichoderma asperellum* aplicado no sistema radicular, obtiveram resposta de fitoalexinas que foram determinadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os resultados confirmaram que a produção de fitoalexinas glicosiladas no pepino requer a hidrólise ácida do extrato como condição prévia para a expressão da atividade, em consequência o aumento da atividade antimicrobiana potenciais para induzir respostas de defesa e pode ativar vias metabólicas separadas que estão envolvidas na sinalização da biossíntese da planta, levando à acumulação sistêmica de fitoalexinas.

Em trabalho desenvolvido por Stangarlin et al. (2010) com objetivo de induzir fitoalexinas utilizando cotilédones de soja pela levedura *Saccharomyces boulardii* na forma do produto comercial Floratil (Merck), massa de células e de filtrado do meio de cultivo das leveduras em diferentes concentrações, os autores verificaram que, apenas os tratamentos filtrados e *S. boulardii*, apresentaram efeito dose-dependente na indução de fitoalexinas deoxiantocianidinas de sorgo.

O acúmulo de fitoalexinas, assim como a ativação de outras rotas metabólicas envolvidas na indução de defesa vegetal, ocorre em resposta através do reconhecimento de moléculas eliciadoras (Hahn, 1996; Smith, 1996). Segundo Smith (1996), moléculas eliciadoras que são capazes de estimular sinais de resposta de defesa vegetal, podem ser constituídas por uma ampla variedade de natureza química, incluindo proteínas, carboidratos, glicoproteínas, ácidos graxos, sendo possível afirmar que não existe uma única estrutura química envolvida na indução da atividade eliciadora. De acordo com Hahn (1996) essas moléculas funcionam como receptores fisiológicos envolvendo cascata de transdução de sinais específicos. Tal fato, pode haver mais de uma molécula eliciadora associada, atuando juntas no mecanismo de resistência (DIXON; LAMB, 1990)

A síntese de fitoalexina envolve a rápida expressão de genes que codificam uma série de enzimas chaves (indução de uma série de rotas). Entre elas, a fenilalanina amônia-liase (FAL) catalisa o primeiro passo na via biossintética dos fenilpropanóides que conduz à produção de compostos fenólicos, para desencadear a ativação de vias metabólicas, incluindo fitoalexinas (HAMMERSCHMIDT, 1999).

A rápida e bem sucedida resposta de defesa vegetal está relacionada na ativação de uma série de genes que atuam na síntese e produção de compostos antimicrobianos e toxinas

(Fitoalexinas), espécies reativas de oxigênio, reação de hipersensibilidade, lignificação da parede celular e enzimas que impedem a entrada do patógeno (VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram um complexo sistema de mecanismos de defesa que se inicia pelo reconhecimento do agente indutor ou da presença de um patógeno. Esse reconhecimento consiste na defesa basal contra os patógenos e utiliza proteínas receptoras localizadas na membrana das células vegetais, mediado pelos receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*), que reconhecem estruturas microbianas conservadas, denominadas Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs - *Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou a Micróbios (MAMPs - *Microbial Associated Molecular Patterns*) (COLL; EPPLE; DANGL, 2011; DA SILVA, 2014).

Na literatura há poucos relatos de trabalhos visando à obtenção de frações biologicamente ativa a partir do gênero *Trichoderma*. No entanto, o método de purificação para obtenção de eliciadores tem sido utilizado e relatado em poucos trabalhos com *Trichoderma* e outros diferentes agentes.

Purificando e identificando compostos antifúngicos de uma estirpe T-33 de *Trichoderma*, Li et al. (2015) através de tecnologia de separação combinada, incluindo extração com solvente orgânico, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia em camada delgada (TLC), resultaram no composto ativo 2,5-ciclohexadieno-1,4-diona-2,6-bis (1,1-dimetiletilo), demonstrando efeito inibitório sobre a espécie *Cytospora chrysosperma*, fungos patogênico em álamo branco chinês (*Populus tomentosa* Carr.).

Stoppacher et al. (2010), purificando compostos orgânicos voláteis de culturas do fungo de biocontrole *Trichoderma atroviride* pelo método baseado na headspace e microextração em fase sólida (HS-SPME) acoplado a cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) e em comparação de banco de dados. No total, foram identificados 25 diferentes compostos que foram atribuídos as classes de compostos de álcoois, cetonas, alcanos, furanos, pironas, mono e sesquiterpenos e um dos metabolitos mais abundantes identificados neste estudo foi o bioativo 6 pentil- α -pirona, uma lactona insaturada com uma massa molecular de 166 kDa, sendo que, 13 compostos dos quais nunca foram relatados por ser produzidos pelo fungo *Trichoderma* spp. antes.

Em trabalho realizado por Parker et al. (1991), na purificação e caracterização de polipeptídios biologicamente ativos em plantas de salsa. Um eliciador proteico obtido de parede de hifas de *Phytophthora sojae*, foi purificado a partir do filtrado da cultura de crescimento,

sendo verificado efeito indutor para síntese de fitoalexinas nas plantas. A atividade da molécula eliciadora está envolvida na porção polipeptídica de uma glicoproteína de tamanho 42 kDa.

Ao contrário dos resultados observados no presente trabalho, as frações purificadas pela CFG que apresentaram efeito indutor de fitoalexinas faseolina, demonstraram massa molecular de diversos tamanhos. As frações de menor tamanho, como é o caso da F17, F25, F29, F31 e F38, apresentaram massas moleculares de 33,16 kDa, 45,09 kDa, 1,89 kDa, 0,20 kDa e natureza glicídica, respectivamente, por outro lado, as frações de maior tamanho foram a F23, F27 e F46, com massas moleculares de 3.281,26 kDa, 1.875,76 kDa e 3,491,60 kDa, respectivamente.

Fiori-Tutida (2003) em estudo para purificação de eliciadores com capacidade de indução de fitoalexinas em sorgo e soja tratados por frações parcialmente purificadas por cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel a partir do extrato bruto de cogumelos shiitake (*Lentinula edodes*) e Cogumelo do sol (*Agaricus blazei*), verificaram frações com atividade de fitoalexinas de sorgo para a maior das 23 frações obtidas do isolado LE 97/17 (shiitake), pelas quais, apresentam massas moleculares de 25 kDa, 1,3 kDa, 26 kDa e 75 kDa. Por outro lado, as mesmas frações não foram capazes de induzir atividade de fitoalexinas em cotilédones de soja.

Vinale et al. (2008), purificando metabólitos secundários produzidos por cepas de *T. harzianum* e *T. atroviride* para promoção de crescimento vegetal, obtiveram compostos como T22azaphilone, T39butenolide, harzianopyridone, harzianolide, 1-hidroxi-3-metil-antraquinona, 1,8-di-hidroxi-3-metil-antraquinona e 6 pentil- α -pirona produzidos pelas cepas. A separação por cromatografia de camada delgada (TLC) a partir das cepas de *T. harzianum* produziu 11 frações. A fração II, obteve 12 mg de as antraquinonas conhecidos e a fração IV foi ainda mais fracionada utilizando cromatografia flash em gel de sílica, dando 15 mg de harzianolide, para a cepa *T. atroviride* a fração III apresentou 72 mg do composto conhecido 6 pentil- α -pirona.

Os autores testaram esses compostos, quanto a capacidade destas moléculas em induzir respostas de defesa em plantas de tomateiro (*Lycopersicum esculentum*), inoculados com uma suspensão de esporos de *Botrytis cinerea*. Nas plantas tratadas particularmente com 6 pentil- α -pirona, além de reduzir os sintomas da doença, os autores observaram uma expressão de proteínas relacionadas com a patogenicidade (Proteínas-PR), indicando claramente que os metabólitos secundários de *Trichoderma* spp. podem ter um papel tanto na regulação do crescimento das plantas como na ativação das respostas da defesa das plantas.

Considerando que os peptaibols são definidos como peptídeos derivados do metabolismo secundário de fungos e podem variar aproximadamente 4 a 21 aminoácidos (STOPPACHER et

al., 2013), possivelmente as frações F14, F22, F29, F30, F34 e F35 que apresentam baixa massa molecular, confirmando a presença de peptídeos com menor quantidade de aminoácidos. Em especial para as frações F29 e F31 que induziram a faseolina no feijoeiro, podem apresentar ação indutora de peptaibols em sua composição presente no metabólito secundário produzido pelo *Trichoderma* (LI et al., 2014).

Li et al. (2014), descreveram o efeito de peptaibols presente no metabólito secundário produzido por *Trichoderma*. No estudo, avaliou-se o efeito de Trichokonins, que é um peptaibols de controle antimicrobianos produzido pelo *Trichoderma pseudokoningii*, sobre a doença de podridão mole de couve chinesa causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. O tratamento de Trichokonins de 0,3 mg L⁻¹ demonstrou indução de resistência da couve chinesa, indicando que Trichokonins induzir resistência em couve chinesa contra a infecção de podridão mole, através da ativação da via de sinalização do ácido salicílico, demonstra o potencial de *Trichoderma* e peptaibols no controle de doenças de plantas.

Como objetivo de traçar um perfil de produção e identificar peptaibols secretados por uma linhagem de *Trichoderma asperellum*, Brito (2014) purificaram filtrado do antagonista em método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e posterior análise pela técnica de espectrometria de massas por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF). A linhagem de *T. asperellum* pesquisada obteve produção de duas classes de peptaibols, com estruturas primárias de duas Asperelinas e de cinco Trichotoxinas.

Segundo o autor, a maior parte destes peptaibols já havia sido descrito anteriormente em linhagens de *T. viride* e *T. asperellum*, porém, este foi o primeiro relato de alguns destes compostos produzidos por uma linhagem de *T. asperellum* proveniente do solo, sendo necessário futuras análises para a elucidar suas estruturas tridimensionais e atividade destes compostos contra fitopatógenos.

Frente ao exposto, as frações purificadas no presente estudo e testadas posteriormente em bioensaio de indução de fitoalexinas faseolina, demonstraram potencial indutor das mesmas em hipocótilos de feijoeiro. As frações reunidas no estudo apresentaram natureza proteica e glicídica, sendo que a maioria delas, foram de natureza glicoproteica. A informação corrobora com o descrito por Gonçalves-Trevisoli et al. (2016), em que a maioria das frações eliciadoras purificadas apresentaram natureza glicoproteica, ou seja, presença de proteínas e carboidratos nas frações. Do mesmo modo, Braga (2008), em que a maioria das frações foram de natureza glicoproteicas, constituídas da presença de carboidratos das frações purificadas, juntamente com compostos proteicos, sendo assim, formando moléculas eliciadoras glicoproteicas.

Quando uma fração eliciadora purificada tem capacidade de induzir mecanismos de resistência vegetal e são reconhecidos pelos receptores celulares, vários são os sinais enviados e, então, convertidos em respostas celulares. Vários são os genes ativados, que desencadeiam rota que pode ser, separadamente ativado por eliciadores específicos, sendo que cada uma induz a expressão de um conjunto específico de genes, consequentemente à síntese de várias enzimas e, entre elas, estão envolvidas a produção e acúmulo de fitoalexinas (TEMPORAL, 2014; GONÇALVES-TREVISOLI et al. (2016).

4.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA DE FEIJOEIRO TRATADO COM FRAÇÕES DE FILTRADO DE CULTURA E EXTRATO DE MICÉLIO DE *Trichoderma longibrachiatum* CONTRA ANTRACNOSE

4.3.1 Enzimas Relacionadas a Defesa de Plantas

4.3.1.1 Atividade de peroxidase

A atividade de POX apresentou resultado significativo para a 2ª coleta (72 horas após a aplicação das frações) e 3ª coleta (72 horas após a inoculação do patógeno), como mostra a Tabela 6. Houve aumento da expressão enzimática nas plantas pela forma de aplicação folha tratada (FT) em relação a folha não tratada (FNT). Na 3ª coleta, pode-se observar expressão significativa entre os tratamentos na FNT e FT. Do mesmo modo para FT, verifica-se uma alta expressão da atividade de POX entre os tratamentos testados em relação a forma de aplicação FNT.

Tabela 6 - Atividade de peroxidase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de *Trichoderma longibrachiatum* (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).

Tratamento (Frações)	Atividade de peroxidase (U.E. min ⁻¹ mg proteína ⁻¹)					
	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	FNT	FT	FNT	FT	FNT	FT
F 17	4.222 Aa	4.222 Aa	5.694 Ba	39.057 Aa	43.283 Aa	77.249 Aa
F 23	3.910 Aa	3.910 Aa	14.022 Ba	67.159 Aa	11.406 Ab	21.242 Ab
F 25	5.745 Aa	5.745 Aa	14.240 Ba	81.188 Aa	22.224 Bb	99.193 Aa
F 27	6.455 Aa	6.455 Aa	6.264 Aa	23.095 Aa	8.206 Ab	15.627 Ab
F 29	6.777 Aa	6.777 Aa	5.519 Aa	32.902 Aa	16.606 Ab	25.470 Ab
F 31	7.130 Aa	7.130 Aa	11.507 Ba	60.157 Aa	49.140 Aa	69.408 Aa
F 38	3.320 Aa	3.320 Aa	3.233 Ba	50.044 Aa	22.402 Ab	52.070 Aa
F 46	4.118 Aa	4.118 Aa	12.235 Ba	88.684 Aa	17.246 Bb	62.585 Aa
ASM/TAP ⁴	3.098 Aa	3.098 Aa	5.045 Ba	81.125 Aa	48.766 Aa	50.040 Aa
TAP ⁵	2.398 Aa	2.398 Aa	12.176 Aa	56.297 Aa	41.842 Aa	14.521 Ab
CV (%)	59,70					

¹1ª coleta, sem aplicação dos tratamentos; ²2ª coleta, 72 horas após a aplicação dos tratamentos; ³3ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno; ⁴ASM/TAP: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i.a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0.05 M, (pH7,0), utilizado como indutor de resistência padrão; ⁵TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH7,0). *Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelos testes de Tukey e Scott-Knott, respectivamente, a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

Para a forma de aplicação FT da 2ª coleta, as frações F17, F23, F25, F31, F38, F46 e ASM/TAP apresentaram uma expressão da atividade de POX superior em relação à forma de aplicação FNT. As frações F25 e F46 demonstraram expressão superior ao do ASM/TAP, o qual, foi utilizado como indutor de resistência padrão nas plantas de feijoeiro, sendo esta expressão de 81.188 U.E. min^{-1} mg proteína $^{-1}$ e 88.684 U.E. min^{-1} mg proteína $^{-1}$ em relação a expressão de ASM/TAP, que foi de 81.125 U.E. min^{-1} mg proteína $^{-1}$, este aumento foi em torno de 0,07% e 9,31% respectivamente.

Para a FNT da 3ª coleta, verifica-se um aumento da atividade de POX entre os tratamentos, destacando-se as frações F17 e F31, que apresentaram valores semelhantes ao tratamento ASM/TAP, porém, o tratamento controle também proporcionou a expressão de POX nas plantas. Em relação a FT, as frações F17, F25, F31, F38, F46 e ASM/TAP, proporcionaram alta expressão enzimática em 431%, 583%, 377%, 258%, 330% e 244%, para os respectivos tratamentos em comparação ao controle (TAP). Sendo assim, para a FNT, a atividade da enzima aumentou em função da inoculação do patógeno, porém, não aumentou pelo efeito sistêmico da aplicação das frações na FT. Já para a FT, as frações aplicadas proporcionaram maior atividade de POX na folha do feijoeiro, 72 horas após a inoculação do patógeno, demonstrando efeito de indução semelhante ao tratamento ASM/TAP.

4.3.1.2 Atividade de polifenoloxidase

Para a atividade de PFO em plantas de feijoeiro, houve aumento significativo para a 3ª coleta (72 horas após a inoculação do patógeno), na forma de aplicação FT, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Atividade de polifenoloxidase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de *Trichoderma longibrachiatum* (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).

Tratamento (Frações)	Atividade de polifenoloxidase (U.E. min ⁻¹ mg proteína ⁻¹)					
	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	FNT	FT	FNT	FT	FNT	FT
F 17	63 Aa	63 Aa	470 Aa	318 Aa	1.415 Aa	3.350 Aa
F 23	57 Aa	57 Aa	798 Aa	764 Aa	992 Aa	910 Ab
F 25	95 Aa	95 Aa	513 Aa	942 Aa	894 Ba	4.041 Aa
F 27	68 Aa	68 Aa	635 Aa	369 Aa	441 Aa	686 Ab
F 29	158 Aa	158 Aa	373 Aa	525 Aa	786 Aa	1.307 Ab
F 31	97 Aa	97 Aa	420 Aa	894 Aa	1.513 Aa	2.170 Aa
F 38	67 Aa	67 Aa	281 Aa	339 Aa	905 Aa	1.462 Ab
F 46	70 Aa	70 Aa	557 Aa	633 Aa	1.045 Aa	1.970 Aa
ASM/TAP ⁴	159 Aa	159 Aa	845 Aa	422 Aa	1.482 Aa	2.302 Aa
TAP ⁵	59 Aa	59 Aa	735 Aa	416 Aa	901 Aa	755 Ab
CV (%)	69,93					

¹1ª coleta, sem aplicação dos tratamentos; ²2ª coleta, 72 horas após a aplicação dos tratamentos; ³3ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno; ⁴ASM/TAP: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i,a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0.05 M, (pH7,0), utilizado como indutor de resistência padrão; ⁵TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH7,0). *Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelos testes de Tukey e Scott-Knott, respectivamente, a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

Na forma de aplicação FT da 3ª coleta, os tratamentos F17, F25, F31, F46 e ASM/TAP proporcionaram aumento significativo da atividade da enzima PFO entre os demais tratamentos, a qual, pode-se observar para as frações F17 e F25, uma alta expressão da atividade enzimática comparado com os demais, sendo que, em relação ao ASM/TAP, essa atividade aumentou em 45% e 75%. Já em relação ao controle (TAP), as frações F17 e F25 proporcionaram maior aumento de 343% e 435% da atividade de PFO na planta de feijão na 3ª coleta (72 horas após a inoculação do patógeno), promovendo uma indução silenciosa (*priming*), que somente manifestada na presença do patógeno.

4.3.1.3 Atividade de catalase

Para atividade da enzima CAT (Tabela 8), não foi possível observar resultados significativos nas expressões enzimáticas entre os tratamentos, como também entre a forma de aplicação FNT e FT. Porém, pode-se verificar um aumento da expressão de CAT na forma de

aplicação FT da 2ª coleta e na 3ª coleta, no entanto, em relação à FNT, pode-se observar menor expressão enzimática.

Tabela 8 - Atividade de catalase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de *Trichoderma longibrachiatum* (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).

Tratamento (Frações)	Atividade de Catalase (U.E. min ⁻¹ mg proteína ⁻¹)					
	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	FNT	FT	FNT	FT	FNT	FT
F 17	105	105	2.110	243	661	1.638
F 23	209	209	1.636	3.232	1.254	645
F 25	346	346	2.356	3.476	1.166	891
F 27	412	412	1.781	3.094	236	717
F 29	892	892	197	2.514	149	444
F 31	281	281	250	3.303	893	1.875
F 38	95	95	1.404	1.851	549	2.488
F 46	143	143	3.108	2.197	837	2.324
ASM/TAP ⁴	942	942	1.160	2.315	558	578
TAP ⁵	305	305	4.510	394	1.266	429
CV (%)	151, 76					

¹1ª coleta, sem aplicação dos tratamentos; ²2ª coleta, 72 horas após a aplicação dos tratamentos; ³3ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno; ⁴ASM/TAP: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i.a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0.05 M, (pH7,0), utilizado como indutor de resistência padrão; ⁵TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH7,0). *Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelos testes de Tukey e Scott-Knott, respectivamente, a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

Para a 2ª coleta na FT, pode-se observar para os tratamentos F23, F25, F27, F29, F31, F38, F46 e ASM/TAP, aumento da atividade de CAT em até 782% superior ao controle, como é o caso da fração F25 representado por 3.476 U.E. min⁻¹ mg proteína⁻¹. Porém, para à FNT, o controle apresentou 4.510 U.E. min⁻¹ mg proteína⁻¹, sendo assim 288% superior ao tratamento indutor de resistência padrão ASM/TAP. Esse aumento pode ter ocorrido por algum fator do ambiente, como estresse hídrico ou injúria causada por um inseto, alterando assim, o metabolismo da planta e consequentemente, elevou o aumento da atividade de CAT no controle.

Na 3ª coleta, podemos observar um aumento de CAT para os tratamentos F17, F31, F38 e F46 na forma de aplicação FT. Para a fração F38, observa-se uma expressão da atividade de CAT em torno de 330% e 345% superior em relação ao ASM/TAP e controle (TAP), respectivamente. Porém, mesmo não demonstrando resultados significativos pelo teste, esse aumento da atividade enzimática pode estar relacionado na ativação da indução de resistência

da planta, a partir das frações tratadas que observa-se expressão, pois a 3ª coleta foi realizada 72 horas após a inoculação do patógeno, neste momento a planta reagiu em sua defesa ao ataque do patógeno, porém, esse aumento não foi suficiente na planta, ao modo que, essa enzima é ativada por diferentes agentes de estresses ambientais que podem ter mascarado a expressão dos resultados estatisticamente para a atividade de CAT.

4.3.1.4 Atividade de fenilalanina amônia-liase

Para atividade de FAL as expressões enzimáticas não demonstraram resultado significativo entre os tratamentos, como também, em relação à forma de aplicação FNT e FT. Porém, observando os dados enzimáticos da Tabela 9, pode-se verificar um aumento da expressão de FAL na 2ª coleta e 3ª coleta em relação aos valores da 1ª coleta.

Tabela 9 - Atividade de fenilalanina amônia-liase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de *Trichoderma longibrachiatum* (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).

Atividade de fenilalanina amônia-liase (mg ácido <i>trans</i> -cinâmico h ⁻¹ mg proteína ⁻¹)						
Tratamento (Frações)	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	FNT	FT	FNT	FT	FNT	FT
F 17	0,066	0,066	0,187	0,060	0,120	0,261
F 23	0,071	0,071	0,211	0,482	0,226	0,071
F 25	0,021	0,021	0,237	0,343	0,131	0,087
F 27	0,009	0,009	0,307	0,286	0,041	0,094
F 29	0,035	0,035	0,353	0,168	0,072	0,050
F 31	0,029	0,029	0,220	0,311	0,132	0,262
F 38	0,024	0,024	0,194	0,298	0,123	0,011
F 46	0,008	0,008	0,297	0,108	0,082	0,227
ASM/TAP ⁴	0,044	0,044	0,088	0,273	0,087	0,043
TAP ⁵	0,000	0,000	0,179	0,137	0,057	0,052
CV (%)	75,58					

¹1ª coleta, sem aplicação dos tratamentos; ²2ª coleta, 72 horas após a aplicação dos tratamentos; ³3ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno; ⁴ASM/TAP: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i.a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0.05 M, (pH7,0), utilizado como indutor de resistência padrão; ⁵TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH7,0). *Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelos testes de Tukey e Scott-Knott, respectivamente, a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x}$.

Ao analisar a FNT da 2ª coleta, a fração F17, F27, F29 e F46, apresentaram valores de 0,187, 0,307, 0,353 e 0,297 mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹ que foram superiores ao do ASM/TAP e controle (TAP) (0,088 e 0,179 mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹), demonstrando características eliciadoras sistêmicas. Do mesmo modo, para FT, os tratamentos F23, F25, F31, F38 e ASM/TAP, demonstraram um aumento de FAL em relação à FNT, com valor de 0,482, 0,343, 0,311, 0,298 e 0,273 mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹, que foram superiores ao controle (0,137 mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹).

Para a FNT da 3ª coleta, os tratamentos F23, F25 e F38, com valores de 0,226, 0,131 e 0,123 mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹, que foram superiores em relação ao ASM/TAP e controle (TAP), com valor de 0,087 e 0,057 mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹. Porém, para à FT, os tratamentos F17, F31 e F46 com 0,261, 0,262 e 0,227 mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹, respectivamente, apresentaram valores maiores em relação ao ASM/TAP e controle (TAP), com valores de 0,043 e 0,052 mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹, em comparação na folha que não recebeu os tratamentos (FNT).

4.3.1.5 Atividade de β -1,3 glucanase

Para atividade de β -GASE (Tabela 10) observa-se resultado significativo na FT na 2ª coleta e 3ª coleta em relação a FNT, como também, entre os tratamentos testados. Na FT da 2ª coleta, a fração F38 (0,915 mg glicose mL⁻¹ h⁻¹ mg proteína⁻¹), apresentou valor semelhante ao ASM/TAP (0,947 mg glicose mL⁻¹ h⁻¹ mg proteína⁻¹), e superior à FNT. Do mesmo modo, na FT, os tratamentos F38 e F46 demonstraram aumento da atividade, com valores semelhante de 0,915 e 0,715 mg glicose mL⁻¹ h⁻¹ mg proteína⁻¹, ao valor do ASM/TAP de 0,947 mg glicose mL⁻¹ h⁻¹ mg proteína⁻¹.

Tabela 10 - Atividade de β -1,3 glucanase em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação de frações purificadas de *Trichoderma longibrachiatum* (folha não tratada (FNT); folha tratada (FT)).

Tratamento (Frações)	Atividade de β -1,3 glucanase (mg glicose mL ⁻¹ h ⁻¹ mg proteína ⁻¹)					
	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	FNT	FT	FNT	FT	FNT	FT
F 17	0,024 Aa	0,024 Aa	0,073 Aa	0,056 Ab	0,315 Ba	0,950 Aa
F 23	0,040 Aa	0,040 Aa	0,400 Aa	0,368 Ab	0,564 Aa	0,185 Ab
F 25	0,099 Aa	0,099 Aa	0,309 Aa	0,276 Ab	0,267 Aa	0,765 Aa
F 27	0,083 Aa	0,083 Aa	0,240 Aa	0,054 Ab	0,142 Aa	0,252 Ab
F 29	0,188 Aa	0,188 Aa	0,096 Aa	0,300 Ab	0,466 Aa	0,297 Ab
F 31	0,090 Aa	0,090 Aa	0,035 Aa	0,339 Ab	0,661 Aa	0,768 Aa
F 38	0,035 Aa	0,035 Aa	0,122 Ba	0,915 Aa	0,261 Aa	0,212 Ab
F 46	0,010 Aa	0,010 Aa	0,186 Aa	0,715 Aa	0,322 Aa	0,660 Ab
ASM/TAP ⁴	0,045 Aa	0,045 Aa	0,636 Aa	0,947 Aa	0,299 Aa	0,750 Aa
TAP ⁵	0,023 Aa	0,023 Aa	0,061 Aa	0,087 Ab	0,281 Aa	0,521 Ab
CV (%)	88,54					

¹1ª coleta, sem aplicação dos tratamentos; ²2ª coleta, 72 horas após a aplicação dos tratamentos; ³3ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno; ⁴ASM/TAP: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i,a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0.05 M, (pH7,0), utilizado como indutor de resistência padrão; ⁵TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH7,0). *Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelos testes de Tukey e Scott-Knott, respectivamente, a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x}$.

Para a fração F17, na forma de aplicação FT, observa-se uma expressão significativa da atividade de β -GASE na 3ª coleta, com valor de 0,950 mg glicose mL⁻¹ h⁻¹ mg proteína⁻¹ contra a expressão de 0,315 mg glicose mL⁻¹ h⁻¹ mg proteína⁻¹ da forma de aplicação FNT, sendo esse aumento relacionado após a inoculação do patógeno. Portanto, sugere-se que o referido tratamento seja capaz de ativar os mecanismos de resistência da planta, levando o aumento da β -GASE. O mesmo pode ser atribuído para FT, a enzima teve um aumento expressivo da enzima pelas frações F17, F25, F31 e ASM/TAP, com 0,950, 0,765, 0,768 e 0,750 mg glicose mL⁻¹ h⁻¹ mg proteína⁻¹, respectivamente.

De modo geral, as frações F17, F25, F31, F38 e F46 apresentaram efetividade para o aumento da atividade de β -GASE, na planta, sendo suas médias superiores das outras frações testadas em relação ao ASM/TAP (utilizado como tratamento indutor de resistência padrão). Neste sentido, pode-se dizer que as frações obtidas possuem ação eliciadora na planta e possuem característica promissora para ativação dos mecanismos de resistência no feijoeiro contra o *C. lindemuthianum*.

4.4 SEVERIDADE DA DOENÇA

As avaliações da severidade foram realizadas nos tratamentos testados (frações), aos 5 dias após a inoculação do patógeno (*C. lindemuthianum*), no par de folhas primárias, considerando a forma do tratamento foliar (FNT e FT), item 3.9.1, utilizando a escala diagramática para antracnose do feijoeiro.

A severidade de antracnose em plantas de feijoeiro através do tratamento das frações de FTC e EXM purificadas (F17, F23, F25, F27, F29, F31, F38 e F46), obtidas da CFG que induziram a atividade de faseolina e selecionadas a partir do bioensaios de fitoalexinas (item 4.2), apresentaram diferença significativa entre os tratamentos testados e interação para FNT e FT, como apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 - Severidade em plantas de feijoeiro tratadas pela aplicação em folha não tratada (FNT) e folha tratada (FT) de frações purificadas a partir de filtrado de cultura e extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum*.

Tratamento (Frações)	Severidade (%)	
	FNT	FT
F 17	12,00 Aa	7,75 Aa
F 23	16,87 Ba	6,50 Aa
F 25	19,00 Bb	11,00 Ab
F 27	14,00 Ba	7,00 Aa
F 29	12,50 Aa	11,00 Ab
F 31	18,62 Ab	15,12 Ab
F 38	14,37 Aa	12,62 Ab
F 46	20,67 Ab	13,75 Ab
ASM/TAP ⁴	14,50 Ba	7,00 Aa
TAP ⁵	21,50 Ab	18,75 Ab
CV (%)	15,91	

¹ASM/TAP: Acibenzolar-S-Metil (50 mg i.a, L⁻¹) diluído em tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH7,0), utilizado como indutor de resistência padrão; ²TAP: Solução tampão fosfato de sódio 0.05 M (pH7,0).

*Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelos testes de Tukey e Scott-Knott, respectivamente, a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

Para o fator FNT, os tratamentos F17, F23, F27, F29, F38 e ASM/TAP, foram considerados no grupo I pelo teste de médias, apresentando baixa intensidade da doença, sendo capazes de reduzir a severidade em até 44,18%, 21,53%, 34,88%, 41,86%, 33,16% para as respectivas frações e redução de 23,55% para ASM/TAP em relação ao controle (TAP). O

tratamento F17 se comportou como eficiente na redução da severidade da antracnose. Já para os tratamentos F25, F31, F46 e controle, não apresentaram diferença significativa sendo considerados no grupo II, de modo que seus valores foram próximos ao do controle.

Para as folhas tratadas (FT), os tratamentos F17, F23, F27 e ASM/TAP foram dispostos no grupo I, podendo ser considerados promissores reduzindo a severidade da doença em 58,66%, 65,33% e 62,66% para as respectivas frações e 62,66% para tratamento indutor de resistência padrão (ASM/TAP), quando comparado esses valores ao controle. Como pode ser visualizado na F23, a média de severidade ficou em torno de 65,33%, sendo assim, o tratamento que mais reduziu a ocorrência da doença. Para as frações F25, F29, F31, F38, F46 e o tratamento controle não foram considerados significativos pelo teste de média, estando presentes no grupo II.

Os resultados deste estudo não demonstraram expressão das atividades enzimáticas de CAT e FAL para os tratamentos testados. Porém, POX, PFO e β -GNASE apresentaram diferença estatística, demonstrando efeito das moléculas eliciadoras presentes nas frações testadas e consequentemente, aumento da expressão da atividade enzimática em relação da 2ª coleta (72 horas após a aplicação das frações) e 3ª coleta (72 horas após a inoculação do patógeno) pela aplicação dos tratamentos, a partir das frações purificadas de *T. longibrachiatum* através da forma de aplicação na folha não tratada (FNT) e folha tratada (FT) em plantas de feijoeiro. Tais valores das atividades enzimáticas apresentaram maiores expressões para a FT, onde ocorreu a aplicação da fração sobre a folha primária do feijoeiro.

Para a atividade de POX, observou-se expressão enzimática superior para os tratamentos aplicados na forma FT (local), tanto para a 2ª coleta, 72 horas após a aplicação das frações quando para 3ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno. As frações F25 e F46 demonstraram expressão superior de 0,07% e 9,31%, em relação ao tratamento indutor padrão ASM/TAP na 2ª coleta, e as frações F25 e F46 apresentaram atividade de 583% e 330% superior comparado ao controle, ambos na FT.

A atividade da enzima aumentou em função da inoculação do patógeno, na aplicação local (FT), proporcionando maior atividade de POX, porém não aumentou pelo efeito sistêmico na planta, pois as frações aplicadas não proporcionaram expressão significativas na FNT, mas foram expressivas na aplicação FT (local), 72 horas após a inoculação do patógeno, demonstrando efeito de indução semelhante ao tratamento ASM/TAP. Da mesma forma, Di Piero (2003) relatou que o aumento da atividade local (folha tratada) de POX em pepino induzido por frações de extrato de shiitake (*Lentinula edodes*), foi observado no terceiro e sexto dia após o tratamento com o eliciador.

O período de tempo é necessário para o redirecionamento de metabólitos na célula, com predomínio de processos anabólicos e formação de isoformas mais ativas das enzimas formadas naquela determinada condição (LARCHER, 2004).

Dilley (2014), aplicando metabólitos secundários de diferentes isolados de *Trichoderma* spp., via folha em plantas de feijoeiro na proteção do patógeno *C. lindemuthianum*, constatou redução da atividade de POX na 1ª coleta (sem aplicação dos metabolitos), em relação a 2ª avaliação (terceiro dia após aplicação dos metabolitos) e 3ª avaliação (terceiro dia após inoculação do patógeno), após a inoculação do patógeno, não apresentando evidências significativa de ativação da enzima.

A enzima peroxidase está envolvida nos processos de suberificação, lignificação, catabolismo da auxina (HIRAGA et al., 2001), produção de fitoalexinas e respostas de hipersensibilidade, grande parte destes, envolvidos na defesa vegetal contra a infecção por patógenos (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

A atividade de POX é frequentemente aumentada em resposta aos estresses na planta, ao ataque de patógenos e aos tratamentos com indutores, motivos pelos quais são frequentemente utilizadas como marcadores enzimáticos para estudos de resistência induzida (COSTA et al., 2010). A expressão desta enzima, está intimamente envolvida no processo de lignificação, e este processo atua como uma barreira contra invasões de patógenos, em resposta a indução dos mecanismos de defesa de plantas a infecção, indicando papel definitivo na supressão do desenvolvimento da doença nos tecidos da planta (EL-RAHMAN; MOHAMED, 2014).

Di Piero, Wulff e Pascholati (2006) testaram frações purificadas do fungo shiitake (*L. edodes*) e avaliaram a atividade de POX no controle de *Colletotrichum lagenarium* em mudas de pepino. Uma fração contendo 34% de composto proteico provocou o acúmulo de peroxidases nos cotilédones de pepino, bem como reduziu a severidade de antracnose.

Schaffrath, Scheinpflug e Reisener (1995), obtendo fração glicoproteínas e utilização de uma quitina purificadas, testando a capacidade de induzir resistência em plantas de arroz. É o caso do eliciador de natureza glicoproteicas, purificada a partir de micélio de *Pyricularia oryzae*, agente causal da brusone em arroz. O tratamento prévio das folhas de arroz com o eliciador aumentou a atividades de POX, cinamil-álcool desidrogenase e lipoxigenases e consequentemente, reduzindo os sintomas da doença nas folhas tratadas.

Para a severidade, considerando-se que houve redução significativa da antracnose quando aplicadas as frações F17, F23, F27 e ASM/TAP nas plantas de feijoeiro, pode-se dizer que o aumento expressivo da atividade desta enzima esteja relacionado ao controle da doença.

O comportamento da atividade de PFO diferiu do comportamento apresentando pela atividade de POX. Enquanto que a atividade de PFO foi maior para a FT somente na 3ª coleta, a atividade de POX para FT foi superior 72 horas após a aplicação das frações (2ª coleta) e 72 horas após a inoculação do patógeno (3ª coleta). Pode se dizer que a atividade de POX aumentou ao longo do tempo após a aplicação das frações e a atividade de PFO teve a expressão aumentada em resposta do mecanismo de “*priming*” ou em função da chegada do patógeno. As respostas deste mecanismo incluem explosão oxidativa, levando um rápido acúmulo de espécies ativas de oxigênio, a deposição de compostos de reforço da parede celular e aumento da transcrição de genes de defesa, como as proteínas-RPs (GOELLNER; CONRATH, 2008; MACHINANDIARENA et al., 2012; MONTEIRO, 2014).

Resultado semelhante ocorreu com Pereira et al. (2008), trabalhando com quitosana extraída de *Trichoderma* sp. e com filtrado de micélio de *Rhizopus* sp., que obtiveram efeito protetor em plantas de cacaueteiro, observando que a aplicação desses indutores bióticos é capaz de promover o aumento da atividade enzimática de PFO as 96 horas (quatro dias) após a pulverização e para POX aos 192 horas (oito dias) após a pulverização, reduzindo a murcha-de-verticílio do cacaueteiro.

Ao contrário de Dilley (2014), que aplicando metabolitos secundários de espécies de *Trichoderma* em folha de feijoeiro contra antracnose, não constatou aumento da atividade de PFO para a 1ª coleta (sem aplicação do metabólito) e 3ª coleta (72 horas após inoculação do patógeno). Porém constatou supressão da atividade enzimática para a 2ª coleta (72 horas após aplicação dos exsudatos), em que um isolado (TI1- *T. virens*), apresentou a tendência de supressão, diferindo dos demais isolados de *Trichoderma* spp. avaliados.

Li et al. (2014), estudando o mecanismo envolvido do composto eliciador Trichokoninas, uma espécie de Peptaibols secretadas por *Trichoderma pseudokoningii*, induziram resistência de couve chinesa (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) contra a infecção de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* através da ativação da via de sinalização de ácido salicílico. O tratamento com Tricokoninas causou um aumento rápido e significativo nas atividades de CAT, POX e PFO nas folhas de plantas tratadas, níveis máximos após o tratamento e depois reduziu para os níveis semelhantes aos do controle, após 2 dias do tratamento.

A atividade de PFO pode geralmente estar presente em concentrações elevadas em tecidos infectados, promovendo a degradação oxidativa de compostos fenólicos próximos ao local da lesão provocada pelo patógeno, resultando no aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas (AGRIOS, 2005).

Para a atividade de CAT e FAL, mesmo não demonstrando resultados significativos para as enzimas, porém observa-se variação das mesmas.

Para CAT, verifica-se tendência de aumento na atividade quando aplicado diretamente na folha (FT) na 2ª coleta (72 horas após a aplicação das frações) e 3ª coleta (72 horas após a inoculação do patógeno), possivelmente, desencadeada pela explosão oxidativa após a percepção, pela planta, dos sinais de virulência do patógeno (RESENDE et al., 2003). A redução na atividade da CAT resulta no acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células, o que pode provocar morte celular, caracterizada uma resposta de hipersensibilidade (SOARES; MACHADO, 2007).

Para atividade de FAL, no geral, verifica-se tendência de aumento da expressão enzimática na planta após aplicação das frações na 2ª coleta. Logo após, houve uma diminuição da atividade de FAL, 72 horas após a inoculação do patógeno da 3ª coleta. Pode-se dizer que as frações utilizadas no tratamento não demonstraram grandes alterações da atividade enzimática, que pudesse confirmar a ação eliciadora na planta pela análise estatística.

Pelos resultados apresentados neste trabalho, as atividades dessas enzimas talvez não estejam necessariamente envolvidas no processo, mas outros mecanismos de defesa podem estar atuando na indução de resistência das plantas de feijoeiro (DILDEY, 2014).

O mesmo pôde ser observado por KUHN (2007) em feijoeiros tratados com *B. cereus* e ASM. Segundo o autor, não houve alterações da atividade de FAL e PFO em função dos indutores na análise quantitativa, o que poderia significar que toda a rota dos fenilpropanóides não sofreu alterações como, por exemplo, os mecanismos de síntese de lignina, quinonas e compostos fenólicos, entre outros. A FAL, codificada pelo gene *PAL*, é uma enzima chave no metabolismo dos fenilpropanóides, que resultará em compostos como fitoalexinas, compostos fenólicos e lignina, conferindo maior resistência à parede celular das plantas (RAES et al., 2003).

Os fenilpropanóides são encontrados naturalmente em todas as plantas, e possuem a função principal de proteção contra ataque de microrganismos patogênicos. Na resposta à tentativa do patógeno em ingressar na planta, outros compostos fenólicos podem ser formados (LO; NICHOLSON, 2008). Os compostos fenólicos são compostos por fenóis simples, glicosilados, ácidos fenol-carboxílicos, derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, ligninas, flavonóides (flavonas, antocianinas e catequinas), α -pirones (coumarinas e isocoumarinas) e quinonas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Para atividade de β -GASE, de modo geral, as frações F17, F25, F31, F38 e F46 apresentaram efetividade para o aumento da atividade de β -GASE, quando aplicados na FT,

sendo suas médias superiores das outras frações testadas em relação ao ASM/TAP (utilizado como tratamento indutor de resistência padrão). Neste sentido, pode-se dizer que as frações possuem ação eliciadora na planta e possuem característica promissora para ativação dos mecanismos de resistência no feijoeiro contra o *C. lindemuthianum*.

É possível observar que as frações F17, F25 e F31 induziram aumento da atividade de β -GASE. Comparando a 2ª coleta (72 horas após aplicação das frações) e 3ª coleta (72 horas após a inoculação do patógeno) esta foi possivelmente ativada em resposta do mecanismo de “*priming*” na planta. Porém, para F38 e F46 o efeito foi pela ativação direta do mecanismo de indução da atividade de β -GASE, semelhante ao ASM/TAP, que é capaz de ativar diretamente a planta, sem deixar em estado de “*priming*” (GOELLNER; CONRATH, 2008).

Em trabalho realizado por Di Piero e Garda (2008), utilizando quitosana no controle da antracnose (*C. lindemuthianum*) em feijoeiro-comum, observou-se que a quitosana ativou a defesa das plantas, aumentando a atividade da enzima β -GASE e reduzindo a severidade da antracnose. Também foi observado que com a aplicação da quitosana em feijoeiro, o metabolismo relacionado a resistência das plantas foi alterado e provocou o aumento na atividade de β GASE, em folhas previamente tratadas.

As enzimas β -GASEs, FAL e PFO são importantes para o metabolismo de defesa das plantas contra o ataque de patógenos. A β -GASE é uma proteína PR importante como ação antimicrobiana capaz de hidrolisar parede celular dos fungos (DURRANT; DONG, 2004). Enzimas de defesa como β -GASE possuem papel de grande importância no processo de resistência, as quais exercem sua função conjuntamente com quitinases, sendo as principais hidrolases do mecanismo de defesa, contudo as quitinases não foram avaliadas neste trabalho (DILDEY, 2014).

Para severidade, pode-se verificar sistemicidade para as frações F17, F23, F27, F29 e F38 de mesma magnitude ou magnitude inferior ao do ASM/TAP (utilizado como tratamento indutor de resistência padrão), quando observado na folha não tratada (FNT), podendo ser eficientes, apresentando reduções de severidade em 44,18%, 22,53%, 34,88%, 41,86% e 33,16% das plantas de feijoeiro em relação ao controle (TAP). Desse modo, para a FT, quando aplicadas as frações F17, F23 e F27, houve reduções de 58,66%, 65,33% e 62,66% na severidade em relação ao controle (TAP), sendo as frações apresentaram magnitude de indução semelhante ao ASM/TAP, podendo ser consideradas moléculas promissoras para indução de resistência, sendo efetivas na ação eliciadora para controle da doença antracnose do feijoeiro.

Zanardo et al. (2009), estudaram frações agrupadas em cromatografia de troca aniônica do extrato bruto autoclavado de *S. cerevisiae*, observaram que as frações apresentaram maiores

concentrações de carboidratos em relação ao conteúdo de proteína e reduziram em até 81% a severidade da antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) em cotilédones de pepino comparado ao tratamento controle.

Para Vinale et al. (2008), trabalhando com compostos conhecidos, caracterizados a partir de filtrados de cultura de diferentes cepas de *Trichoderma* (*T. harzianum*, *T. atroviride* e *T. harzianum*), testaram os efeitos sobre o crescimento e indução de mecanismos de defesa em plantas de canola (*Brassica napus*). Houve redução de 16% na severidade da doença nos cotilédones, com a aplicação do composto 6 pentil- α -pirona antes da inoculação com *Leptosphaeria maculans*. O mesmo pode ser observado para aplicação de harzianopyridone e T22azaphilone que reduziram ambos em 9,5%, enquanto que com harzianolide a redução foi de 13% e para antraquinonas, foi registrado menor efeito com redução de 8%.

Os mesmos autores testaram os compostos em mofo cinzento causado por *Bacillus cinerea* em cotilédones de tomateiro. Os tratamentos reduziram os sintomas em torno de 18%, na aplicação de 6 pentil- α -pirona, 17% para harzianopyridone; 15% para harzianolide e 10% de redução de severidade na aplicação de antraquinonas.

Em plantas de feijoeiro Di Piero e Garda (2008), realizaram a pulverização preventiva do polissacarídeo quitosana nas plantas e observaram redução em mais de 70% da severidade da antracnose (*C. lindemuthianum*), quando se aplicou 9 mg por planta, 4 dias antes da inoculação. Os autores relatam que o efeito foi relacionado na capacidade de atuar contra o patógeno, provocando aumento da atividade de enzima de β -1,3 glucanases nas folhas previamente tratadas. De acordo com Aguiar, et al. (2014), as proteínas relacionadas à patogênese podem ter sua síntese e acúmulo nas células da planta, incrementadas pela aplicação do polissacarídeo quitosana.

Vinale et al. (2008), os metabolitos de *Trichoderma* podem atuar como eliciadores do sistema de defesa da planta, aumentando a resistência das plantas contra o stress biótico, tais como a invasão fungos e bactérias. Diferentes classes de compostos podem atuar como eliciadores de resistência nas plantas. Estas moléculas podem incluir: proteínas com atividade enzimática, tais como endoxilanase; genes específicos capazes de induzir processo de defesa nas plantas ou compostos que são libertados da parede celular de fungos ou plantas (HARMAN et al., 2004).

Outras respostas de defesa, podem ter sido ativados por moléculas eliciadoras que podem ter contribuído na redução da área lesionada, como a ativação das espécies reativas de oxigênio (EAOs), reação de hipersensibilidade, superóxido dismutase e quitinases, não quantificadas neste trabalho (DURRANT; DONG, 2004; RUOCCO et al., 2015).

Yedidia; Benhamou e Chet (1999) demonstraram que fungos do gênero *Trichoderma* induzem também a expressão de outras proteínas e compostos de defesa em plantas hospedeiras, como as POX, compostos fenólicos e substâncias que aumentam a resistência mecânica da célula hospedeira, desta forma, podem inibir ou restringir a invasão de tecidos vegetais pelo patógeno.

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS

Ao abordar a correlação dos resultados expressos, as oito frações testadas no estudo para o efeito sistêmico no fator de aplicação folha não tratada (FNT) e folha tratada (FT), apresentaram resultados discrepantes, porém nas observações, é possível verificar o efeito local para folha tratada (FT) tanto em relação a atividade das enzimas relacionadas à indução de resistência, como para a redução da severidade da doença avaliados no trabalho.

A fração F23 proveniente do filtrado de cultura (FTC) e de natureza proteica foi a que proporcionou maior redução de severidade da doença, reduzindo 65,33% no fator FT, porém não se mostrou eficiente em relação a resposta de indução de resistência para as atividades enzimáticas testadas. O mesmo ocorreu para a F27 proveniente EXM (glicoproteica), que proporcionou a segunda maior redução de severidade de 62,66% no fator FT, o mesmo não foi eficiente em relação a atividade enzimática. Possivelmente a indução de resistência ocorreu através da ativação de outros mecanismos não avaliados no estudo, como por exemplo, lipoxigenases, quitinases e compostos fenólicos. Segundo Romeiro (2007), a ação das lipoxigenases contribuem para a indução de defesa das plantas, podem levar a inibição do crescimento do patógeno, induzir a síntese de fitoalexinas, a peroxidação de lipídios da membrana e a resposta de hipersensibilidade.

Para a fração F17, a mesma, apresentou a terceira maior redução de severidade da doença em 58,66% no fator FT, proporcionou aumento da atividade das enzimas POX, PFO e β -GASE na 3ª coleta, ou seja, 72 horas após a inoculação do patógeno, sendo esta fração proveniente de FTC e de natureza glicoproteica. Deste modo, a POX está envolvida no processo de lignificação, e este processo atua como uma barreira contra invasão e desenvolvimento dos patógenos (EL-RAHMAN; MOHAMED, 2014). Sabe-se que a enzima PFO está envolvida em reações de oxidação, a qual oxida compostos como ácido ascórbico e fenóis na planta (AGRIOS, 2005). A enzima β -GASE, é uma Proteína RP com ação antimicrobiana, que é capaz de hidrolisar células da parede celular de fungos, consequentemente, aumentando assim, o grau

de resistência à infecção na planta de feijoeiro causado pelo patógeno, como é o caso do *C. lindemuthianum* (DURRANT; DONG, 2004).

As frações F17, F25, F31, F38 e F46 foram as que proporcionaram aumento da expressão das enzimas POX, PFO e β -GASE na forma de aplicação folha tratada (FT) na 3ª coleta, ou seja, 72h após a inoculação do patógeno. Porém, as frações F17 e F31 foram as únicas frações que proporcionaram o aumento da atividade de POX na folha não tratada (FNT), efeito sistêmico, entretanto essa expressão foi inferior em relação ao efeito local (FT).

Em contrapartida, somente as frações F38 e F46 proporcionaram a expressão de β -GASE na forma de aplicação folha tratada (FT) da 2ª coleta, ou seja, 72h após a aplicação das frações na folha. Assim, verificou-se o aumento da atividade da enzima em função da aplicação do eliciador, porém não houve correlação para indução de resistência da planta de feijoeiro, no sentido de reduzir a severidade de antracnose. A indução do mecanismo de defesa na ausência do patógeno pode acarretar um possível custo adaptativo, com alocação de recursos para formação de compostos de defesa (metabolismo secundário), competindo assim por substrato e energia com os processos de crescimento (metabolismo secundário) (GAYLER et al., 2004; HEIL; BALDWIN, 2002).

A síntese de fitoalexina faseolina, de modo geral não apresentou atividade para a maioria das frações obtidas pelas purificações. Esses resultados consequentemente, podem estar relacionados com a ativação de outras vias metabólicas não avaliados no presente estudo, mas não descartando a possibilidade de estudar outras rotas de ativação envolvidas no processo de resistência da planta. (GONÇALVES-TREVISOLI et al., 2016).

A importância da atuação conjunta de algumas moléculas explicaria o fato de que produtos à base de uma única molécula como princípio ativo de indução de resistência padrão ASM e a separação em frações, não permitiram a ativação de todas as enzimas. Cada rota ou via pode ser ativada separadamente por eliciadores específicos, sendo que cada uma induziria a expressão de um conjunto específico de genes. Considerando a complexidade fisiológica e bioquímica da planta em resposta aos diferentes indutores de defesa, possivelmente é necessária uma atuação sinérgica dos componentes purificados do *T. longibrachiatum* extrato para a ativação e aumento de atividade de outra enzima no complexo bioquímico do feijoeiro (TEMPORAL, 2014).

As pesquisas vêm sendo concentradas nos mecanismos pelos quais as células vegetais percebem esses sinais para ativar suas respostas de defesa. Esse interesse tem sido voltado para a identificação de moléculas eliciadoras específicas que podem estimular receptores fisiológicos para desencadear cascata de sinais na célula vegetal. Diante disso, a purificação e

caracterização dessas moléculas ligadas pelo eliciador específico, é essencial para uma compreensão desses sinais entre as plantas e os agentes patogênicos que leva à ativação dos mecanismos de defesas.

Nos últimos anos, tem aumentado a atenção dada aos estudos da interação entre espécies de *Trichoderma* e plantas, incluindo estudos moleculares de componentes bioativos específicos produzidos pelo fungo que esteja associado com indução de mecanismo de defesa, colonização da raiz ou promoção de crescimento da planta hospedeira (DA SILVA, 2014).

Os resultados apresentados no estudo, ressaltam que as plantas são capazes de responder à presença de diferentes moléculas, que podem ser, tanto de natureza proteica, glicídica ou glicoproteica, derivadas do isolado de *T. longibrachiatum* em estudo, considerando a interação existente entre as moléculas eliciadoras e seus respectivos receptores específicos presentes na membrana da célula.

Através dessas observações, mesmo que as expressões enzimáticas foram menores e pouco significativas, podemos dizer que as frações podem ser promissoras para o efeito indutor dos mecanismos de resistência no feijoeiro, a qual, podem ser pesquisadas em novos testes e análises não realizadas neste trabalho, como também, serem testadas em outras plantas na indução de resistência contra outros patógenos.

Embora a produção de compostos bioativos pelo *Trichoderma* envolvidos no controle biológico é um fenômeno bem documentado, a identificação e compreensão do papel dessas proteínas no controle de doença é pouco compreendida. Pesquisas adicionais são necessárias para estudar os mecanismos e sua atividade nos processos do biocontrole. Para isso, estudos referentes a indução de resistência de plantas ainda estão em desenvolvimento, porém enfrentam a competição com os métodos convencionais de controle de doenças. No entanto, esses estudos podem oferecer um grande potencial para integrar ambas futuras formas de proteção para práticas culturais.

5. CONCLUSÃO

1 - A separação de amostras provenientes de filtrado de cultura e extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum*, por cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel, indicaram frações com presença de moléculas eliciadoras proteicas, glicídicos e glicoproteicos capazes de induzir a síntese de fitoalexina faseolina e a atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3 glucanase.

2 – As frações não alteraram a atividade enzimática de catalase e fenilalanina amônia-liase.

3 – As frações F17, F23 e F27 reduziram a severidade da antracnose no efeito local.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, T.; LEMOS-BLAISKI, J.M.; LUIZ, C.; FELIPINI, R.B.; DI PIERO, R.M. Polissacarídeos na ativação de mecanismos de defesa latente das plantas. In: SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; SILVA, C.M.da; MAIA, A.J.; FARIA, C.M.D.R; COLELLA, J.C.T. **Indução de resistência em plantas e patógenos**, UEM/MPA, Maringá, cap.11, 187-208, 2014.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**, Academic Press San Diego, San Diego, Ed.5, 922p., 2005.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in plant science**, Oxford, v.17, n.2, p.73-90, 2012.
- AL-JASSABI, S.; SAAD, A.; SATYAKEERTHY, T.R.; ABDULLAH, M.S. Characterization of Polyphenol Oxidase from *Zyzyphus spina-christi* from Iraq. **Middle-East Journal of Scientific Research**, Cheruthuruthi, v.14, n.2, p.155-160, 2013.
- 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**, Lancaster, v.60, n.2, p.377-390, 2009.
- ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. de. O.; MARQUES, A. E.; PEREIRA, T. H. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G. de.; STOLF-MOREIRA, R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; PEREIRA, P. R. G.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47, n.2, p.163-172, 2012.
- AHMAD, J.S.; BAKER, R. Competitive saprophytic ability and celullolytic activit of rhizosphere-component mutants of *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, n.2, p.358, 1987.
- AMIN, F.; RAZDAN, V. K.; MOHIDDIN, F. A.; BHAT, K. A.; SHEIKH, P. A. Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in vitro*. **Journal of Phytohylogy**, Trivandrum, v.2, n.10, p.34-37, 2010.
- ANDRADE, M.J.B.de; OLIVEIRA, D.P.; FIGUEIREDO, M.A.de; MARTINS, F.A.D. Exigências edafoclimáticas. In: CARNEIRO, J.E.; PAULA JÚNIOR, T.J.de; BORÉM, A. **Feijão - do plantio à colheita**. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, cap.4, p.68-95, 2015.
- ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.38, n.1, p.28-34, 2013.
- ARRUDA, R. S. de; MESQUINI, R. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; NASCIMENTO, J. F. Efeito de extratos de cogumelos na indução de fitoalexinas e no controle de oídio da soja em casa de vegetação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.2, p.164-172, 2012.

AYDEMIR, T. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. **Food Chemistry**, London, v.87, n.1, p.59–67, 2004.

BAILEY, J. A.; BURDEN, R. S. Biochemical changes and phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris* following cellular browning caused by tobacco necrosis virus. **Physiological Plant Pathology**, London, v.3, n.1, p.171- 177, 1973.

BALDO, M.; STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. *In situ* detection of reactive oxygen species in bean plants treated with *Pycnoporus sanguineus* extracts and inoculated with *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.37, n.4, p.174-179, 2011.

BALLARÉ, C. L. Light Regulation of Plant Defense. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v.65, n.1, p.335-363, 2014.

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

BECK, M.; HEARD, W.; MBENGUE, M.; ROBATZEK S. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. **Current Opinion in Biologia Vegetal**, Stuttgart, v.15, n.4, p.367–374, 2012.

BENINCA, C. P.; FRANZENER, G.; ASSI, L.; IURKIV, L.; ECKSTEIN, B.; COSTA, V. C.; NOGUEIRA, M. A.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Indução de fitoalexinas e atividade de peroxidases em sorgo e soja tratados com extratos de basidiocarpos de *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.3, p.285-292, 2008.

BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A.C. Biocontrol, mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, n.4, p.249-260, 2004.

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

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

BONALDO, S. M., PASCHOLATI, S. F. Efeito de frações parcialmente purificadas de *Saccharomyces cerevisiae* na germinação de conídios e formação de apressórios por *Colletotrichum sublineolum* e *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.233-238, 2007.

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**. FEALQ, Piracicaba, cap.1. p.11-28. 2005.

BONALDO, S. M.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TESSMANN, D. J.; SCAPIM, C. A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino

contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, n.2, p.128-134, 2004.

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

BORSATO, L. C.; DI PIERO, R. M.; STADNIK, M. J. Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.35, n.5, p.318-322, 2010.

BONATTI, P. M.; LORENZINI, G.; FORNASIEIRO, B.; NALLI, C.; SCGARBI, E. Cytochemical detection of cell wall bound peroxidase in rust infected broad bean leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.140, n.4, p.319-325, 1994.

BRADFORD, M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

BRAGA, M. R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**, FEALQ, Piracicaba, cap.9, p.305-346, 2008.

BREUSEGEM, F.V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Limerick, v.161, n.3, p.405-414, 2001.

BRITO, J. P. C. de. **Prospecção e caracterização de peptaibols produzidos por linhagem de *Trichoderma asperellum***. 2014. 51f. Dissertação (Mestrado em biologia) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

BROETTO, L.; COLTRO-RONCATO, S.; MEINERZ, C. C.; DILDEY, O. D. F.; PAZDIORA, P. C.; GONÇALVES, E. D. V.; MORAES, A. J.; HENKEMEIER, N. P.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma sp.* **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.13, n.4, p.310-317, 2014.

BROETTO, F. **Métodos de trabalho em bioquímica vegetal e tecnologia de enzimas**, Cultura Acadêmica, Botucatu, 2014. 92 p.

BRODERSEN, P.; PETERSEN, M.; NIELSEN, H. B.; ZHU, S. J.; NEWMAN, M. A.; SHOKAT, K. M.; RIETZ, S.; PARKER, J.; MUNDY, J. *Arabidopsis thaliana* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. **The Plant Journal**, Oxford, v.47, n.4, p.532-546, 2006.

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

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

CAVALCANTI, F. R., RESENDE, M. L. V. OLIVEIRA, J. T. A. Peroxidases ativadas por frações proteicas de extrato biológico eficaz na proteção do tomateiro contra a mancha bacteriana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.6, p.507-511, 2007.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.de; PEREIRA, R.B.; COSTA, J.deC.doB.; CARVALHO, C.P.daS. Atividades de quitinase e beta-1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1721-1730, 2006.

CAVALCANTI, L.S. et al. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S. et al. (Eds.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**, FEALQ, Piracicaba, p.81-124, 2005.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R.; Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V. de; ROMEIRO, R. da. S. (Ed.), **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**, FEALQ, Piracicaba, p.263, 2005.

CAVERO, P. A. S.; HANASA, R. E.; GASPAROTTO, L.; COELHO NETO, R. A.; SOUZA, J. T. Biological control of banana black Sigatoka disease with *Trichoderma*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.45, n.6, p.951-957, 2015.

CELESTINO, S.M.C.; FERREIRA FILHO, E.X. Characterization of pectinases from *Acrophialophora nainiana* and *Trichoderma harzianum* strain T6. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v.4, n.2, p.97-104, 2005.

CLARKE, A.; MUR, L. A. J.; DARBY, R. M.; KENTON, P. Harpin modulates the accumulation of salicylic acid by *Arabidopsis* cells via apoplastic alkalization. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, n.422, p.3129- 3136, 2005.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora Unicamp, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, p.17-45, 2006.

COLL, N. S.; EPPLE, P.; DANGL, J. L. Programmed cell death in plant immune system. **Cell Deathe Differentiation - Nature**, Rome, v.18, n.8, 1247-1256, 2011.

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

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2017) **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2016**. Brasília. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_09_15_18_32_boletim_12_setembro.pdf. Brasília, acesso em: 05 de Jan. de 2017.

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

COSTA, J.C.B.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JR, P.M.; CAMILO, F.R.; MONTEIRO, A.C.A.; PEREIRA, R.B. Indução de resistência em mudas de cacaueteiro contra *Moniliophthora perniciosa* por produto à base de mananoligossacarídeo fosforilado.

Tropical Plant Pathology, Brasília, v.35, n.5, p.285-294, 2010.

DANIEL, J. F. D. S.; RODRIGUES FILHO, E. Peptaibols of *Trichoderma*. **Natural Product Reports**, London, v.24, n.5, p.1128-1141, 2007.

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

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

DA SILVA, F. L. **Análise da associação e do secretoma da interação entre *Trichoderma* spp. de solo do cerrado com feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris* L.** 2014, 116f. Dissertação (Mestrado em biologia) Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

DEFFUNE, G. Semioquímicos, fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal na agricultura orgânica: a explicação dos defensivos agrícolas. In: Hortibio: 1º Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica. Resumos. **Agroecológica**, Botucatu, p.33-43, 2001.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola: Cromatografia**, São Carlos, v.7, p.21-25, 1998.

DE WIT, P. J. How plants recognize pathogens and defend themselves. **Cell Molecular Life Science**, Basel, v.64, n.21, p.2726-2732, 2007.

DILDEY, O.D.F.; BROETTO, L.; RISSATO, B.B.; GONÇALVES-TREVISOLI, E.D.V.; COLTRO-RONCATO, S.; DAL'MASO, E.G.; MEINERZ, C.C.; HENKEMEIER, N.P.; STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; WEBLER, T.F.B. *Trichoderma*-bean interaction: Defense enzymes activity and endophytism. **African Journal of Agricultural Research**, Nairóbi, v.11, n.43, p.4286-4292, 2016.

DILDEY, O.D.F.; BARBIAN, J.M.; GONÇALVES, E.D.V.; BROETTO, L.; ETHUR, L.Z.; KUHN, O.J.; BONETT, L.P. Inibição do crescimento *in vitro* de *Sclerotinia sclerotiorum*, causador de mofo branco, por isolados de *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.12, n.3, p.132-136, 2014.

DI PIERO, R.M. di; GARDA, M.V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.9, p.1121-1128, 2008.

DI PIERO, R. M.; WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.37, n.2, p.175-180, 2006.

DI PIERO, R. M. **Potencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (Shiitake) e *Agaricus blazei* (Cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos.** 2003. 140f. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

DIXON, R. A.; HARRISON, M. J.; LAMB, C. J. Early events in the activation of plant defense responses. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v.32, n.1, p.479-501, 1994.

DIXON, R. A.; LAMB, C. J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, n.1, p. 339-367, 1990.

DÖRNENBURG, H.; KNORR, D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.17, n.8, p.674-684, 1995.

DUANGMAL, K., APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v.64, n.3, p.351-359, 1999.

DURANGO, D.; QUINONES, W.; TORRES, F.; ROSERO, Y.; GIL, J.; ECHEVERRI, F. Phytoalexin accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. **Molecules**, Basel, v.7, n.11, p.817-832, 2002.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.42, n.1, p.185–209, 2004.

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**, Sweden, v.36, n.2, p.343-354, 2014.

ELVIRA, M. I.; GALDEANO, M. M.; GILARDI, P.; GARCÍA-LUQUE, I.; SERRA, M. T. Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.59, n.6, p.1253–1265, 2008.

ETTRE, L. S. M. S. Tswett and the invention of chromatography”, **LCGC North America**, New Haven, v.21, n.5, p.458-467, 2003.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do feijoeiro comum: Características da cultura.** Disponível em <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/>. Brasília, acesso em 04 Jan. 2017.

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

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

FERNANDES, C. de F.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; SILVA, D. S. G. da; REIS, N. D.; ANTUNES JÚNIOR, H. **Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos.** Documentos / Embrapa Rondônia, Porto Velho, 14p. 2009.

FILIPPI, M. C. C., SILVA, G. B.; PRABHU, A. S. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, n.5, p.387-392. 2007.

FIORI-TUTIDA, A.C.G. **Uso de extrato dos cogumelos *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler e *Agaricus blazei* (Murril) ss. Heinem no controle in vitro de *Puccinia recôndita* f. sp *tritici* e na indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana***, 2003. 112f. Tese (Doutorado em Agronomia). UEM - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

FRANZENER, G. **Caracterização parcial de indutores de resistência em pepino e feijão a partir do extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora***. 2011. 217 p. Tese (Doutorado em Agronomia). UEM - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.

FUERST, E. P.; OKUBARA, P. A.; ANDERSON, J. V.; MORRIS, C. F. Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. **Frontiers in Plant Science**, New Haven, v.5, n.1, p.689, 2014.

GASSMANN, W.; BHATTACHARJEE, S. Effector-triggered immunity signaling: from gene-for-gene pathways to protein-protein interaction networks. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.25, n.7, p.862-868, 2012.

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

GAYLER, S.; LESER, C.; PRIESACK, E.; TREUTTER, D. Modelling the effect of environmental factors on the “trade-off” between growth and defensive compounds in young apple trees. **Trees**, Berlin, v.18, n.3, p.363-371, 2004.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, Stuttgart, v.9, n.4, p.414-420, 2006.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A.F.D.; AUER, C.G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. In: **Floresta** (Edição especial), Curitiba, v.30, n.12, p.200. 2000.

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

GONÇALVES-TREVISOLI, E.D.V.; STANGARLIN, J.R.; RISSATO, B.B.; DILDEY, O.D.F.; COLTRO-RONCATO, S.; BROETTO, L.; MENDONÇA-MÜLLER, H.F.C.; DARTORA, J.; MEINERZ, C.C.; IURKIV, L.; MIORANZA, T.M.; UEMURA-LIMA, D.H.; WEBLER, T.F.B.; KUHN, O.J. Plant defense elicitors' purification in soybean and bean from pathogenic nematode. **African Journal of Agricultural Research**, Nairóbi, v.11, n.49, p.5021-5035, 2016.

GONÇALVES-TREVISOLI, E.D.V. **Purificação de eliciadores de defesa vegetal em soja e feijoeiro a partir de nematoides fitopatogênicos**. 2016. 93f. Tese (Doutorado em

Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste, Marechal Cândido Rondon. 2016.

GONÇALVES, E.D.V.; STANGARLIN, J.R.; COLTRO-RONCATO, S.; DILDEY, O.D.F.; MEINERZ, C.C; KUHN, O.J.; Cromatografia de filtração em gel para a purificação de moléculas proteicas e glicídicas a partir de nematoides fitopatogênicos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.13, (suplemento), p.353-357, 2014.

GUGINSKI-PIVA, C. A.; SANTOS, I. dos.; WAGNER JÚNIOR, A; HECK, D. W.; FLORES, M. F.; PAZOLINI, K. Propolis for the control of powdery mildew and the induction of phytoalexins in cucumber. **IDESIA**, Arica, v.33, n.1, p.39-47, 2015.

GUIMARÃES, S. S.; MAZARO, S. M.; FREDDO, Á. R.; WAGNER JÚNIOR, A. Potencial de preparados de cavalinha (*Equisetum* sp.) na síntese de metabólitos de defesa em cotilédones de soja (*Glycine max* L.) e o efeito sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani* Kuhn, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.17, n.1, p.143-149, 2015.

HADWIGER, L. A.; TANAKA, K. EDTA a Novel Inducer of Pisatin, a Phytoalexin Indicator of the Non-Host Resistance in Peas. **Molecules**, Basel, v.20, n.1, p.24-34, 2014.

HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual review of Phytopathology**, Palo Alto, v.34, n.1, p.387-412, 1996.

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

HAMMERSCHMIDT, T. R.; NUCLES, E. M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, London, v.20, n.1, p. 73-82, 1982.

HASEGAWA, M.; MITSUHARA, I.; SEO, S.; OKADA, K.; YAMANE, H.; IWAI, T.; OHASHI, Y. Analysis on blast fungus-responsive characters of a flavonoid phytoalexin sakuranetin; accumulation in infected rice leaves, antifungal activity and detoxification by fungus. **Molecules**, Basel, v.19, n.8, p.11404-11418, 2014.

HARMAN, G. E. HOWELL, C. R.; VITEBERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature**, London, v.2, n.1, p 43-56, 2004.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmentl characterization of multiple forms of catalase in tabaco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v.84, n.2, p.450-455, 1987.

HE, P.; SHAN, L.; SHEEN, J. Elicitation and suppression of microbe-associated molecular pattern-triggered immunity in plant-microbe interactions. **Cellular Microbiology**, Oxford, v.9, n.6, p.1385-1396, 2007.

HEIL, M.; BALDWIN, I. T. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.2, p.61-67, 2002.

HIJWEGWN T.; VERHAAR, M. A., ZADOKS J. C. Resistance to *Sphaerotheca pannosa* in roses induced by 2,6-dicloroisonicotinic acid. **Plant Pathology**, San Diego, v.45, n.4, p.631-635, 1996.

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

HOFFMANN, C. A.; CHAGAS, L. F. B.; SILVA, D. P.; CHAGAS JUNIOR, A. D.; SCHEIDT, G. N. Potencial de antagonismos de isolados de *Trichoderma* sp. contra o isolado de *Fusarium* sp., *in vitro*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v.10, n.1, p.236-242, 2015.

IBRAHEEM, F.; GAFFOOR, I.; TAN, Q.; SHYU, C. R.; CHOPRA, S. A sorghum MYB transcription factor induces 3-deoxyanthocyanidins and enhances resistance against leaf blights in maize. **Molecules**, Basel, v.20, n.2, p.2388-2404, 2015.

INDEX FUNGORUM. **Banco de dados de taxonomia de fungos**. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>, acessado em 10 de Jan. de 2017.

ISAIAS, C. O.; MARTINS, I.; SILVA, J. B. T.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. Ação antagônica e de metabólitos bioativos de *Trichoderma* spp. contra os patógenos *Sclerotium rolfsii* e *Verticillium dahliae*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.40, n.1, p.34-41, 2014.

IURKIV, L. **Purificação parcial de compostos biologicamente ativos a partir de *Pycnoporus sanguineus* para o controle de ferrugem asiática em soja**. 2009. 104p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná-Unioeste, Marechal Cândido Rondon, 2009.

JALALI, B. L.; BHARGAVA, S.; KAMBLE A. Signal Transduction and Transcriptional Regulation of Plant Defence Responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, n.2, p.65-74, 2006.

JEANDET, P. Phytoalexins: current progress and future prospects. **Molecules**, Basel, v.20, n.2, 2770-2774, 2015.

KAMOUN, S. A. Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.44, n.1, p.41-60, 2006.

HSU, S-Y.; KAO, C-H. Differential effect of sorbitol and polyethylene glycol on antioxidant enzymes in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.39, n.1, p.83-90, 2003.

KERSHAM, M.J.; TALBOT, N. J. Hidrophobins and repelants: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. **Fungal Genetics and Biology**. Orlando, v.23, n.1, p.18-33, 1998.

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

KUHN O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140f. Tese (Doutorado em Agronomia). ESALQ - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos, Ed. Rima, 2004, p. 531.

LATIF, N. S. A.; WAKE, G. C.; REGLINSKI, T.; ELMER, P. A. G. Modelling induced resistance to plant diseases. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 347, p. 144-150, 2014.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v.47, n.1, p.273-279, 1972.

LI, C. W.; SONG, R. Q.; YANG, L. B.; DENG, X. Isolation, purification, and structural identification of an antifungal compound from a *Trichoderma* strain. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seul, v.25, n.8, p.1257-1264, 2015.

LI, H. Y.; LUO, Y.; ZHANG, X. S.; SHI, W. L.; GONG, Z. T.; SHI, M.; CHEN, L. L.; CHEN, X. L.; ZHANG, Y. Z.; SONG, X. Y. Trichokonins from *Trichoderma pseudokoningii* SMF2 induce resistance against gram-negative *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in chinese cabbage. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.354, n.1, p.75-82, 2014.

LO, C. S. C.; NICHOLSON, R. L. Phenolic compounds and their importance in plant disease. In. **Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions**, FEALQ, São Paulo, p.285-303, 2008.

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

LUSSO, M.F.G.; PASCHOLATI, S.F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.25, n.3, p.244-249, 1999.

LYDON, J.; DUKE, S. O. Pesticide effects on secondary metabolism of higher plants. **Pest Management Science**, London, v.25, n.4, p.361-373, 1989.

MACHINANDIARENA, M. F.; LOBATO, M. C.; FELDMAN, M. L.; DALEO, G. R.; ANDREU, A. B. (2012). Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.169, n.14, p.1417-1424, 2012.

MADAKBAŞ, S. Y.; AWALE, H.; KELLY, J. Determination of phaseolin types in common bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties from turkey. **Greener Journal of Agricultural Sciences**, Geneva, v.4, n.2, p.039-045, 2014.

MALLICK N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.157, n.2, p.183-193, 2000.

MARCHESE, J. A.; MATTANA, R. S.; MING, L. C.; BROETTO, F.; VENDRAMINI, P. F.; MORAES, R. M. Irradiance stress responses of gas exchange and antioxidant enzyme contents in pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] plants. **Photosynthetica**, Prague, v.46, n.4, p.501- 505, 2008.

MARQUES, J.S. **Compostos ativos de folhas de *Eugenia uniflora* e seus efeitos contra mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro**. 2014. 96f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MARTINS, E. M. F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**, FEALQ, Piracicaba, cap.12, p.387-410. 2008.

MATIELLO, J.; BONALDO, S.M. Atividade elicitora de fitoalexinas em Soja e Sorgo por extratos e tinturas de espécies medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.15, n.4, p.541-550, 2013.

MATIELLO, J.; RAASCH-FERNANDES, L. D.; BERBER, G. D. C. M., TRENTTO, R. A.; BONALDO, S. M. Síntese de fitoalexinas em soja e sorgo por extratos e tinturas pertencentes a três espécies florestais. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, Maringá, v.9, n.3, p.617-633, 2016.

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plant. **Phytochemistry**, Oxford, v.18, n.1, p.193-215, 1979.

MAYO, S.; GUTIÉRREZ, S.; MALMIERCA, M. G.; LORENZANA, A.; CAMPELO, M. P.; HERMOSA, R.; CASQUERO, P. A. Influence of *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* spp. In growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and in the induction of plant defense-related genes. **Frontiers in Plant Science**, Léon, v.6, n.685, p.1-11, 2015.

MAZARO, S. M.; FOGOLARI, H.; WAGNER JÚNIOR, A.; CITADIN, I.; SANTOS, I. Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução da síntese de fitoalexinas e no efeito fungistático sobre *Botrytis cinerea*, *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.15, n.2, p.208-216, 2013.

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

MEINERZ, C. C.; MULLER, S. F.; FRANZENER, G.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PORTZ, R. L.; KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Elicidores proteicos e glicídicos de *Adiantum capillus-veneris* L. para fitoalexinas em sorgo *Sorghum bicolor* (L.) Moench. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.16, n.4, p.794-803, 2014.

MEIRELLES, G. B. **Resistência induzida por *Trichoderma harzianum* em resposta a *Alternaria alternata* em tomateiro**. 2014. 66f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MELLO, S.C.M.; ÁVILA, Z.R.; BRAÚNA, L.M.; PÁDUA, A.R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii*. **Fitosanidad**, La Habana, v.11, n.1, p.3-9, 2007.

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

MÉTRAUX, J. P. Induced defenses in plants. In: Rodrigues, F. A.; Romeiro, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. UFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.7-24, 2007.

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

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Recognition of herbivory-associated molecular patterns. **Plant Physiology**, San Diego, v.146, n.3, p.825-831, 2008.

MONTEIRO, A. C. A. **Indutores de resistência no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*): análise bioquímica e moleculares**. 2014. 133f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia). UFLA - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

MORAES, W. B. C. Controle Alternativo de Fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.13, p.175-190, 1992.

MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. 2009. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, p.07-14.

MOREIRA, C. G. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, n.4, p.332-337, 2008.

MOURA, G. S.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Atividade antimicrobiana e indutora de fitoalexinas do hidrolato de carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.16, n.2, (suplemento), p.309-315, 2014.

MÜLLER, K. O. Studies on phytoalexins. I. The formation and the immunological significance of phytoalexin produced by *Phaseolus vulgaris* in response to infection with *Sclerotinia fructicola* and *Phytophthora infestans*. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v.11, n.1, p.275- 300, 1958.

NEWMAN, M. A.; SUNDELIN, T.; NIELSEN, J. T.; ERBS, G. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, New Haven, v.16, n.4, p.139, 2013.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto v.30, n.1, p.369-389, 1992.

NURNBERGER, H.; LIPKA, V. Non-host resistance in plants: new insights into na old phenomenon. **Molecular Plant Pathology**, London, v.6, n.3, p.335-345, 2005.

NWACHUKWU, I. D.; LUCIANO, F.B.; UDENIGWE, C. C. The inducible soybean glyceollin phytoalexins with multifunctional health-promoting properties. **Food Research International**, Barking, v.54, n.1, p.1208-1216, 2013.

OKOT-KOTBER, M.; LIAVOGA, A.; YONG, K. J.; BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n.8, p.2410-2417, 2002.

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

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

PATRON, N.J.; WALLER, R.S.; COZIUNSEN, A.J.; STRANEY, D.C.; GARDINER, D.M.; NIERMAN, W.C.; HOWLETT, B.J. Origin and distribution of epipolythiodioxopiperazine (ETP) gene clusters in filamentous ascomycetes. **BMC Evolutionary Biology**, Reino Unido, v.7, n.1, p.174, 2007.

PASCHOLATI, S. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Agronômica Ceres, São Paulo, 4.ed, v.1, p.593-636, 2011.

PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência sistêmica: opção para o controle de doenças de plantas no século XXI. In: I Reunião brasileira sobre indução de resistência em plantas contra fitopatógenos, 19 a 21 de novembro de 2002, São Pedro – SP. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.29, n.1, p.115-116, 2003.

PASCHOLATI, S. F.; BLUMER, S.; REZENDE, D.C.; BRAND, S. C. Indução de resistência novos conceitos e aplicações. **Anais do X Simpósio de Controle de Doenças de Plantas e V Reunião Brasileira sobre Indução de Resistência em Plantas**. Lavras, 2010.

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

PAULA JÚNIOR, T.J. de; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T.J.de; BORÉM, A. **Feijão**. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, cap.13. p.359-414, 2011.

PARKER, J.E.; SCHULTE, W.; HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.4, n.1, p.19-27, 1991.

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

PEREIRA, R. B.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; AMARAL, D. R.; LUCA, G. C.; CAVALCANTI, F. R. Ativação de defesa em cacaueiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.43, n.2, 171p., 2008.

PINTO, Z. V.; CIPRIANO, M. A. P.; SANTOS, A. S.; PFENNING, L. H.; PATRÍCIO, F. R. A. Control of lettuce bottom rot by isolates of *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.40, n.2, p.141-146, 2014.

PITTA-ALVAREZ, S. I.; SPOLLANSKY, T. C.; GIULIETTI, A. M. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.26, n.2-4, p.252-258, 2000.

QUEIROZ, C.; MENDES LOPES, M. L.; FIALHO, E.; VALENTE-MESQUITA, V. L. Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. **Food Reviews International**, London, v.24, n.4, p.361-375, 2008.

RAES, J.; ROHDE, A.; CHRISTENSEN, J. H.; VAN DE PEER, Y.; BOERJAN, W. Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, San Diego, v.133, n.3, p.1051-1071, 2003.

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

REINO, J.L.; GUERRERO, R.F.; HERNÁNDEZ-GALÁN, R.; COLLADO, I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry Reviews**, Leida, v.7, n.1, p.89-123, 2008.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.2, p.123-130. 2003.

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

RESENDE, M.L.V.de; BARRETTI, P.B.; MEDEIROS, F.C.L.de; SILVA, D.D.da; PEREIRA, R.B.; LINS, S.R.deO.; PEREIRA, L.deM.; CAMPOS, M.deA. Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.15, n.1, p.129-198, 2007.

RODRIGUES, E.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; FIORI-TUTIDA, A.C.G.; STANGARLIN, J.R.; CRUZ, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistema de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.2, p.124-128, 2007.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Editora UFV, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. 172p.

ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia**. Editora da Unicamp, Campinas, p.139-166, 2006.

RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; LOMBARDI, N.; WOO, S. L.; VINALE, F.; MARRA, R.; VARLESE, R.; MANGANIELLO, G.; PASCALE, A.; SCALA, V.; TURRÀ, D.; SCALA, F.; LORITO, M. Multiple roles and effects of a novel *Trichoderma hydrophobin*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, Saint Paul, v.28, n.2, p.167-179, 2015.

SANSIGOLO, A.L. **Identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* na cultura do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no estado do Paraná**. 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

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

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

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

SCHAFFRATH, U.; SCHEINPFLUG, H.; REISENER, H. J. An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.46, n.4, p.293-307, 1995.

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

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v.12, p.1-26, 2012.

SIDDIQUI, Y.; MEON, S.; ISMAIL, M.R.; ALI, A. *Trichoderma*-fortified compost extracts for the control of choanephora wet rot in okra production. **Crop Protection**, Guildford, v.27, n.3, p.385-90, 2008.

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

SIMÕES, K.; DIETRICH, S. M. C.; HAHN, M. G.; BRAGA, M. R. Purification and characterization of a phytoalexin elicitor from spores of the saprobe *Mucor ramosissimus*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.28, n.4, p.735-744, 2005.

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

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropica - Ciencias Agrarias e Biologicas**, Chapadinha, v.1, n.1, p.9-15, 2007.

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

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

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 16, n.1, p. 265-304, 2008.

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

STINTIZI, A.; HEITZ, T.; PRASAD, V.; WEIDEMANN-MERDINOGLUS, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v.75, n.8, p.687-706, 1993.

STOPPACHER, N.; NEUMANN, N. K.; BURGSTALLER, L.; ZEILINGER, S.; DEGENKOLB, T.; BRÜCKNER, H.; SCHUHMACHER, R. The comprehensive peptaibiotics database. **Chemistry & Biodiversity**, v.10, n.5, p.734-743, 2013.

STOPPACHER, N.; KLUGER, B.; ZEILINGER, S.; KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.81, n.2, p.187-193, 2010.

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

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

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

TEMPORAL, W. M. **Caracterização parcial do extrato etanólico de *Cymbopogon citratus* e capacidade de indução de mecanismos de resistência em soja**. 2014. 98f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

TON, J.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.15, n.1, p.27-34, 2002.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v.34, n1, p.68-71, 2006.

VALLAD, G. E.; GOODMAN, R. M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. **Crop Science**, Madison, v.44, n.6, p.1920-1934, 2004.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.44, n.1, p.135-162, 2006.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; BARBETTI, M. J.; LI, H.; WOO, S. L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.72, n.1, p.80-86, 2008.

VITERBO A, RAMOT O, CHEMIN L, CHET I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.81, n.1-4, p.549-56, 2002.

VIVANCO, J. M; COSIO, E.; LOYOLA-VARGAS, V. M.; FLORES, H. E. Mecanismos químicos de defesa en las plantas. **Investigación y Ciencia**, Barcelona, v.341, n.2, p.68-75, 2005.

VOGELSANG, R.; BARZ, W. Purification, characterization and hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Planta**, Berlin, v.189, n.1, p.60-69, 1993.

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, Saint Paul, v.95, n. 12, p.1368- 1373, 2005.

WENDLAND, A.; MOREIRA, A. S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN, J. S.; LOBO JÚNIOR, M. Doenças do feijoeiro. In. AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO A.; CAMARGO L. E. A. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. Agronômica Ceres, São Paulo, ed.5, v.2, p.383-395, 2016.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H_2O_2 and is indispensable for stress defence in C-3 plants. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v.16, n.16, p.4806-4816, 1997.

WU, C. T.; BRADFORD, K. J. Class I chitinase and beta 1,3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiology**, San Diego, v.133, n.1, p.263-273, 2003.

WU, S.; SHAN, L.; HE, P. Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms. **Plant Science**, Limerick, v.228, n.1, p.118–126, 2014.

XU, F.; CAI, R.; CHENG, S.; DU, H.; WANG, Y.; CHENG, S. Molecular cloning, characterization and expression of phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba*. **African Journal of Biotechnology**, Nairóbi, v.7, n.6, p.721-729, 2008.

XIAO-YAN, S.; QING-TAO, S.; SHU-TAO, X.; XIU-LAN, C.; CAI-YUN, S.; YU-ZHONG, Z. Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of Trichokonins from *Trichoderma koningii* SMF2 against plant pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.260, n.1, p.119-125, 2006.

YANG, C.; GUO, R.; JIE, F.; NETTLETON, D.; PENG, J.; CARR, T.; YEAKLEY, J. M.; FAN, J. B.; WHITHAM, S. A. Spatial analysis of *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. **Molecular Plant–Microbe Interactions**, Saint Paul, v.20, n.4, p.358–370, 2007.

YAO, H.; TIAN, S. Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v.35, n.3, p.253-262, 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**, Washington, v.69, n.12, p.7343-7353, 2003.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.3, p.1061-1070, 1999.

ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X.; LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.100, p.64-74, 2016.

ZANARDO, N. M. T.; PASCHOLATI, S. F.; FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.11, p.1499-1503, 2009.