

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

LALINE BROETTO

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* MEDIADA
POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *Trichoderma* NA CULTURA DO FEIJOEIRO**

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2017

LALINE BROETTO

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* MEDIADA
POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *Trichoderma* NA CULTURA DO FEIJOEIRO**

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

Orientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn

Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca da UNIOESTE – Campus de Marechal Cândido Rondon – PR., Brasil)

B865i Broetto, Laline
Indução de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* mediada por diferentes espécies de *Trichoderma* na cultura do feijoeiro / Laline Broetto. – Marechal Cândido Rondon, 2017.
76 f.

Orientador: Dr. Odair José Kuhn
Coorientador: Dr. José Renato Stangarlin

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

1. Feijão. 2. Feijão – Doenças e pragas. 3. Pragas agrícolas – Controle biológico. I. Kuhn, Odair José. II. Stangarlin, José Renato. III. Título.

CDD 22.ed. 635.652
CIP-NBR 12899

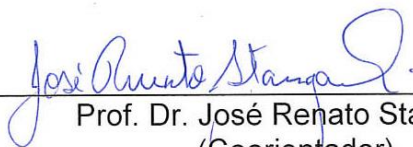
Ficha catalográfica elaborada por Marcia Elisa Sbaraini-Leitzke CRB-9/539

LALINE BROETTO

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*
MEDIADA POR DIFERENTES ESPÉCIES DE *Trichoderma* NA CULTURA
DO FEIJÃO**

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*.

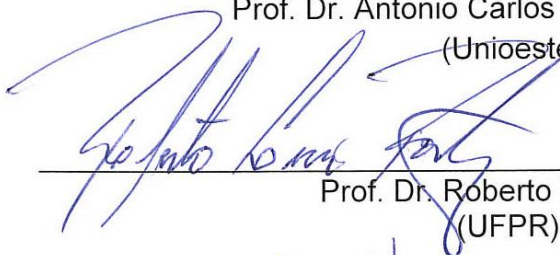
APROVADA: 15 de fevereiro de 2017



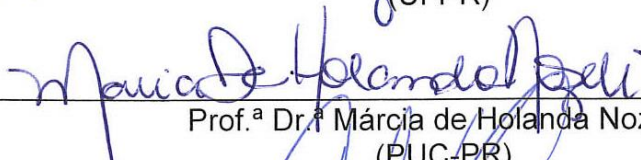
Prof. Dr. José Renato Stangarlin
(Coorientador)
(Unioeste)



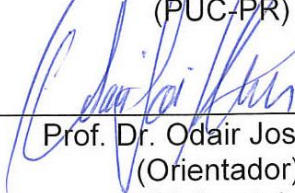
Prof. Dr. Antonio Carlos Torres da Costa
(Unioeste)



Prof. Dr. Roberto Luis Portz
(UFPR)



Prof.ª Dr.ª Márcia de Holanda Nozaki
(PUC-PR)



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

À Deus,

Que através de Sua luz ilumina e me guia nos caminhos da vida;

À minha querida mãe Inez Justina Silvério Broetto,

Pelo amor e dedicação desprendidos a toda família;

À meu pai Jonas Roberto Broetto,

Pela dedicação, amor, bondade e comprometimento com uma família unida e feliz, e que me leva de maneira especial a buscar o conhecimento;

À minha irmã Janiele Broetto e minha afilhada Alice,

Por simplesmente existirem em minha vida.

Dedico.

AGRADECIMENTO

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, pela oportunidade concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia e todos os professores envolvidos pela oportunidade, ensino aprimorado de qualidade e atenção.

Ao professor Dr. Odair José Kuhn, pela sua competência e dedicação ao ensino de qualidade e na formação de profissionais de excelência e principalmente pela paciência na orientação durante o mestrado e doutorado.

Ao professor Dr. José Renato Stangarlin pelas ideias, incentivo e correções.

Aos professores Dr. Antonio Carlos Torres da Costa, Dr. Roberto Luis Portz e Dr.^a Márcia de Holanda Nozaki pela disponibilidade de participarem da banca de avaliação e principalmente pelas interessantes e valiosas contribuições.

Aos amigos Sidiane Coltro, Omari Dildey, Edilaine Valentina, Alice Jacobus pela amizade e, principalmente, pela ajuda na condução e discussão dos experimentos.

Aos demais colegas de “labuta” do Grupo de Pesquisas em Controles Biológico e Alternativo em Fitossanidade (COBALFI), pela convivência e auxílio na realização deste e de outros inúmeros trabalhos.

Obrigada.

"Acordou no ônibus;
Não sabia para onde estava indo, não fazia ideia.

Olhou em volta, apenas indiferença.
Começou a ficar incomodado com a situação.
Queria perguntar para alguém sobre o destino,
mas tinha vergonha.

Tentou olhar pela janela,
mas estava no corredor e a senhora ao seu lado dormia,
com as cortinas fechadas.

Depois de certo transtorno, resignou-se com a situação.
Nunca achou que fosse chegar a lugar algum.
Algum lugar – qualquer que fosse – já seria longe"

Rodrigo Domit
Colcha de Retalhos

RESUMO

BROETTO, Laline. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, fevereiro de 2017. **Indução de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* mediada por diferentes espécies de *Trichoderma* na cultura do feijoeiro.** Orientador: Prof. Dr. Odair José Kuhn. Coorientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

A facilidade de utilização de agrotóxicos e a demanda crescente pelas altas produtividades faz com que o manejo de doenças de plantas seja realizado principalmente com a utilização de produtos químicos. Por outro lado, é crescente a busca por novas tecnologias que possibilitem um modelo de produção que seja compatível com a sustentabilidade. Neste sentido, pesquisas vêm comprovando a eficiência na redução da intensidade de várias doenças através da utilização da indução de resistência. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. no manejo biológico de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, causador do cretamento bacteriano comum, na cultura do feijoeiro, pela sua ação direta e/ou através da indução de resistência através da ativação de mecanismos enzimáticos de defesa. Foram utilizados quinze isolados de *Trichoderma* spp. (TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)), em três testes *in vitro*: confronto direto com o patógeno e produção de compostos voláteis e não voláteis, e dois testes *in vivo*: avaliação da severidade do cretamento bacteriano comum nas plantas de feijoeiro e avaliação da indução de resistência através da análise de enzimas de defesa; peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), fenilalanina amônia-liase (FAL) e β -1,3-glucanase (β -GASE). Os isolados testados juntamente com o fator solo, autoclavado e não autoclavado, apresentaram resultados muito discrepantes em relação à severidade, os resultado *in vitro*, a concentração proteica e atividades das quatro enzimas relacionadas à indução de resistência avaliadas no trabalho. Os isolados TM4, TLB6, TLB4 e TI4 foram capazes de limitar o desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* nos três testes *in vitro* realizados, confronto direto e compostos voláteis e não voláteis. Os isolados TLB15, TM4, TLB9, TLB6, TLB2, TLB12, TOD3 e TLB17 reduziram a severidade do cretamento bacteriano comum. Os isolados TLB3, TI4, TLB12 e TLB15 promoveram aumento na atividade das enzimas POX, PFO e β -GASE. Os isolados TLB15, TLB12, TI4 e TLB3 foram os únicos que proporcionaram aumento da expressão no teor de proteínas totais e em três das quatro enzimas testadas: POX, PFO e β -GASE. O isolado TLB2 foi o que proporcionou maior redução da severidade da doença (80,58%), porém mostrou-se pouco eficiente nos testes *in vitro* e pouca ação na expressão das atividades enzimáticas. Já o isolado TLB15 que proporcionou redução da severidade de 69,86%, mostrou ação *in vitro* para ambos os compostos (voláteis e não voláteis) e induziu maior teor de proteínas totais e a expressão de POX, PFO e β -GASE. O isolado TLB15 foi o isolado que mais vezes proporcionou, quando comparado a testemunha, aumento da expressão da atividade das enzimas avaliadas. De maneira geral, *Trichoderma* sp. pode ser considerado promissor no manejo do cretamento bacteriano comum em feijoeiro.

Palavras-chave: Antagonismo. Controle biológico. Cretamento bacteriano comum. Enzimas de defesa. *Phaseolus vulgaris*.

ABSTRACT

BROETTO, Laline. State University of Western Paraná, February 2017. **Induction of resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* mediated by different species of *Trichoderma* in the bean crop.** Advisor: Prof. Dr. Odair José Kuhn. Co-Advisors: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

The ease of using agrochemicals and the increasing demand for high productivity make the management of plant diseases to happen mainly through the use of chemicals. On the other hand, there is a growing search for new technologies that enable a production model compatible with sustainability. In this sense, research has been proving the efficiency in reducing the intensity of various diseases through induction of resistance. Therefore, this work aimed to investigate the potential of *Trichoderma* spp. isolates in the biological management of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, which causes common bacterial blight, in the bean crop, by its direct action and/or through the induction of resistance through the activation of enzymatic defense mechanisms. Fifteen isolates of *Trichoderma* spp. (TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 and TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 and TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) and TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*)) were used in three *in vitro* tests: direct comparison with the pathogen and production of volatile and non-volatile compounds, and two *in vivo* tests: evaluation of the severity of common bacterial blight in bean plants and evaluation of induction of resistance through defense enzymes analysis; peroxidase (POX), polyphenol oxidase (PFO), phenylalanine ammonia lyase (FAL) and β -1,3-glucanase (β -GASE). The isolates tested together with the factor soil, autoclaved and non-autoclaved, presented very discrepant results in relation to the severity, *in vitro* results, protein concentration and activities of the four enzymes related to induction of resistance evaluated at work. The isolates TM4, TLB6, TLB4, and TI4 were able to limit the development of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in the three *in vitro* tests performed, direct comparison and volatile and non-volatile compounds. Isolates TLB15, TM4, TLB9, TLB6, TLB2, TLB12, TOD3 and TLB17 reduced the severity of common bacterial blight. TLB3, TI4, TLB12 and TLB15 isolates promoted increased activity of POX, PFO, and β -GASE enzymes. Isolates TLB15, TLB12, TI4, and TLB3 were the only ones that provided increased expression in the total protein content and in three of the four enzymes tested: POX, PFO, and β -GASE. The TLB2 isolate was the one that provided the greatest reduction in disease severity (80.58%) but showed little efficiency in the *in vitro* tests and little action in the expression of enzymatic activities. On the other hand, the TLB15 isolate, which reduced the severity at a 69.86% rate, showed *in vitro action* of both compounds (volatile and non-volatile) and induced higher total protein content and POX, PFO and β -GASE expression. The TLB15 isolate was the isolate that provided most frequently when compared to control, increasing of the expression of the activity of the enzymes evaluated. In general, *Trichoderma* sp. may be considered promising in the management of common bacterial blight in bean crop.

Keywords: Antagonism. Biological control. Common bacterial blight. Defense enzymes. *Phaseolus vulgaris*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação, espécie e origem dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizados nos experimentos.....	26
Tabela 2 – Escala de nota utilizada para teste de pareamento de culturas adaptada dos critérios propostos por Bell, Wells e Markhan (1982) e Rodrigues (2010).....	28
Tabela 3 – Notas atribuídas pela técnica de confrontação direta para <i>Trichoderma</i> spp., quanto à inibição de crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> e diâmetro de crescimento dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	34
Tabela 4 – Número de colônias de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em placas de Petri, submetidas ao teste de compostos voláteis e não voláteis com isolados de <i>Trichoderma</i> spp..	37
Tabela 5 – Severidade de cretamento bacteriano comum causado por <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	39
Tabela 6 – Teor de proteínas solúveis totais (mg mL^{-1} g massa fresca ⁻¹) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).	42
Tabela 7 – Atividade de peroxidase (unidade de enzima min^{-1} mg proteína ⁻¹) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).	44
Tabela 9 – Atividade de fenilalanina amônia-liase ($\text{mg ácido trans-cinâmico h}^{-1}$ mg proteína ⁻¹) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).	51
Tabela 10 – Atividade de β -1,3-glucanases ($\text{mg glicose mL}^{-1}$ h ⁻¹ mg proteína ⁻¹) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).	55

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 CULTURA DO FEIJOEIRO	13
2.2 DOENÇAS NA CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM	14
2.2.1 Crestamento Bacteriano Comum	15
2.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	16
2.3.1 O Gênero <i>Trichoderma</i>	17
2.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	18
2.4.1 Mecanismos de Indução de Resistência.....	20
2.4.1.1 Peroxidases (EC 1.11.1.7)	21
2.4.1.2 Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1)	22
2.4.1.3 Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5)	23
2.4.1.4 β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39)	23
2.5 MICROBIOLOGIA DO SOLO, MICRORGANISMOS E INTERAÇÕES	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 EFEITO DE <i>Trichoderma</i> spp. NO CRESCIMENTO IN VITRO DE <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	27
3.1.1 Pareamento de Culturas – Confronto Direto.....	27
3.1.2 Efeito dos Compostos Voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no Crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	28
3.1.3 Efeito dos Compostos Não Voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no Crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	28
3.2 ENSAIOS IN VIVO.....	29
3.2.1 Avaliação da Severidade de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em Feijoeiro Tratado com Diferentes Espécies de <i>Trichoderma</i>	29
3.2.2 Indução a Resistência de Feijoeiro Tratado com <i>Trichoderma</i> spp. Para Proteção Contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	30
3.2.2.1 Obtenção dos Extratos Proteicos	31
3.2.2.2 Determinação de Proteínas Totais	31
3.2.2.3 Atividade de Peroxidase	31
3.2.2.4 Atividade de Polifenoloxidasas	32
3.2.2.5 Atividade de Fenilalanina Amônia-liase	32

3.2.2.6 Atividade de β -1,3-glucanases.....	33
3.2.2.7 Análise dos Resultados.....	33
4.1 EFEITO DE <i>Trichoderma</i> spp. NO CRESCIMENTO IN VITRO DE <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	34
4.1.1 Pareamento de Culturas – Confronto Direto.....	34
4.1.2 Efeito dos Compostos Voláteis e Não Voláteis de <i>Trichoderma</i> spp. no Crescimento de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	36
4.2 ENSAIOS IN VIVO.....	39
4.2.1 Avaliação da Severidade do Crestamento Bacteriano Comum em Feijoeiro Tratado com Diferentes Espécies de <i>Trichoderma</i>	39
4.2.2 Indução a Resistência de Feijoeiro Tratado com <i>Trichoderma</i> spp. Para Proteção Contra <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	41
4.2.2.1 Proteínas Solúveis Totais	41
4.2.2.2 Atividade de Peroxidase	43
4.2.2.3 Atividade de Polifenoloxidasas	46
4.2.2.4 Atividade de Fenilalanina Amônia-liase	50
4.2.2.5 Atividade de β -1,3-glucanases.....	53
4.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DOS ENSAIOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	56
5 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos, a disponibilidade de recursos naturais, a relevante demanda interna e o crescimento do consumo do mercado internacional indicam o potencial de ampliação de uma das principais alavancas do crescimento econômico brasileiro, a produção agrícola. Porém, se por um lado o país apresenta uma das maiores produções agrícolas do mundo, com notável potencial de crescimento, por outro necessita mudar o seu modelo de produção, incorporando práticas que sejam compatíveis com a sustentabilidade (ASSAD; MARTINS; PINTO, 2011).

Em virtude do nosso atual modelo de desenvolvimento agrícola, o Brasil ocupa desde 2008, o lugar de maior consumidor de agrotóxicos do mundo (FACCHINI; SOUZA, 2015). A superação dessa problemática envolve a conversão do modelo agroquímico e mercantil atual, para um modelo de base agroecológica, que necessita de participação popular, decisão política, fortalecimento da educação continuada e, principalmente, o desenvolvimento de pesquisas que permitam a promoção de processos produtivos saudáveis (CARNEIRO et al., 2015).

A busca por alta produtividade agrícola com técnicas eficientes e de fácil uso faz com que os agrotóxicos sejam amplamente utilizados para o controle de doenças de plantas. Porém, no final do século passado, pesquisas se intensificaram e comprovaram a eficiência na redução da intensidade de várias doenças através da utilização da indução de resistência (KUHN; PASCHOLATI, 2010).

A indução de resistência em plantas ocorre devido à possibilidade de ativar os mecanismos de defesa de uma planta (estruturais e bioquímicos) aumentando o nível de resistência aos patógenos, sem a modificação do genoma, através da utilização de um agente indutor que pode ser abiótico (fatores químicos) ou biótico (microrganismos) (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005; STADNIK, 2000).

Como potencial indutor biótico, tem sido avaliado para superar os problemas causados por métodos químicos de proteção de plantas, os fungos do gênero *Trichoderma* sp., que podem ser encontrados em uma grande variedade de ecossistemas e latitudes, principalmente em solos de produção agrícola ou florestal (BROTMAN; KAPUGANT; VITERBO, 2010).

Cultura de destaque na agricultura brasileira, o feijoeiro comum é um dos principais alimentos produzidos e consumidos no Brasil e no mundo. Pela importância nutricional e cultural na culinária de diversos países, sua relevância excede o aspecto econômico (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Porém, a cultura está sujeito a um grande número de

doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus (WENDLAND et al., 2016) e é responsável por 2% de todo o volume de agrotóxicos utilizados no Brasil (CARNEIRO et al., 2015).

Muitas dessas doenças, dependendo das condições climáticas, podem causar grandes perdas na produção ou ainda inviabilizar determinadas áreas para o cultivo. Os danos a cultura podem ocorrer desde a semeadura até o período que os grãos estão secos nas vagens (PAULA JUNIOR et al., 2015).

Uma doença importante de ocorrência generalizada principalmente em regiões quentes e úmidas é o crestamento bacteriano comum, causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (PAULA JUNIOR et al., 2015). Os sintomas da doença afetam principalmente a parte aérea das plantas. Nas folhas, o início da lesão é caracterizado por pequenas manchas úmidas na face inferior, que posteriormente aumentam de tamanho e coalescem, formando áreas pardas e necrosadas. Entre as áreas necrosadas e o tecido sadio, normalmente é possível observar um estreito halo amarelado (MANO; OLIVEIRA; MARTINS, 2013). A doença é controlada principalmente por uso de variedades resistentes e rotação de cultura (FRANSCISCO et al., 2013).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo investigar o potencial de isolados de *Trichoderma* sp. no manejo biológico de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* na cultura do feijoeiro, pela sua ação direta e/ou através da indução de resistência através da ativação de mecanismos enzimáticos de defesa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma dicotiledônia, que pertence à subclasse Archichlamydeae, ordem Rosales e família Fabaceae (SANTOS et al., 2015). Segundo Antunes (2008) o feijoeiro comum teve origem no continente Americano e a importância que o grão adquiriu como alimento no mundo está relacionado à sua distribuição geográfica.

O feijoeiro é uma planta anual herbácea, trepadora ou não, de sistema radicular pivotante e parte aérea formada por uma haste principal ramificada, ereta ou não. As folhas são compostas de três folíolos e o fruto é uma vagem de comprimento variável, de 10 a 20 cm, recurvada ou não, terminada geralmente em bico proeminente. As sementes apresentam tamanhos e colorações variáveis de acordo com as variedades. O desenvolvimento do feijoeiro compreende duas fases: vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa compreende o período de desdobramento das folhas primárias até o aparecimento dos primeiros botões florais. A fase reprodutiva ocorre desde a emissão dos botões florais até o pleno enchimento de vagens e a maturação das sementes (SANTOS et al., 2015).

Dentre os elementos climáticos que mais podem influenciar a produtividade do feijoeiro ressaltam-se a radiação solar, temperatura e a precipitação pluvial. Em relação ao fotoperíodo, as cultivares brasileiras de feijoeiro geralmente são insensíveis (ANDRADE et al., 2015).

O feijoeiro comum é um dos principais alimentos produzidos e consumidos no Brasil e no mundo. Pela importância nutricional e cultural na culinária de diversos países, sua relevância excede o aspecto econômico (BARBOSA; GONZAGA, 2012). Para Antunes et al. (1995), o feijoeiro comum constitui uma importante fonte de proteína na dieta de grande parte da população mundial, principalmente em países onde o consumo de proteína animal é reduzido, por razões econômicas, culturais ou religiosas.

No Brasil, a mistura feijão e arroz constitui a base da dieta da população (BARBOSA, 2007). Rico em fibras solúveis, o feijão tem sido comprovadamente responsável por auxiliar na prevenção do câncer de cólon, além de reduzir os níveis de açúcar e de colesterol no sangue em seres humanos (NALEPA; FERREIRA, 2013). Para Messina (1999) seu consumo

é benéfico do ponto de vista nutricional, pois a presença de compostos fenólicos pode possibilitar a redução de doenças.

Os principais países produtores do grão são: Índia, Brasil, Mianmar, China e Estados Unidos da América (FAO, 2012). No ano de 2015 no Brasil, a produção total foi de 3.115.000 toneladas em uma área cultivada de 3.040.000 ha, movimentando mais de 8 bilhões de reais na economia brasileira (CONAB, 2016). A produção nacional concentra-se nos Estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Além disso, para abastecer o mercado interno é necessário a importação do produto de outros países como Argentina, Chile e México (EMBRAPA, 2017). No Brasil, o consumo per capita de feijão foi de aproximadamente 15,52 kg no ano de 2016 (CONAB, 2016).

Amplamente distribuído em todos os estados brasileiros, a cultura do feijoeiro pode ser encontrada nos mais diversos graus de tecnificação, desde a cultura como subsistência até a mais alta tecnologia, com irrigação, cultivares de alta produtividade, resistência a patógenos e adubação equilibrada (TORRES; SILVA JUNIOR; MARINGONI, 2009). Em todas as regiões de cultivo, a cultura pode ter sua produção afetada por diferentes fatores, como doenças, insetos pragas, acidez do solo, disponibilidade hídrica e condição nutricional (FAGERIA; STONE, 1999; SILVEIRA; STONE, 1998).

2.2 DOENÇAS NA CULTURA DO FEJJOEIRO COMUM

O feijoeiro comum possui notável instabilidade produtiva, apresentando acentuada vulnerabilidade à ação dos agentes de natureza abiótica ou biótica. O uso indiscriminado de defensivos, aliado a estratégias puramente visando o incremento de rendimento, tem provocado o rompimento do equilíbrio natural regulado pelas relações patógeno-antagonista (ANDRADE et al., 2015).

Uma das principais causas da baixa produtividade da cultura do feijoeiro no Brasil são as doenças. Muitas dessas doenças, dependendo das condições climáticas, podem causar grandes perdas na produção ou ainda inviabilizar determinadas áreas para o cultivo. Os danos a cultura podem ocorrer desde a semeadura até o período que os grãos estão secos nas vagens (PAULA JUNIOR et al., 2015).

As doenças da cultura do feijoeiro podem ser divididas, didaticamente, em dois grupos: doenças radiculares e doenças da parte aérea (sementes, vagens, hastes e foliares) (MICHEREFF et al., 2005). Para as doenças da parte aérea os principais organismos que podem interferir na produção são os fungos, os vírus e as bactérias. Dentre essas doenças

pode-se destacar os mosaicos, o crestamento bacteriano comum, fogo selvagem, antracnose, manchas angulares, manchas de alternaria, ferrugem, oídio e mofo branco (WENDLAND et al., 2016).

Segundo Moura e Brito (2015), o cultivo do feijoeiro ocorre durante todo o ano no país, o que pode favorecer a manutenção do inóculo no ambiente e dificultar a interrupção do ciclo das doenças que afetam a cultura.

2.2.1 Crestamento Bacteriano Comum

Relatada pela primeira vez nos Estados Unidos da América, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, agente causal do crestamento bacteriano comum, é uma das principais doenças que acometem a cultura do feijoeiro, ocorrendo de maneira generalizada, principalmente em regiões quentes e úmidas (PAULA JUNIOR et al., 2015). Segundo Wendland et al. (2016) e Francisco et al. (2013) está presente na maior parte do mundo e no Brasil tem sido descrita como problemática na Região Centro-Oeste e nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná, Espírito Santo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

A bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pertence ao Reino Procariótico, Divisão Gracilicutes, Classe Proteobactéria e Família Pseudomonadaceae (AGRIOS, 2005). Possui um flagelo polar, é móvel, baciliforme e gram negativa. Quando cultivadas em meio ágar nutriente apresentam colônias de coloração amareladas e brilhantes, de bordos convexos e lisos (BRADBURY, 1986).

Esse patógeno é disseminado principalmente através de sementes (FRANCISCO et al., 2013) onde pode sobreviver por até 15 anos, sendo o desenvolvimento da doença favorecido por temperatura e umidade elevadas e seus maiores danos ocasionados a 28 °C (RAVA; SARTORATO, 1994). A sobrevivência do patógeno após a colheita da cultura pode ocorrer em sementes, plantas daninhas e algumas leguminosas (CTSBF, 2012).

Os sintomas da doença afetam principalmente a parte aérea das plantas. Nas folhas, o início da lesão é caracterizado por pequenas manchas úmidas na face inferior, que posteriormente aumentam de tamanho e coalescem, formando áreas pardas e necrosadas. Entre as áreas necrosadas e o tecido sadio, normalmente é possível observar um estreito halo amarelado. Nas hastes, as manchas são compridas e avermelhadas e nas vagens as manchas inicialmente apresentam-se encharcadas e posteriormente avermelhadas. As sementes podem ou não apresentar sintomas visíveis, como descoloração e enrugamento (MANO; OLIVEIRA; MARTINS, 2013).

Segundo Francisco et al. (2013) o cretamento bacteriano comum é controlado principalmente por uso de variedades resistentes e rotação de cultura. Para Paula Junior et al. (2015) como os isolados da bactéria diferem quanto à agressividade, o desenvolvimento de cultivares resistentes tem sido trabalhoso.

Segundo Bianchini, Maringoni e Carneiro (2005), o método principal de controle baseia-se na utilização de sementes saudáveis e para Viecegli e Moerschbacher (2013) é possível reduzir a severidade de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* utilizando fertilizantes foliares a base de manganês.

2.3 CONTROLE ALTERNATIVO DE DOENÇAS DE PLANTAS

O Brasil, desde 2008, ocupa o lugar de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. O grande impacto na saúde pública, além de envolver trabalhadores de diversos ramos de atividades envolve todos os consumidores de alimentos contaminados (FACCHINI; SOUZA, 2015). Para Sousa et al. (2012), os diversos tipos de controle alternativo podem ser uma alternativa viável ao uso de produtos químicos, porém, existe a necessidade de mais estudos, relacionando principalmente o tipo de controle com a doença específica, visando subsidiar os agricultores para a produção de alimentos livres de agroquímicos e com menor impacto ao meio ambiente. Segundo Stangarlin, Kuhn e Schwan-Estrada (2008), diversas pesquisas vem testando produtos alternativos para reduzir os problemas fitossanitários, principalmente devido à crescente conscientização dos problemas causados no ambiente pelo uso dos produtos químicos. Para Moraes (1992), uma das perspectivas do controle alternativo é o controle biológico e a indução dos mecanismos de resistência das defesas das plantas.

O que se busca no manejo alternativo de doenças é o estabelecimento do equilíbrio biológico que tem por objetivo reduzir a dependência dos produtos químicos que contaminam o ambiente ou provocam alterações que comprometem sua sustentabilidade (SILVA; MELO, 2013).

A utilização do controle biológico, que consiste na redução da quantidade e da viabilidade do inóculo de um organismo patogênico ou de atividades determinantes da doença induzida por um ou mais organismos antagonistas ou indutores de resistência em plantas, pode ser uma alternativa ao controle químico (BLUM, 2007).

Para Morandi e Bettiol (2009), dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos, um dos mais discutidos é o controle biológico, que pode tanto ser realizado pela introdução de um agente de controle biológico quanto aproveitar o controle biológico natural.

Segundo Bedendo, Massola Junior e Amorim (2011), o controle biológico de doenças de plantas é uma tentativa de transportar situações de ocorrência frequente na natureza ao sistema agrícola. Baseado em relações antagônicas, as principais interações entre microrganismos presentes nos agentes utilizados no controle biológico são: antibiose, competição e parasitismo, além da possibilidade da ativação de mecanismos de defesa natural das plantas.

O controle de doenças através da ativação de mecanismos de defesa natural das plantas, visando aumentar a produtividade de culturas pelo controle de enfermidades, foi provavelmente o primeiro método usado para o combate a fitopatógenos, mas somente há pouco tempo começou a ser investigado de forma mais direcionada para uma aplicação prática (ROMEIRO, 2008).

A proteção contra patógenos através da indução de resistência se manifesta normalmente através da redução dos sintomas e inibição do crescimento dos agentes patogênicos (BARROS et al., 2010).

No Brasil, alguns produtos biológicos estão disponíveis para utilização, dentre esses podemos citar os fungos do gênero *Trichoderma*, que têm sido utilizados como um indutor biótico para controle de patógenos de solo e parte aérea (MORANDI; BETTIOL, 2009). Segundo os mesmos autores, foi na década de 1950 que ocorreu a primeira publicação sobre o uso de *Trichoderma* como agente de controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Para Lucon (2014), embora a disponibilidade de produtos comerciais à base de *Trichoderma* tenha aumentando nos últimos anos, alguns entraves como falta de informações sobre esses agentes e carência de produtos registrados tem dificultado no Brasil o crescimento deste mercado.

2.3.1 O Gênero *Trichoderma*

O gênero *Trichoderma*, pertence ao filo Ascomycota, Ordem Hypocreales (RESENDE et al., 2004) e é composto por fungos naturais de solos de clima temperado e tropical que podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos, controlando-os por vários mecanismos (HARMAN et al., 2004). Até o momento foram descritas 328 espécies (INDEX FUNGORUM, 2017) que geralmente são caracterizadas pelo rápido crescimento e capacidade de sobreviver em condições ambientais diversas (AL-SADI et al., 2015).

A principal característica morfológica dos fungos do gênero *Trichoderma* é a presença de conídios, formados a partir de células conidiogênicas, que origina estruturas denominadas conidióforos, além de apresentar micélio, de crescimento rápido e inicialmente de coloração

branca, que à medida que o fungo se desenvolve, torna-se esverdeado e cotonoso. A coloração da colônia pode apresentar diferentes tons de verde, podendo ser influenciado pelo meio de cultivo (DOMSCH; GAMS; ANDERSON, 1980).

Estes fungos estão presentes em solos agrícolas em todas as latitudes e podem ser facilmente cultivados *in vitro* apresentando uma esporulação de tom esverdeado (BROTMAN; KAPUGANTI; VITERBO, 2010). São altamente seletivos, seguros para a saúde humana, animal e do meio ambiente e não prejudicam os inimigos naturais (ZHANG; CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2015).

As diferentes espécies de *Trichoderma* podem colonizar a superfície da raiz e provocar alterações no metabolismo da planta, favorecendo o desenvolvimento radicular e promovendo melhor absorção de nutrientes e induzindo a expressão de genes envolvidos nas respostas de defesa da planta contra patógenos (HERMOSA et al., 2000). Segundo Monte (2001) podem crescer mais rápido que o patógeno e utilizar sua fonte de alimentos; podem liberar produtos que retardam o desenvolvimento ou causam a morte do patógeno ou ainda atuar parasitando diretamente o patógeno.

Mayo et al. (2015) relataram que isolados de *Trichoderma* sp. foram capazes de induzir genes de defesa a *Rhizoctonia solani* causador da podridão radicular de *Rhizoctonia*, importante doença do feijoeiro. Esse resultado corrobora com os apresentados por Pedro et al. (2012), que relataram que *Trichoderma strigosum* foi capaz de conferir proteção sistêmica de plantas de feijoeiro a antracnose, causada por *Colletotrichum lindemuthianum*.

Para Keswani et al. (2014), *Trichoderma* tem sido utilizado como agente de controle biológico em todo o mundo devido à sua atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de fitopatógenos. De acordo com os autores essa capacidade pode ser atribuída aos diversos tipos de metabólitos secundários produzidos pelo fungo e por isso várias estratégias têm sido testadas de modo a desenvolver formulações que facilitem a utilização, como organismo inteiro, suspensão de esporos e/ou formulações à base de talco.

2.4 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Constantemente as plantas passam por diversas situações de estresses e conseguem expressar respostas de defesa com objetivo de retornar ao metabolismo normal e superar tais estresses (SOARES; MACHADO, 2007). Independente da chegada do patógeno ao sítio de infecção, as plantas naturalmente possuem uma resistência baseada em barreiras e mecanismos de defesa já existentes (BARROS et al., 2010). Além disso, as plantas possuem

outros mecanismos de defesa que permanecem inativos ou latentes, sendo ativados e expressados após serem expostas a agentes de indução (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

A resistência induzida consiste no aumento do nível de resistência por meio da utilização de agente externos, denominados indutores, ocorrendo de maneira não-específica, por meio da ativação de genes latentes que codificam para diversas respostas de defesa, tais como proteínas relacionadas à patogênese; enzimas envolvidas na rota de síntese de fitoalexinas e espécies reativas de oxigênio; acúmulo de lignina em tecidos circunvizinhos ao local de penetração do microrganismo, entre outras (STADNIK, 2000).

Segundo Bonaldo, Pascholati e Romeiro (2005) agente indutor é qualquer composto ou fator capaz de ativar mecanismos de defesa da planta, e eliciador é a molécula presente em um indutor responsável pela ativação desses mecanismos. Atualmente, eliciadores podem ser classificados quanto à origem, biótica ou abiótica.

Um considerável avanço na indução de resistência com o uso de eliciadores de origem abióticos foi observado após o desenvolvimento do éster-S-metil do ácido benzo-(1,2,3)-tiadiazole-7-carbotióico (acibenzolar-S-metil[®], ASM). Produtos como Bion, Messenger, Oryzmate, Elexa e Oxycom são alguns representantes de uma nova geração de defensivos agrícolas, empregados em um programa racional e eficiente de manejo de doenças de plantas (ATHAYDE SOBRINHO; FERREIRA; CAVALCANTI, 2005).

A ativação dos mecanismos de defesa da planta por eliciadores de origem bióticos pode ocorrer por compostos presentes em extratos de plantas, leveduras, exopolissacarídeos bacterianos, rizobactérias ou fungos promotores de crescimento, raças não virulentas do patógeno ou ainda o próprio patógeno inativado (SILVA et al., 2008).

Durante a indução de resistência, o reconhecimento do agente patogênico ativa na planta processos de sinalização que conduz para a expressão de genes associados à defesa (MÉTRAUX, 2007). Segundo Blum (2007) na indução de resistência, a planta tem a defesa induzida, através de estímulo à produção de enzimas relacionadas à defesa, fitoalexinas, fenóis e barreiras morfológicas.

O efeito protetor pode durar desde poucos dias ou por todo o período de vida da planta, dependendo da espécie da planta e do indutor, não apresenta especificidade, portanto, as plantas são protegidas contra um amplo espectro de fitopatógenos (PASCHOLATI, 2011). Porém, nem sempre a indução de resistência leva ao controle de uma doença, pois os mecanismos de defesa ativados podem ser de curta duração e localizados (BEDENDO; MASSOLA JUNIOR; AMORIM, 2011). Além disso, toda a alocação de recursos da planta

para ativação de mecanismos de defesa pode ser considerada como custo adaptativo que podem refletir na produtividade (KUHN; PASCHOLATI, 2007; 2010).

2.4.1 Mecanismos de Indução de Resistência

A ativação de barreiras físicas e químicas envolvidas no processo de indução de resistência de plantas contra fitopatógenos está diretamente relacionada à eficiência do hospedeiro em reconhecer a presença do patógeno, através de mecanismos de percepção e transdução de sinais, que envolvem mudanças no estado de fosforilação de várias proteínas e alterações transitórias no fluxo de íons através da membrana plasmática (FERNANDES et al., 2009; GUZZO; HAKAKA, 2007).

Mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primários e secundários estão relacionadas aos mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos (ARAÚJO; MENEZES, 2009). Segundo Vieira Junior e Romeiro (2007), a indução de resistência tem sido correlacionada diretamente a síntese de enzimas importantes em diferentes rotas metabólicas de defesa, como peroxidases, lipoxigenases, glucanases, quitinases e fenilalanina amônia-liase.

Os mecanismos de resistência das plantas envolvem barreiras estruturais e bioquímicas que são divididos didaticamente em: pré-formados e pós-formados. Os pré-formados, considerados passivos ou constitutivos, são aqueles presentes nas plantas antes do patógeno entrar em contato. Os pós-formados, considerados ativos ou induzíveis, estão ausentes ou presentes em baixas concentrações antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta a presença dos patógenos (PASCHOLATI, 2011).

Fatores como a cutícula, estômatos e tricomas são considerados barreiras estruturais pré-formadas. Barreiras como a lignificação, formação de halos, papilas e de camadas de cortiça e abscisão constituem os mecanismos estruturais pós-formados (SILVA et al., 2008).

Nos mecanismos bioquímicos pré-formados é possível encontrar substâncias como fenóis, lactonas, alcalóides, algumas proteínas e terpenóides, como ácido clorogênico, ácido catecóico e protocatecóico, avenacinas, tuliposídeos, α -tomatina, glicosídeos fenólicos, enzimas de defesa vegetal e inibidores proteicos (STANGARLIN et al., 2011).

As barreiras bioquímicas pós-formadas englobam o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-RP) e a formação de radicais livres oriundos do estresse oxidativo, como as espécies reativas de oxigênio e o óxido nítrico (SILVA et al., 2008; STANGARLIN et al., 2011).

As Proteínas-RP compreendem um alto número de polipeptídios aparentemente comum para diferentes espécies de plantas e induzidas de forma similar por diferentes patógenos e com uma grande diversidade de funções (PÉREZ, 1990).

Outro mecanismo de resistência é a chamada reação de hipersensibilidade que possibilita a planta limitar a infecção impedindo o acesso do patógeno a células vizinhas (BARROS et al., 2010). A reação de hipersensibilidade é resultado da morte celular programada no sítio de infecção que resulta no aparecimento de lesões necróticas no local da infecção e na expressão de uma variedade de genes de defesa, impedindo o desenvolvimento da infecção pelo patógeno (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011).

2.4.1.1 Peroxidases (EC 1.11.1.7)

Mudanças na atividade da enzima peroxidase têm sido correlacionadas a resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas, atuando na oxidação de componentes da parede celular numa ação preventiva contra a penetração de patógenos (STANGARLIN et al., 2011). Para Araujo e Menezes (2009) e Kuhn (2007) o grupo de peroxidases são bastante estudadas por apresentarem papel importante na defesa das plantas contra fitopatógenos e na maioria dos casos o aumento de sua atividade está relacionada com a redução da severidade da doença.

As peroxidases, classificadas como proteínas relacionadas a patogênese, pertencentes a família PR-9 (VAN LOON; VAN STREIN, 1999) atuam diretamente na defesa de plantas e nas vias de sinalização relacionadas a diversos processos fisiológicos (PINTO; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2011). Catalisam a oxidação e polimerização de álcool hidroxycinâmico na presença de peróxido de hidrogênio produzindo lignina que pode acumular-se nas paredes das células das plantas, e em conjunto com a celulose e outros polissacarídeos, funcionar como uma barreira à penetração de fungos (STADNIK; BUCHENAUER, 2000). A lignificação limita o crescimento e desenvolvimento do patógeno nos tecidos vegetais, aumenta a resistência da parede celular ao ataque de enzimas hidrolíticas, a difusão de toxinas produzidas pelo patógeno e impede o fluxo de nutrientes do hospedeiro para o invasor (PASCHOLATI, 2011). Além de estar associada a lignificação, peroxidases também estão envolvidas nas ligações de polissacarídeos e monômeros, oxidação de fenóis e do ácido indol-3-acético, na cicatrização de ferimentos e na regulação da elongação de células (CAMPOS; SILVEIRA, 2003). Segundo Stintzi et al. (1993), a ação catalítica das peroxidases produz

espécies ativas de oxigênio que podem resultar na ativação de outras respostas de defesa em plantas.

Segundo Araujo e Stadnik (2013), as plantas resistentes apresentam atividade de peroxidase mais elevada quando em comparação com plantas suscetíveis, em geral associada ao rápido reconhecimento da presença do patógeno e da ativação de defesas eficazes contra o invasor.

2.4.1.2 Polifenoloxidasas (EC 1.14.18.1)

A polifenoloxidase é uma importante enzima para as plantas e geralmente está presente em alta concentração em tecidos infectados. Sua ação ocorre através da hidroxilação de monofenóis para *o*-difenois e então para quinonas. A provável importância da atividade da polifenoloxidase está na propriedade de oxidar compostos fenólicos para quinonas, que para os microrganismos são mais tóxicas que o fenol original (AGRIOS, 2005; CAMPOS; SILVEIRA, 2003).

Além de estarem associadas a lignificação, as polifenoloxidasas estão associadas a proteção de plantas contra organismos invasores, pois a catálise de compostos fenólicos produzem quinonas reativas que possuem ação tóxica (MAYER; STAPLES, 2002).

Próximo ao local da descompartimentalização celular induzida pelo patógeno, a peroxidase e a polifenoloxidase lideram a degradação oxidativa de compostos fenólicos. Esta ação resulta no aparecimento de substâncias escuras provenientes da polimerização oxidativa das quinonas (BOLWELL et al., 2002). As polifenoloxidasas, em sua grande maioria permanecem intracelularmente em estado inativado, nos cloroplastos, porém uma pequena parte pode estar presente na parede celular (MAYER; STAPLES, 2002; TRAN; TAYLOR; CONSTABEL, 2012). Após a penetração do patógeno a enzima é liberada dos tilacóides dos cloroplastos e então produz quinonas através da oxidação dos compostos fenólicos (THIPYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004).

Os compostos fenólicos podem agir inibindo o crescimento bacteriano limitando a translocação do patógeno, pois atuam como precursores na formação de barreiras físicas (AYDEMIR, 2004). Já as quinonas são moléculas altamente reativas, e podem se polimerizar levando a formação de pigmentos de cor marrom ou preta, responsáveis pelo escurecimento dos tecidos (KARSTEN et al., 2013).

2.4.1.3 Fenilalanina amônia-liase (EC 4.3.1.5)

Enzima do metabolismo secundário mais estudada em plantas, a fenilalanina amônia-liase, é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em amônia e ácido *trans*-cinâmico, que pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos como: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido 4-coumárico e ácido sinápico, os quais estão presentes na formação de ésteres, flavonóides, ligninas e coumarinas (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Sua atividade pode ser reguladora da biossíntese de fitoalexinas derivadas dos fenilpropanóides (PASCHOLATI, 2011) e induzida pela suplementação exógena de eliciadores como o ácido salicílico e o metil jasmonato (YAO; TIAN, 2005).

Envolvida na resistência a pragas e patógenos, a fenilalanina amônia-liase é uma enzima chave para todas as vias de síntese de compostos fenólicos. Sua produção ocorre durante o crescimento vegetal, sendo também induzida em células vizinhas a infecção por vários estímulos como ferimentos, infecção, luz, reguladores de crescimento e contaminação por metais pesados (RAHMAN; PUNJA, 2005).

Diferentemente das polifenoloxidasas e peroxidases a fenilalanina amônia-liase atua sobre um substrato específico, a fenilalanina, porém é codificada por múltiplos genes, podendo ter várias combinações entre os monômeros da enzima, cuja combinação depende do indutor (DIXON; PAIVA, 1995).

2.4.1.4 β -1,3-glucanases (EC 3.2.1.39)

Enzima lítica que hidrolisa a β -1,3-glucana, a atividade de β -1,3-glucanases normalmente é elevada nos tecidos vegetais em resposta à infecção e tratamentos hormonais e químicos (PASCHOLATI, 2011). Com massa entre 25 e 35 kDa, essas endoglucanases produzem a partir da laminarina oligômeros de dois a seis unidades de glicose e constituem um importante componente da parede celular de muitos fungos (BOL; LINTHORST; CORNELISSEN, 1990). Exemplo de proteínas-RP, a β -1,3-glucanase pode participar do processo de expressão da resistência induzida de diferentes formas (ROMEIRO, 2007).

Pertencentes à família PR-2, as β -1,3-glucanases podem exibir formas básicas, que ocorrem normalmente intracelularmente, nos vacúolos, e ácidas, que ocorrem extracelularmente e possuem ação imediata na defesa das plantas, pois agem diretamente nas hifas invasoras (CAVALCANTI et al., 2005).

Dixit, Singh e Singh (2015) observaram aumento significativo na atividade enzimática de β -1,3-glucanase em feijoeiro tratados com diferentes espécies de *Trichoderma*, o que possivelmente contribuiu para a redução da severidade de *Sclerotinia sclerotiorum*.

2.5 MICROBIOLOGIA DO SOLO, MICRORGANISMOS E INTERAÇÕES

O solo é um sistema complexo e possuir uma boa qualidade física, química e biológico é extremamente importante para se manter produtivo (SEIDEL, 2016). Segundo Torsvik, Goksøyr e Daae (2009), um grama de solo pode conter 10 bilhões de microrganismos distribuídos em milhares de espécies. Para Kuhn e Stangarlin (2016) a presença de microrganismos no solo ocorre basicamente por conter água, energia e nutrientes em ambiente favorável.

A fração viva do solo é essencial para seu funcionamento, pois os organismos possuem funções de grande importância, como a degradação de compostos orgânicos, ciclagem de nutrientes, fixação biológica de nitrogênio e/ou o auxílio às plantas na absorção de nutrientes (ANDREOTE; CARDOSO, 2016).

Segundo Cotta (2016), a diversidade microbiana está diretamente relacionada com um conjunto de fatores abióticos, como, atmosfera, temperatura, água, pH, potencial redox, fontes nutricionais, entre outros e fatores bióticos, como genética microbiana e interação entre os microrganismos. Para Moreira e Siqueira (2009) é a interação entre esses fatores que afeta diretamente a ecologia, a atividade e a dinâmica populacional de microrganismos no solo.

Os microrganismos e os outros seres vivos presentes no solo, como as plantas e a fauna, não sobrevivem de forma isolada. Essas interações ecológicas podem ser divididas, didaticamente, em dois grupos, interações positivas e interações negativas. Nas interações positivas (relações simbióticas mutualísticas e comensalismo), pelo menos um dos organismos envolvidos é beneficiado e nenhum deles é prejudicado, já nas interações negativas (antagonismo, predação, parasitismo e predação), pelo menos um dos organismos envolvidos é prejudicado, ocorrendo ou não benefícios para a outra parte (MATOS; DURRER; ANDREOTE, 2016).

Nos solos, as raízes das plantas crescem e secretam uma diversidade de exsudatos orgânicos que estimulam o crescimento de microrganismos presentes na rizosfera (ROMAGNOLI; ANDREOTE, 2016). A rizosfera, região do solo sob influência das raízes, é uma região de grandes transformações microbianas, estimuladas pela liberação de compostos

orgânicos produzidos pela planta e que resulta na atração de abundante diversidade de microrganismos (KUHN; STANGARLIN, 2016).

Segundo Barret, Morrissey e O’Gara (2011), os microrganismos residentes na rizosfera influenciam diretamente o desenvolvimento das culturas, pois podem beneficiar ou prejudicar a planta. Para Hartmann, Rothballer e Schmid (2008), a resistência das plantas para a patogênese é dependente da composição microbiana da rizosfera.

Para Sahashi, Tsuji e Shishiyama (1989) o cultivo de plantas em condições de solo estéril pode torná-las mais susceptíveis a agentes patogênicos do que aquelas cultivadas sob condições normais de campo.

Segundo Walters (2009) as plantas podem ser induzidas a desenvolver uma maior resistência aos patógenos por tratamentos com agentes bióticos e abióticos. Apesar de ser de amplo espectro e algumas vezes duradoura, a resistência raramente proporciona controle completo da doença, possivelmente pela capacidade de resistência da planta já ser induzida através de suas interações com o ambiente biótico e abiótico.

Uma vez induzida, a planta pode resistir ao ataque do patógeno devido a uma maior capacidade de expressar defesas rapidamente, principalmente pela capacidade de todas as plantas possuírem mecanismos genéticos para se defender e o tratamento indutor ativa defesas diretamente e/ou condiciona a planta a expressar defesas rapidamente na presença do patógeno (priming) (GOELLNER; CONRATH, 2008; HAMMERSCHMIDT, 2007).

A indução de resistência é frequentemente associada a uma maior capacidade de mobilização de respostas de defesa celular induzida por uma infecção num processo chamado “priming”. O modo de ação do “priming” é o resultado da potencialização das respostas de defesa celular, pois ao invés da direta sinalização das respostas de defesa, a expressão só irá ocorrer quando realmente necessário, ou seja, no momento do ataque do patógeno, o que pode revelar-se de enorme vantagem em termo de custos de energia para a planta (CONRATH; PIETERSE; MAUCH-MANI, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os três experimentos *in vitro* (confronto direto e compostos voláteis e não voláteis) foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e os dois experimentos *in vivo* (severidade e indução de resistência) em cultivo protegido no Complexo de Controle Biológico e Cultivo Protegido Prof. Dr. Mário César Lopes, pertencentes à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste, *campus* de Marechal Cândido Rondon, Paraná.

O isolamento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi realizado a partir de folhas de uma planta de feijão com presença de sintomas característicos de cretamento bacteriano comum (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005), pelo método do isolamento indireto em meio AN (ágar – nutriente). As placas de Petri com o meio de cultura e o patógeno foram mantidas a 28 °C (ROMEIRO, 2013b).

Os 15 isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos experimentos (Tabela 1), pertencem à coleção do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, e foram mantidos em placas de Petri com meio BDA (batata – dextrose – ágar) 28 °C e fotoperíodo de 12 horas.

Tabela 1 - Identificação, espécie e origem dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos experimentos.

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

3.1 EFEITO DE *Trichoderma* spp. NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Para o teste *in vitro* de confronto direto, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada um dos 15 isolados de *Trichoderma* spp. (tratamentos), totalizando 60 parcelas experimentais.

Para os testes *in vitro*, produção de compostos voláteis e não voláteis, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições para cada um dos 15 isolados de *Trichoderma* spp. (tratamentos) e uma testemunha, totalizando 64 parcelas experimentais, considerando-se cada placa uma unidade experimental.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5%, utilizando o software SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

3.1.1 Pareamento de Culturas – Confronto Direto

Para o confronto direto foi utilizado o teste de pareamento de culturas. Para isso, com o auxílio de uma alça estéril, foi transferido a suspensão de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ com base em curva de absorbância a 580 nm (MAFIA; ALFENAS; GONÇALVES, 2007) a 1 cm de uma das extremidades da placa de Petri contendo meio BDA com adição de 8 g de caseína para cada 1.000 mL de meio (ZAUZA; ALFENAS; MAFIA, 2007). As placas contendo o patógeno foram incubadas por 24 horas a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Após este período, discos de meio de cultura BDA (10 mm de diâmetro) contendo micélio de *Trichoderma* spp. foram colocados na outra extremidade da placa. Após 10 dias de incubação das culturas em BOD a 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas, foi realizado a avaliação do experimento, conforme metodologia adaptada de Fontenelle et al. (2011).

A avaliação do experimento foi realizada de duas maneiras: a primeira pela medida do diâmetro de crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. e a segunda, adaptada dos critérios propostos por Bell, Wells e Markhan (1982) e Rodrigues (2010) (Tabela2).

Tabela 2 – Escala de nota utilizada para teste de pareamento de culturas adaptada dos critérios propostos por Bell, Wells e Markhan (1982) e Rodrigues (2010).

Notas	Escala de avaliação
1	Antagonista cresce por toda a placa de Petri e sobre o patógeno
2	Antagonista cresce por toda a placa de Petri, porém não sobre o patógeno
3	Antagonista cresce sobre $\frac{3}{4}$ da placa de Petri
4	Antagonista cresce sobre $\frac{2}{3}$ da placa de Petri
5	Antagonista cresce até metade da placa de Petri
6	Antagonista cresce até menos da metade da placa de Petri

3.1.2 Efeito dos Compostos Voláteis de *Trichoderma* spp. no Crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Para a avaliação do efeito da produção de compostos voláteis, os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em placas de Petri com meio BDA, sendo estas placas fechadas na parte superior por outra placa de Petri contendo, meio AN na qual foi previamente transferido 100 µL de suspensão de células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* calibradas para número de colônias final entre 30 e 300. Estas placas ficaram fixadas e vedadas por filme plástico e incubadas em BOD a 28 °C por um período de 36 horas. Após este período contabilizou-se o número de colônias de bactéria por placa. O número de colônias foi comparado com outra placa contendo meio BDA sem a presença de *Trichoderma* (testemunha), conforme metodologia adaptada de Romeiro (2007).

3.1.3 Efeito dos Compostos Não Voláteis de *Trichoderma* spp. no Crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Para a avaliação do efeito da produção de compostos não voláteis, os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivadas em caldo batata dextrose por sete dias, mantidas sob agitação constante de 150 RPM em incubadora agitadora e em seguida, o meio foi filtrado recolhendo-se o sobrenadante, o qual foi esterilizado por filtração com membrana de celulose com poro de 0,22 µm. 100 µL do sobrenadante estéril foram espalhados em placas de Petri contendo meio AN, e as placas ficaram em repouso por 2 horas para absorção do sobrenadante. Em seguida foram transferidos 100 µL de suspensão de células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* calibradas para número de colônias final entre 30 e 300, e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em BOD a 28 °C por 36 horas e em seguida foi contabilizado o número de colônias por placa. O número de colônias foi

comparado com placas sem a adição de compostos produzidos pelos isolados fúngicos (testemunha).

3.2 ENSAIOS *IN VIVO*

O solo utilizado nos dois experimentos foi previamente autoclavado por 25 min a 120 °C, sendo essa operação repetida após 24 horas, para enchimento dos vasos de seis litros que continham: solo – areia – matéria orgânica na proporção de 3:2:1. O solo LATOSSOLO VERMELHO Eutroférico de textura muito argilosa (SANTOS et al., 2013), foi retirado da fazenda experimental Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, localizado no Núcleo de Estações Experimentais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, situada na Linha Guará no município de Marechal Cândido Rondon, Paraná, não sendo realizada adubação complementar.

Para o tratamento das sementes de feijão, os 15 isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados em erlenmeyer contendo arroz (20 g de arroz para cada 25 mL de água autoclavada por 20 min a 120 °C) e mantidos em BOD a temperatura de 28 °C, com fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. Após o período de incubação, foi realizada a semeadura do feijoeiro e para cada semente de feijão foi inserido no sulco da semeadura três grãos de arroz, contendo conídios e micélio dos *Trichoderma* spp. (PEDRO et al., 2012).

O cultivar de feijão utilizado nos experimentos foi Iapar 81 do grupo carioca, de porte ereto com hábito de crescimento indeterminado, tipo II.

3.2.1 Avaliação da Severidade de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em Feijoeiro Tratado com Diferentes Espécies de *Trichoderma*

Em cada um dos vasos de seis litros utilizados no experimento foram semeadas quatro sementes de feijão, conforme descrito no item 3.2, e após doze dias foi realizado o desbaste deixando-se apenas duas plantas por vaso.

Para avaliação da severidade foi realizado inoculação do patógeno, 25 dias após a semeadura, quando as plantas apresentavam o primeiro trifólio completamente expandido, através da pulverização da suspensão bacteriana com concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ com base em curva de absorbância a 580 nm, aplicada por meio de borrifador manual, até o ponto de escorrimento nas folhas das plantas de feijão. Após a inoculação, as plantas de feijoeiro foram mantidas em câmara úmida por 36 h (MAFIA; ALFENAS; GONÇALVES, 2007).

Após 20 dias da inoculação da bactéria foi realizada a avaliação da severidade através da porcentagem de tecido com sintoma, utilizando-se para isso imagens digitais do primeiro trifólio de cada uma das duas plantas de cada vaso e o software QUANT (VALE; FERNANDES FILHO; LIBERATO, 2001).

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso (DBC) em esquema fatorial (16 x 2) sendo 15 isolados de *Trichoderma* sp. e uma testemunha em dois tipos de substrato (solo autoclavado conforme descrito no item 3.2 e solo não autoclavado) dispostos em quatro blocos, totalizando 128 parcelas experimentais (vasos).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5%, utilizando o software SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

3.2.2 Indução a Resistência de Feijoeiro Tratado com *Trichoderma* spp. Para Proteção Contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Para a avaliação da indução de resistência, o delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso (DBC) em esquema fatorial (17 x 2) com quatro repetições. Os tratamentos consistiram da combinação de 15 indutores (*Trichoderma* spp.) e dois controles, sendo um controle negativo (planta não inoculada com patógeno e semente sem inoculação de *Trichoderma* sp.) e o outro controle positivo (planta inoculada com patógeno e semente sem inoculação de *Trichoderma* sp.), sob dois tipos de substrato (solo autoclavado conforme descrito no item 3.2 e solo não autoclavado), totalizando 136 parcelas experimentais (vasos).

Em cada um dos vasos de quatro litros utilizados no experimento foram semeadas seis sementes de feijão, conforme descrito no item 3.2, e após dez dias foi realizado o desbaste deixando-se apenas três plantas por vaso.

Aos 20 dias após a emergência das plântulas de feijoeiro, foram realizadas três coletas de tecido foliar para análises bioquímicas, conforme roteiro abaixo:

- 1ª coleta: sem inoculação do patógeno;
- 2ª coleta: 72 horas após a inoculação do patógeno;
- 3ª coleta: 144 horas após a inoculação do patógeno.

A inoculação artificial do patógeno foi realizada através da pulverização da suspensão bacteriana com concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ com base em curva de absorbância a 580 nm, aplicada por meio de borrifador manual, até o ponto de escorrimento nas folhas das plantas de

feijão. Após a inoculação, as plantas de feijoeiro foram mantidas em câmara úmida por 36 h (MAFIA; ALFENAS; GONÇALVES, 2007).

As amostras de tecido foliar, coletadas para a avaliação dos parâmetros bioquímicos, foram pesadas e acondicionadas em envelopes de alumínio, congeladas e mantidas em freezer a -20 °C até o momento da extração para determinação da atividade das enzimas peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), fenilalanina amônia-liase (FAL) e β -1,3-glucanases (β -GASE).

3.2.2.1 Obtenção dos Extratos Proteicos

Para obtenção dos extratos proteicos, amostras de folhas previamente armazenadas a -20 °C (0,5 g) foram trituradas mecanicamente em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 0,04 g de polivinil pirrolidona. A mistura foi centrifugada a 20.000g por 25 min a 4 °C, e o sobrenadante foi considerado como extrato enzimático, o qual foi congelado a -20 °C, para posterior determinação da atividades das enzimas (LUSSO; PASCHOLATI, 1999).

3.2.2.2 Determinação de Proteínas Totais

Para a determinação do teor de proteínas totais foi utilizado 785 μ L de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), 15 μ L do extrato proteico e 200 μ L de reagente de Bradford (250 mg de corante Coomassie Brilliant Blue 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 $mg\ mL^{-1}$ g massa fresca⁻¹ (BRADFORD, 1976).

3.2.2.3 Atividade de Peroxidase

Para determinação da atividade de peroxidase foi utilizado o método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm, por um período de 2 min, com medida de densidade ótica a cada 15 segundos. Para isso foi

utilizado 300 μL do extrato proteico misturada a 700 μL do substrato, composto por 306 mL de peróxido de hidrogênio, 12,5 mL de guaiacol (2%) e 87,5 mL do tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0). Os resultados foram expressos pela atividade na variação entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear (U.E. unidade de enzima) $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ (HAMMERSCHMIDT; NUCLES; KUC, 1982).

3.2.2.4 Atividade de Polifenoloxidasas

A atividade de polifenoloxidase foi mensurada pela oxidação do catecol convertido em quinona. O substrato foi composto por catecol na concentração 0,002 M, dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,8). A reação foi então realizada misturando-se 50 μL do extrato proteico e 950 μL de substrato. Em espectrofotômetro, as leituras foram realizadas a 420 nm, sendo determinadas por um período de 1 min, com densidade ótica registrada a cada 15 seg. A determinação da atividade ocorreu pela variação entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear (U.E. unidade de enzima) $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$, conforme metodologia de Duangmal e Apenten (1999), adaptada por Kuhn e Pascholati (2010).

3.2.2.5 Atividade de Fenilalanina Amônia-liase

Determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina. Para isso, 50 μL do extrato proteico foram misturados a 450 μL de tampão Tris-Hcl 0,025 M (pH 8,8) e 500 μL de uma solução de L-fenilalanina 0,05 M. A mistura foi incubada a 40 °C por 2 horas. Após esse período, adicionou-se 60 μL de Hcl 5 M de modo a parar a reação. A leitura então foi realizada em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela 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 (pH 8,8)), 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 $\text{mg ácido } trans\text{-cinâmico h}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ (UMESHA, 2006).

3.2.2.6 Atividade de β -1,3-glucanases

Determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados a partir da laminarina, a reação envolveu 50 μ L do extrato proteico, 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 150 μ L de laminarina (2 mg mL⁻¹), desenvolvida durante 1 hora a 40 °C. Para o controle, a laminarina foi adicionada após a incubação (VOGELSANG; BARZ, 1993). Os açúcares formados foram quantificados através da extração de uma alíquota de 30 μ L da solução anterior acrescentada a 1,5 mL da solução de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico 0,5% (PAHBAH) (LEVER, 1972). A mistura foi mantida por 10 min a 100 °C, posteriormente resfriada em gelo por 10 min e a absorbância foi determinada a 410 nm. A determinação da atividade de β -1,3-glucanases foi realizada pela 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.

3.2.2.7 Análise dos Resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANAVA). As médias dos isolados agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% e as médias do fator solo e fator coletas testadas pelo teste de Tukey a 5% utilizando o software SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITO DE *Trichoderma* spp. NO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

4.1.1 Pareamento de Culturas – Confronto Direto

Os efeitos dos tratamentos no teste de pareamento de culturas foram estatisticamente diferentes pelo teste de Scott-Knott. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram rápido crescimento micelial e 87% foram capazes de ocupar mais de $\frac{2}{3}$ da placa (Tabela 3).

Tabela 3 – Notas atribuídas pela técnica de confrontação direta para *Trichoderma* spp., quanto à inibição de crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e diâmetro de crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp.: TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*).

Isolados	Classificação do antagonismo	Diâmetro de crescimento (mm)
TI2	1,0	80,0 a
TI4	2,2	67,0 b
TM1	5,0	48,4 c
TM2	3,0	65,1 b
TM4	1,2	76,2 a
TLB2	3,0	66,5 b
TLB3	2,0	68,6 b
TLB4	1,8	70,6 b
TLB6	1,2	74,6 a
TLB9	4,5	51,8 c
TLB12	1,8	74,8 a
TLB15	3,5	66,2 b
TLB17	2,0	69,4 b
TOD2B	3,0	63,8 b
TOD3	3,0	62,8 b
CV (%)	23,20	7,53

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Avaliados pela escala de notas propostas por Bell, Wells e Markhan (1982) e adaptada por Rodrigues (2010), os isolados TI2, TM4, TLB4, TLB6 e TLB12 apresentaram classificação de antagonismo entre 1 e 1,8 e os isolados TI4, TLB3 e TLB17 classificação entre 2 e 2,2 no confronto direto com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. O isolado TM1 apresentou a maior média de notas, 5, e o menor crescimento micelial, 48,4 mm, não inibindo o

crescimento da *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. O isolado TM1 não diferiu estatisticamente do isolado TLB9, que também apresentou um crescimento limitado de 51,8 mm (Tabela 3).

Utilizando a técnica de pareamento de culturas com isolados de *Trichoderma* sp. pode-se considerar isolados muito eficientes aqueles que apresentarem notas entre 1,0 e 1,5, e eficientes aqueles que apresentarem notas entre 2,0 e 2,5 (ETHUR, 2006). Segundo Dennis e Webster (1971) o pareamento de culturas é importante para verificar o possível efeito direto do *Trichoderma* sp. no patógeno. É importante ressaltar que como o patógeno utilizado no experimento é uma bactéria, a ação do *Trichoderma* sp. sobre o patógeno possivelmente não é a do parasitismo, mas a competição por espaço ou a produção de metabólitos pelo antagonista que limitam o crescimento da bactéria, ou ainda, a produção de metabólitos pelo patógeno que limitam o desenvolvimento do antagonista. Para Romeiro (2007) o pareamento de culturas baseia-se no princípio de que alguma substância microbiana produzida pelos microrganismos difunde-se no meio.

Os isolados TI4, TM2, TLB2, TLB3, TLB4, TLB15, TLB17, TOD2B e TOD3 não apresentaram diferença significativa em relação ao diâmetro de crescimento, valores esses que foram entre 62,8 mm e 69,4 mm, porém ao analisar a média de notas, os isolados TI4, TLB3, TLB4 e TLB17 merecem destaque por apresentarem médias de notas entre 1,8 e 2,2 (Tabela 3).

Apenas os isolados TI2, TM4 e TLB6 foram capazes de crescer sobre o patógeno, e conforme metodologia proposta por Ethur (2006) podem ser considerados os isolados de maior eficiência na supressão do crescimento *in vitro* de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Diferença estatística entre os tratamentos também foi encontrada por Fontenelle et al. (2011), que avaliando o efeito de 28 isolados de *Trichoderma* sp. no crescimento de *Xanthomonas vesicatoria*, observaram que todos os isolados avaliados foram capazes de crescer sobre mais de $\frac{3}{4}$ da placa e 26 cresceram sobre o patógeno, resultando em uma média de notas entre 1 e 2. De acordo com os autores, testes *in vitro* são utilizados como método complementar aos ensaios *in vivo* e com a finalidade de elucidar possíveis mecanismos de ação dos antagonistas.

Jagtap, Jangam e Dey (2012), testando cinco diferentes espécies de *Trichoderma*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride* e *T. lignorum*, verificaram diferença significativa no crescimento de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* *in vitro*. Medindo o diâmetro da colônia da bactéria 6 dias após o pareamento das culturas, apenas *T. hamatum* e *T. harzianum* foram capazes de reduzir o crescimento do patógeno em mais de 40%. De acordo com os autores as possíveis razões para o efeito antagônico do *Trichoderma* sobre *X.*

axonopodis pv. *malvacearum* *in vitro*, podem estar associadas ao rápido crescimento do antagonista e a sua maior capacidade competitiva; e/ou por produzir metabólitos capazes de promover zonas de inibição para limitar o crescimento do patógeno.

Tallapragada e Gudimi (2011) testando *in vitro* a eficiência de 10 isolados de *Trichoderma harzianum* na supressão de *Xanthomonas* sp., observaram que após três dias do início do ensaio, todos os isolados foram capazes de crescer por toda a placa cobrindo a colônia do patógeno.

Dixit, Singh e Singh (2015), realizando o teste de pareamento de culturas entre diferentes espécies de *Trichoderma* e *Sclerotinia sclerotiorum*, relataram que os isolados de *Trichoderma* foram capazes de inibir de 71,8% a 91,11% o crescimento do patógeno. E em experimento realizado por Mayo et al. (2015) os isolados de *Trichoderma* foram capazes de inibir de 14,6% a 72,77% o crescimento de *Rhizoctonia solani*.

Hoffmann et al. (2015) avaliando o potencial antagonico de 15 isolados na redução do crescimento *in vitro* de *Fusarium* sp., relataram que 12 isolados foram capazes de crescer sobre o patógeno no teste de pareamento de culturas obtendo médias de notas entre 1 e 1,5, e apenas três isolados obtiveram notas maiores que 3.

Segundo Bedendo, Massola Junior e Amorim (2011) fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de competir com outros microrganismos por nichos ecológicos. Essa capacidade de crescer de maneira mais rápida que o patógeno, é um dos requisitos para qualquer agente de controle biológico eficiente.

Segundo Romeiro (2013a) a competição por nichos ecológicos pode ter importantes implicações no controle biológico de doenças de plantas, porém deve-se considerar que para competir por espaço físico, um microrganismo precisa acionar vários outros mecanismos de ataque e defesa.

4.1.2 Efeito dos Compostos Voláteis e Não Voláteis de *Trichoderma* spp. no Crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Foi possível verificar a redução no número de colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* a partir da produção de metabólitos voláteis e não voláteis dos diferentes isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 4). A produção de compostos voláteis pelas diferentes espécies de *Trichoderma* spp. é considerado um fator importante no controle de fitopatógenos (BROTMAN; KAPUGANTI; VITERBO, 2010).

Os isolados TI4, TM1, TM4, TLB4, TLB6, TLB9, TLB15 e TOD2B foram capazes de reduzir o número de colônias do patógeno para ambos os testes realizados, metabólitos voláteis e não voláteis, quando comparados às testemunhas. O isolado TI2 reduziu o número de colônias do patógeno apenas no teste de compostos não voláteis enquanto os isolados TLB2, TLB3 e TLB12 reduziram apenas no teste de compostos voláteis (Tabela 4).

Os isolados TM2, TLB17 e TOD3 não foram capazes de reduzir o número de colônias do patógeno em nenhum dos testes realizados (Tabela 4).

Segundo Romeiro (2007) existe uma dificuldade de se detectar mudanças na morfologia e no tamanho de colônias de bactérias, por isso a observação neste tipo de teste deve ser baseada na redução do número de colônias, porém muitas vezes os compostos produzidos não reduzem a quantidade de colônias significativamente, mas podem retardar por vários dias o surgimento das colônias do patógeno bacteriano.

Tabela 4 – Número de colônias de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em placas de Petri, submetidas ao teste de compostos voláteis e não voláteis com isolados de *Trichoderma* spp.. TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*).

Isolados	Número de colônias de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	
	Compostos não voláteis	Compostos voláteis
TI2	77 a	29 b
TI4	70 a	22 a
TM1	80 a	22 a
TM2	91 b	30 b
TM4	70 a	23 a
TLB2	82 b	21 a
TLB3	88 b	20 a
TLB4	74 a	26 a
TLB6	77 a	22 a
TLB9	79 a	25 a
TLB12	85 b	20 a
TLB15	75 a	18 a
TLB17	82 b	35 b
TOD2B	76 a	24 a
TOD3	85 b	33 b
Testemunha	88 b	32 b
CV (%)	7,87	22,71

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A capacidade do *Trichoderma* sp. em inibir o desenvolvimento de outros patógenos pode ser explicada pela produção de substâncias com atividade antibiótica, tais como gliotoxina, viridina, trichodermina, suzucacilina, alameticina e dermadina e enzimas

hidrolíticas extracelulares que apresentam atividade antagonista (DENNIS; WEBSTER, 1971; MELLO, 1996; THRANE; JENSEN; TRONSMO, 2000).

Gangwar e Sinha (2010), testando *in vitro* a produção de compostos voláteis e não voláteis de 52 isolados de *Trichoderma* spp. contra *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, observaram redução no crescimento radial das colônias da bactéria. De acordo com os autores, para ambos os testes, compostos voláteis e não voláteis, os isolados de *T. harzianum* foram os que mais se destacaram, chegando a inibir em até 55,5% o crescimento radial da colônia de *X. oryzae* pv. *oryzae* quando comparado a testemunha.

Para Simon et al. (1988), a característica volátil de determinados antibióticos, como as pironas, conferem uma vantagem considerável, pois graças a essa condição, podem atingir microrganismos fisicamente distantes dos sítios de produção. Segundo Acosta (2014), estudos dos compostos voláteis produzidos pelo *Trichoderma*, são de especial importância, principalmente pela rápida ação biocida.

As espécies do fungo *Trichoderma* são reconhecidamente produtoras de metabólitos, voláteis e não voláteis, que apresentam espectro de ação antimicrobiana. A produção dos metabólitos é atribuída a vários genes e são liberados nas fases de crescimento e esporulação do *Trichoderma* e têm sido utilizados na inibição do crescimento de microrganismos (ISAIAS et al., 2014). Dentre os metabólitos produzidos pode-se citar: pironas, viridinas, azafilonas, hidroxy-lactonas, isocianatos, entre outras (AMIN et al., 2010; VINALE et al., 2014).

Relatos envolvendo a ação de compostos orgânicos produzidos pelo *Trichoderma* contra bactérias fitopatogênicas são escassos. A expressiva maioria dos trabalhos encontrados na literatura limitam-se a mostrar a eficiência dos compostos voláteis e não voláteis produzidos pelo *Trichoderma* no controle *in vitro* de diferentes fungos fitopatogênicos, como por exemplo; *Rhizopus stolonifer* (BOMFIM et al., 2010); *Cylindrocadium scoparium* (CARVALHO FILHO et al., 2008); *Sclerotinia sclerotiorum* (AMIN et al., 2010; DILDEY et al., 2014; LOBO JUNIOR; ABREU, 2000; ZANCAN et al., 2012); *Macrophomina phaseolina* (BROETTO et al., 2014); *Fusarium oxysporum* (AMIN et al., 2010); *Fusarium* sp. (HOFFMANN et al., 2015) *Rhizoctonia solani* (AMIN et al., 2010; PINTO et al., 2014); *Sclerotium rolfsii* (AMIN et al., 2010; ISAIAS et al., 2014; MONTALVÃO, 2012); *Colletotrichum capsici* (AMIN et al., 2010); *Helminthosporium oryzae* (AMIN et al., 2010); *Alternaria brassicicola* (AMIN et al., 2010); *Verticillium dahliae* (ISAIAS et al., 2014); entre outros.

4.2 ENSAIOS *IN VIVO*

4.2.1 Avaliação da Severidade do Crestamento Bacteriano Comum em Feijoeiro Tratado com Diferentes Espécies de *Trichoderma*

Não houve interação entre os fatores: isolados de *Trichoderma* spp. e diferentes substratos (solo autoclavado e solo não autoclavado), ocorrendo apenas diferença significativa entre os 15 isolados de *Trichoderma* spp..

Tabela 5 – Severidade de crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de *Trichoderma* spp.. TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*).

Isolados	Severidade (%)	Redução da severidade (%)
TI2	24,30 b	41,32
TI4	24,97 b	39,70
TM1	40,96 d	1,09
TM2	42,97 d	-
TM4	16,14 a	61,02
TLB2	8,04 a	80,58
TLB3	25,41 b	38,64
TLB4	23,52 b	43,20
TLB6	17,41 a	57,96
TLB9	19,08 a	53,92
TLB12	17,47 a	57,81
TLB15	12,48 a	69,86
TLB17	19,67 a	52,50
TOD2B	31,15 c	24,78
TOD3	17,66 a	57,35
Testemunha	41,41 d	-
CV (%)	37,31	

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Este resultado corrobora com o encontrado por Ethur et al. (2005), que não observaram diferença significativa na utilização de substrato autoclavado e não autoclavado no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro, em ensaio com oito isolados de *T. virens*. Porém, Menezes et al. (2004) observaram melhor eficiência na utilização de espécies de *Trichoderma* para manejo de *Macrophomina phaseolina* quando o substrato utilizado foi autoclavado. Segundo Agrios (2005), embora o *Trichoderma* mostre-se eficiente no manejo de inúmero fitopatógenos em condições controladas, como as encontradas em casas de

vegetação, muitas vezes essa eficiência não ocorre em condições normais de campo, pois o *Trichoderma* pode encontrar dificuldade para competir com a microflora existente.

Dos 15 isolados de *Trichoderma* spp. utilizados no experimento, apenas dois, TM1 e TM2 (*T. virens*), não promoveram significativa redução na severidade da doença. Os demais isolados foram agrupados em três grupos e foram capazes de reduzir de 24,78% a 80,58% a severidade do cretamento bacteriano comum quando comparados a testemunha (Tabela 5).

Os isolados TM4, TLB2, TLB6, TLB9, TLB12, TLB15, TLB17 e TOD3 foram os mais eficientes na redução da severidade do cretamento bacteriano comum quando comparados a testemunha, sendo o isolado TLB2 (*T. harzianum*) o que apresentou a maior redução, 80,58% (Tabela 5).

O segundo grupo composto pelos isolados TI2, TI4, TLB3 e TLB4 apresentaram redução da severidade do cretamento bacteriano comum de 38,64% a 43,20% quando comparados a testemunha (Tabela 5).

Os resultados encontrados corroboram com Alfano et al. (2007), que testando *T. hamatum* no manejo de *Xanthomonas euvesicatoria* do tomateiro, obtiveram redução da severidade da mancha bacteriana em até 76%.

Segundo Matei et al. (2011), fungos do gênero *Trichoderma* crescem na superfície da raiz das plantas e podem ser eficazes contra doenças foliares. Entre os mecanismos que podem estar associados a essa relação benéfica para as plantas pode-se citar a indução de resistência da planta hospedeira, através da indução na expressão de diferentes enzimas. Para Brotman, Kapuganti e Viterbo (2010), os isolados de *Trichoderma*, ao colonizarem a epiderme e as células do córtex de raízes, ativam vias de sinalização que desencadeiam respostas de defesa nas plantas.

Fontenelle et al. (2011), testando 12 isolados de *Trichoderma* sp., relataram que todos os isolados foram capazes de conferir proteção ao tomateiro contra *X. euvesicatoria* e *Alternaria solani*. De acordo com os autores, os isolados foram capazes de reduzir até 98,40% da severidade da mancha bacteriana e 96,78% da pinta preta.

Gangwar (2013), em trabalho desenvolvido para controle de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* na cultura do arroz, obteve resultados expressivos utilizando *T. harzianum*, que foi capaz de reduzir em até 71% a severidade da estria bacteriana do arroz quando comparado a testemunha e 63% quando comparado ao controle químico, aos 27 dias após a inoculação do patógeno. De acordo com o autor, o controle químico reduziu a severidade até os 16 primeiros dias. Após esse período inicial o destaque foi para o agente biológico *T. harzianum*, que demonstrou capacidade de reduzir a velocidade de progresso da doença. Em relação a

produção, o tratamento *T. harzianum* foi capaz de produzir 68% mais do que a testemunha e 24% mais do que controle químico.

Segundo Gangwar e Sinha (2014), *Trichoderma* sp. podem atrasar o desenvolvimento dos patógenos pela rápida acumulação de fenóis totais no local da infecção, ação esta que pode ser considerado a primeira fase dos mecanismos de defesa da planta. Em trabalho realizado pelos autores, o conteúdo de compostos fenólicos totais em folhas de arroz inoculadas com *X. oryzae* pv. *oryzae* foi maior em plantas tratadas com *Trichoderma* sp. o que conferiu redução na severidade da doença e resultou em aumento da produção de grãos e massa de 1.000 grãos.

Os fenilpropanóides encontrados naturalmente em todas as plantas possuem função principal de proteção contra ataques de microrganismos não patogênicos ou patogênicos considerados fracos. Outros compostos fenólicos podem ser formados em resposta à tentativa do patógeno em ingressar na planta (CLIVE 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).

4.2.2 Indução a Resistência de Feijoeiro Tratado com *Trichoderma* spp. Para Proteção Contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

4.2.2.1 Proteínas Solúveis Totais

Antes da inoculação do patógeno (1ª avaliação), os isolados TI4, TLB2, TLB3, TLB12 e TOD3 (*T. harzianum*), TM1, TM2, TM4 e TLB15 (*T. virens*), TLB6 (*T. asperellum*) e TOD2B (*T. longibrachiatum*), proporcionaram um aumento significativo no teor de proteínas solúveis totais quando no solo não autoclavado. Já no solo autoclavado não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 6).

Tabela 6 – Teor de proteínas solúveis totais (mg mL^{-1} g massa fresca⁻¹) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de *Trichoderma* spp.. TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*), em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).

Teor de proteínas solúveis totais (mg mL^{-1} g massa fresca ⁻¹)						
Isolados	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	NA	A	NA	A	NA	A
TI2	0,4463 Ab ^a	0,4691 Aa _α	0,5816 Aa ^a	0,4884 Aa _α	0,4871 Aa ^a	0,5281 Aa _α
TI4	0,5611 Aa ^a	0,7414 Aa _α	0,5712 Aa ^a	0,4968 Aa _β	0,3557 Aa ^a	0,3874 Aa _β
TM1	0,6621 Aa ^a	0,5628 Aa _α	0,6736 Aa ^a	0,5459 Aa _α	0,5749 Aa ^a	0,5181 Aa _α
TM2	0,4819 Aa ^a	0,6287 Aa _α	0,6156 Aa ^a	0,5699 Aa _α	0,4000 Aa ^a	0,4697 Aa _α
TM4	0,5804 Aa ^a	0,6559 Aa _α	0,5639 Aa ^a	0,5320 Aa _α	0,4266 Aa ^a	0,5195 Aa _α
TLB2	0,5309 Ba ^a	0,7519 Aa _α	0,5824 Aa ^a	0,5746 Aa _α	0,5212 Aa ^a	0,5829 Aa _α
TLB3	0,5681 Ba ^a	0,7761 Aa _α	0,5950 Aa ^a	0,6707 Aa _α	0,4187 Aa ^a	0,5907 Aa _α
TLB4	0,3897 Bb ^a	0,6393 Aa _α	0,6189 Aa ^a	0,5506 Aa _α	0,4181 Aa ^a	0,5037 Aa _α
TLB6	0,5509 Aa ^a	0,6057 Aa _α	0,5564 Aa ^a	0,5053 Aa _α	0,4953 Aa ^a	0,4240 Aa _α
TLB9	0,4007 Ab ^a	0,5369 Aa _α	0,5497 Aa ^a	0,7242 Aa _α	0,5209 Aa ^a	0,6028 Aa _α
TLB12	0,5250 Aa ^a	0,5617 Aa _α	0,6282 Aa ^a	0,3838 Bb _α	0,4301 Aa ^a	0,5112 Aa _α
TLB15	0,6236 Aa ^a	0,5624 Aa _α	0,6882 Aa ^a	0,5832 Aa _α	0,5552 Aa ^a	0,4249 Aa _α
TLB17	0,3758 Bb ^a	0,6134 Aa _α	0,5609 Aa ^a	0,6146 Aa _α	0,3541 Aa ^a	0,5525 Aa _α
TOD2B	0,4820 Aa ^a	0,4349 Aa _α	0,5760 Aa ^a	0,5676 Aa _α	0,4756 Aa ^a	0,4787 Aa _α
TOD3	0,4678 Aa ^a	0,5806 Aa _α	0,4417 Aa ^a	0,6177 Aa _α	0,4212 Aa ^a	0,5174 Aa _α
Controle P.	0,3961 Ab ^a	0,4482 Aa _α	0,4233 Aa ^a	0,4384 Aa _α	0,3447 Aa ^a	0,3809 Aa _α
Controle N.	0,3879 Ab ^a	0,5141 Aa _α	0,3421 Aa ^a	0,2847 Ab _α	0,4136 Aa ^a	0,4024 Aa _α
(CV%)	14,95					

¹1ª coleta, sem inoculação do patógeno;

²2ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno;

³3ª coleta, 144 horas após a inoculação do patógeno;

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

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

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha para cada avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra grega para cada tipo de solo (não autoclavado (NA): sobrescrito, autoclavado (A): subscrito), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x}$.

Na 2ª avaliação (72 horas após a inoculação do patógeno), a diferença significativa no teor de proteínas solúveis totais ocorreu no solo autoclavado. Nesta avaliação, apenas o isolado TLB12 (*T. harzianum*), não diferiu do controle negativo, que apresentou o menor teor de proteínas solúveis totais. Os demais isolados promoveram um aumento entre 65,2%,

proporcionado pelo isolado TLB9 e 11,4%, proporcionado pelo isolado TI2, quando comparados ao controle positivo. O resultado apresentado pelo controle negativo era esperado, tendo em vista que estas plantas estão se desenvolvendo na ausência do patógeno e ausência de um indutor (*Trichoderma* sp). Apesar de não ter ocorrido diferença significativa entre os tratamentos no solo não autoclavado nesta avaliação, o teor de proteínas solúveis totais do controle negativo, também foi o menor entre os tratamentos (Tabela 6).

Na 3ª avaliação (144 horas após a inoculação do patógeno), não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos tanto para o solo autoclavado quanto para o solo não autoclavado (Tabela 6).

Quando comparados os isolados dentro do fator solo (autoclavado e não autoclavado), o teor de proteínas solúveis totais apresentou diferença significativa na 1ª e na 2ª avaliação. Na 1ª avaliação os isolados TLB2, TLB3, TLB4 (*T. harzianum*) e TLB17 (*T. koningiopsis*) proporcionaram maior teor de proteínas solúveis totais quando no solo autoclavado. Na 2ª avaliação o isolado TLB12 (*T. harzianum*) apresentou maior teor de proteínas totais quando no solo não autoclavado. Para os demais isolados não ocorreu diferença significativa entre solo autoclavado e não autoclavado (Tabela 6).

Em relação às coletas o único isolado que apresentou diferença significativa entre cada uma das avaliações foi o TI4 (*T. harzianum*) quando no solo autoclavado (Tabela 6). Para os demais isolados o teor de proteínas solúveis totais não apresentou diferença significativa para as coletas realizadas ao longo do experimento.

Segundo Viecelli (2008), estudos que demonstram o teor de proteínas solúveis totais em plantas tratadas são importantes. Para Barros et al. (2010) a síntese de proteínas relacionadas a patogênese (RP) talvez seja a mais evidente alteração decorrente da interação planta-patógeno. Segundo Pascholati (2011) dentre as proteínas solúveis, que são conhecidas como proteínas-RP, destacam-se as peroxidases, β -1,3-glucanases e quitinases.

4.2.2.2 Atividade de Peroxidase

Na 1ª avaliação (antes da inoculação do patógeno) não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 7).

Resultado diferente foi observado por Zhang et al. (2016) em plantas de soja tratadas com *T. harzianum* no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*. De acordo com os autores a atividade de peroxidase (POX) foi induzida pelo *Trichoderma* sp. mesmo antes da presença do patógeno e até 5 dias após a inoculação de *S. sclerotiorum*.

Tabela 7 – Atividade de peroxidase (unidade de enzima $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de *Trichoderma* spp.. TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*), em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).

Atividade de Peroxidase (unidade de enzima $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$)						
Isolados	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	NA	A	NA	A	NA	A
TI2	557,9 Aa ^α	671,7 Aa _α	992,0 Ab ^α	1895,1 Aa _α	1165,1 Ab ^α	1015,4 Aa _α
TI4	393,2 Aa ^β	576,4 Aa _γ	1002,7 Ab ^{αβ}	1028,5 Aa _β	2695,9 Aa ^α	3111,5 Aa _α
TM1	801,3 Aa ^β	631,8 Aa _α	889,2 Ab ^β	1655,1 Aa _α	3589,2 Aa ^α	1560,3 Aa _α
TM2	510,8 Aa ^{αβ}	569,6 Aa _α	291,9 Ab ^β	600,4 Aa _α	1709,0 Ab ^α	1562,2 Aa _α
TM4	760,9 Aa ^α	625,6 Aa _α	610,1 Ab ^α	1013,4 Aa _α	1527,6 Ab ^α	1706,2 Aa _α
TLB2	1449,8 Aa ^α	1191,4 Aa _α	623,1 Ab ^α	1196,9 Aa _α	711,0 Ab ^α	2002,5 Aa _α
TLB3	535,2 Aa ^β	561,1 Aa _β	4360,0 Aa ^α	2850,2 Aa _α	5458,9 Aa ^α	3362,0 Aa _α
TLB4	2049,4 Aa ^α	871,0 Aa _α	1139,1 Ab ^α	1523,4 Aa _α	1087,2 Ab ^α	1709,0 Aa _α
TLB6	1158,5 Aa ^{αβ}	351,6 Aa _α	246,8 Ab ^β	594,0 Aa _α	2178,5 Ab ^α	1155,4 Aa _α
TLB9	1222,6 Aa ^β	845,8 Aa _α	656,4 Ab ^β	1224,5 Aa _α	3624,7 Aa ^α	2600,0 Aa _α
TLB12	1919,9 Aa ^α	999,8 Aa _α	1981,1 Aa ^α	2716,4 Aa _α	2930,4 Aa ^α	2525,5 Aa _α
TLB15	1013,7 Aa ^β	1048,7 Aa _α	1538,1 Ab ^β	1551,5 Aa _α	4502,3 Aa ^α	3023,3 Aa _α
TLB17	973,7 Aa ^α	717,3 Aa _α	534,1 Ab ^α	2091,6 Aa _α	922,2 Ab ^α	2327,7 Aa _α
TOD2B	746,9 Aa ^α	431,1 Aa _β	1136,6 Ab ^α	1349,5 Aa _{αβ}	1475,3 Ab ^α	2450,1 Aa _α
TOD3	460,1 Aa ^β	1230,8 Aa _α	1109,9 Ab ^{αβ}	1418,9 Aa _α	3240,3 Aa ^α	2762,0 Aa _α
Controle P.	780,0 Aa ^β	492,6 Aa _α	794,8 Ab ^β	1246,4 Aa _α	1226,3 Ab ^α	1377,0 Aa _α
Controle N.	535,2 Aa ^α	357,2 Aa _α	807,8 Ab ^α	1006,8 Aa _α	926,2 Ab ^α	2068,1 Aa _α
(CV%)			39,58			

¹1ª coleta, sem inoculação do patógeno;

²2ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno;

³3ª coleta, 144 horas após a inoculação do patógeno;

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

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

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha para cada avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra grega para cada tipo de solo (não autoclavado (NA): sobrescrito, autoclavado (A): subscrito), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x}$.

Na 2ª avaliação (72 horas após a inoculação do patógeno) os isolados TLB3 e TLB12 (*T. harzianum*) promoveram aumento significativo da atividade de POX no solo não autoclavado. Esse aumento da atividade foi de até 448,6% proporcionado pelo isolado TLB3

quando comparado ao tratamento controle positivo no solo não autoclavado. Não houve diferença significativa entre os tratamentos no solo autoclavado (Tabela 7).

Na 3ª avaliação (144 horas após a inoculação do patógeno) não houve diferença significativa entre os tratamentos no solo autoclavado. No solo não autoclavado os isolados TI4, TLB3, TLB12 e TOD3 (*T. harzianum*), TM1, TLB9 e TLB15 (*T. virens*) proporcionaram um aumento significativo na expressão da atividade de POX quando comparados aos tratamentos controle. Esse aumento na atividade foi de até 345,1%, proporcionado pelo isolado TLB3 (*T. harzianum*) quando comparado ao tratamento controle positivo (Tabela 7).

Quando comparados os isolados individualmente dentro do fator solo (autoclavado e não autoclavado) não houve diferença significativa para nenhum dos isolados em nenhuma das avaliações (Tabela 7).

Analizando a atividade de POX ao longo do tempo, foi observado um aumento significativo na 3ª coleta para os isolados TI4, TM1, TM2, TLB3, TLB6, TLB9, TLB15, TOD3 e para o tratamento controle positivo, no solo não autoclavado e nos isolados TI4, TLB3 e TOD3 no solo autoclavado (Tabela 7). O aumento da concentração de POX no controle positivo é esperado, tendo em vista que mesmo na ausência de um indutor a planta expressa seus mecanismos de defesa, pois a atividade de POX está relacionada ao processo de infecção da planta pelo patógeno e não apenas pela utilização de um indutor.

Mesmo com ausência de diferença estatística ao longo do tempo nos tratamentos controle positivo, para o solo autoclavado e controle negativo, para as duas condições de substrato, é possível observar uma tendência no aumento da expressão da atividade de POX (Tabela 7). Segundo Yedidia, Benhamou e Chet (1999) o aumento da atividade de POX está relacionada a uma resposta de defesa da planta independente da presença de um indutor de resistência, porém a presença do *Trichoderma* na rizosfera potencializa a expressão da enzima.

O aumento da atividade de POX também foi observado por Bernal-Vicente et al. (2015) em plantas de melão (*Cucumis melo* L.). De acordo com os autores, a inoculação de *T. harzianum* T-78 nos substratos proporcionou aumento da atividade de POX em até 2,4 vezes em comparação ao tratamento controle. Além disso, estimulou o crescimento das plantas e contribuiu no manejo de *Fusarium oxysporum*.

Gajera et al. (2016) relataram que *T. viride* JAU60 foi capaz de aumentar a atividade de POX em plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) em até 3,25 vezes e reduzir a incidência da podridão do colo (*Aspergillus niger* Van Tieghem) em até 51,6% em variedades suscetíveis e 58,1% em variedades tolerantes.

A indução da expressão de POX em resposta a indução dos mecanismos de defesa de plantas a infecção indica papel definitivo na supressão do desenvolvimento da doença no tecido da planta, pois está envolvida no processo de lignificação, e este processo atua como uma barreira contra invasões de patógenos (EL-RAHMAN; MOHAMED, 2014).

Khaledi e Taheri (2016) observaram que plantas de soja tratadas com *T. harzianum* promoveram maior atividade de POX, além de reduzir a severidade de *Macrophomina phaseolina* quando comparada as plantas não tratadas. De acordo com os autores, a atividade da enzima foi significativamente superior nas plantas tratadas com o antagonista, do 2º ao 8º dia após a inoculação de *M. phaseolina*, apresentando valores crescentes do 1º até o 3º dia e decrescentes do 3º até o 8º dia.

Por outro lado, Silva et al. (2011) testando *T. harzianum* na indução de resistência a antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) na cultura do pepino (*Cucumis sativus*), observaram que o tratamento de sementes de pepino com *T. harzianum* não promoveu o aumento da atividade de POX, em avaliação realizada sete dias após a inoculação do patógeno. Porém, os autores destacam que esse resultado pode ser explicado devido ao intervalo de tempo utilizado, e que possivelmente o pico da atividade de POX é inferior a sete dias, assim como o observado por Yedidia, Benhamou e Chet (1999), que ao trabalhar com plantas de pepino inoculadas com *Trichoderma* sp. verificaram aumento da expressão de POX em intervalos inferiores a sete dias, e decréscimo na expressão após este período.

Já Singh et al. (2011) observaram aumento da atividade de POX em plantas de girassol tratadas com *T. harzianum* para controle de *Rhizoctonia solani* do 5º ao 11º dias após a inoculação do patógeno. A atividade da enzima apresentou crescimento até o 7º dia e decréscimo do 7º ao 11º dia, porém se manteve superior a testemunha (ausência do tratamento *T. harzianum*) em até 5,4 vezes e proporcionou a redução da incidência de *R. solani*.

4.2.2.3 Atividade de Polifenoloxidasas

Na 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno), a atividade de polifenoloxidase (PFO) foi influenciada significativamente pelos isolados TI2, TM4, TLB15 e TLB17 no solo não autoclavado e pelos isolados TI4, TM2, TM4, TLB3 e TLB15 no solo autoclavado. O aumento da atividade de PFO foi de até 132,5%, proporcionado pelo isolado TLB15 no solo autoclavado, quando comparado ao tratamento controle positivo (Tabela 8).

Tabela 8 – Atividade de polifenoloxidase (unidade de enzima min⁻¹ mg proteína⁻¹) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de *Trichoderma* spp.. TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*), em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).

Atividade de polifenoloxidase (unidade de enzima min ⁻¹ mg proteína ⁻¹)						
Isolados	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	NA	A	NA	A	NA	A
TI2	3025,9 Aa ^a	1435,8 Bb _α	961,9 Aa ^β	1170,2 Aa _α	1140,2 Ab ^β	879,7 Ab _α
TI4	1857,3 Ab ^a	2889,6 Aa _α	1031,2 Aa ^a	1265,2 Aa _{αβ}	1406,9 Aa ^a	1072,2 Ab _β
TM1	2396,8 Ab ^a	2376,8 Ab _α	938,0 Aa ^a	1312,4 Aa _α	1085,9 Ab ^a	830,7 Ab _α
TM2	1384,9 Bb ^a	3007,9 Aa _α	1016,5 Aa ^a	677,5 Aa _β	1307,4 Ab ^a	1212,2 Ab _{αβ}
TM4	2703,6 Aa ^a	3757,8 Aa _α	1083,8 Aa ^{αβ}	891,7 Aa _β	627,6 Ab ^β	1177,2 Ab _β
TLB2	2083,9 Ab ^a	2344,9 Ab _α	873,8 Aa ^a	846,6 Aa _α	812,7 Ab ^a	1029,8 Ab _α
TLB3	2176,2 Ab ^a	3290,6 Aa _α	1802,6 Aa ^β	796,4 Aa _β	619,8 Bb ^β	1759,9 Aa _{αβ}
TLB4	2100,7 Ab ^a	1942,4 Ab _α	1450,8 Aa ^a	1138,0 Aa _α	1052,3 Ab ^a	1072,2 Ab _α
TLB6	2028,3 Ab ^a	2118,0 Ab _α	907,2 Aa ^a	934,5 Aa _α	1856,3 Aa ^a	1331,2 Ab _α
TLB9	2156,9 Ab ^a	2023,1 Ab _α	1445,7 Aa ^a	1010,1 Aa _α	1595,4 Ab ^a	1393,8 Ab _α
TLB12	2083,7 Ab ^a	2043,5 Ab _α	1166,0 Ba ^a	4468,2 Aa _α	1937,4 Aa ^a	2571,9 Aa _α
TLB15	3533,3 Aa ^a	4198,1 Aa _α	1142,9 Aa ^β	1140,4 Aa _β	1230,8 Bb ^β	2727,3 Aa _{αβ}
TLB17	2868,9 Aa ^a	1939,5 Ab _α	1358,1 Aa ^a	1570,8 Aa _α	1779,0 Aa ^a	2147,5 Aa _α
TOD2B	1540,1 Ab ^{αβ}	1642,4 Ab _α	611,3 Aa ^β	973,2 Aa _α	3517,0 Aa ^a	1475,4 Ab _α
TOD3	1069,9 Ab ^a	2162,0 Ab _α	1335,4 Aa ^a	1000,4 Aa _α	1128,6 Ab ^a	1088,5 Ab _α
Controle P.	1216,8 Ab ^a	1805,7 Ab _α	1104,4 Aa ^a	717,0 Aa _α	983,4 Ab ^a	857,6 Ab _α
Controle N.	1451,9 Ab ^a	1206,4 Ab _α	772,8 Aa ^a	1076,3 Aa _α	657,1 Ab ^a	709,1 Ab _α
(CV%)	30,82					

¹1ª coleta, sem inoculação do patógeno;

²2ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno;

³3ª coleta, 144 horas após a inoculação do patógeno;

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

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

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha para cada avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra grega para cada tipo de solo (não autoclavado (NA): sobrescrito, autoclavado (A): subscrito), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x}$.

É importante destacar que somente os isolados TM4 e TLB15 (*T. virens*) proporcionaram uma atividade alta de PFO nas duas condições de solo testadas, o que pode caracterizar que o fenômeno é causado exclusivamente pelos isolados. Em contrapartida, os

isolados TI2 e TLB17 somente elevaram a atividade de PFO na condição de solo não autoclavado, o que pode evidenciar que o aumento da atividade de PFO por esses isolados depende da interação com outros microrganismos presentes no solo.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos na 2ª avaliação (72 horas após a inoculação do patógeno) (Tabela 8).

Na 3ª avaliação (144 horas após a inoculação do patógeno) os isolados TI4, TLB6, TLB17 e TOD3 no solo não autoclavado e os isolados TLB3, TLB12, TLB15 e TLB17 no solo autoclavado promoveram aumento significativo da atividade de PFO quando comparados às testemunhas. Esse aumento da atividade foi de até 218% no solo autoclavado, proporcionado pelo isolado TLB15 (*T. virens*) e de 257,6% no solo não autoclavado, promovido pelo isolado TOD2B (*T. longibrachiatum*) (Tabela 8).

De maneira geral, é possível observar que alguns isolados aumentaram a expressão de PFO, antes da inoculação do patógeno, diferindo das testemunhas, como é o caso dos isolados TI2, TM4, TLB15 e TLB17 na condição de solo não autoclavado e dos isolados TI4, TM2, TM4, TLB3 e TLB15 na condição de solo autoclavado, sendo que após a inoculação do patógeno a própria planta independente da presença do *Trichoderma* induz a expressão de PFO, como é possível observar na ausência de diferença significativa entre os tratamentos na 2ª avaliação. Após 144 horas da inoculação do patógeno, ou seja, na 3ª avaliação, alguns isolados retomam o aumento da expressão de PFO, como é o caso do TLB3 e TLB15 no solo autoclavado e TLB17 no solo não autoclavado. Em contrapartida, os isolados TLB12 e TLB17 no solo autoclavado e os isolados TLB6, TLB12 e TOD2B no solo não autoclavado, promovem a expressão de PFO de modo a diferir das testemunhas.

Quando comparados os tratamentos dentro do fator solo, o isolado TI2 (*T. harzianum*) na 1ª avaliação apresentou maior atividade de PFO quando no solo não autoclavado. Em contrapartida, os isolados TM2 na 1ª avaliação, TLB12 na 2ª avaliação e TLB3 e TLB15 na 3ª avaliação promoveram maior expressão da PFO quando no solo autoclavado. Para os demais tratamentos não houve diferença significativa dos isolados dentro do fator solo, autoclavado ou não autoclavado (Tabela 8).

Analisando a atividade de PFO ao longo do tempo, foi observada, após a inoculação do patógeno, uma supressão nos tratamentos TI2, TM4, TLB3 e TLB15 quando no solo não autoclavado e nos isolados TI4, TM2, TM4, TLB3 e TLB15 quando no solo autoclavado. Nos tratamentos controle não ocorreu diferença significativa entre as avaliações. Apenas o isolado TOD2B no solo não autoclavado apresentou atividade significativamente maior na 3ª coleta. Apesar dos demais isolados não terem apresentado diferença significativa entre as avaliações,

apenas o isolado TOD3 no solo não autoclavado e o isolado TLB17 no solo autoclavado não apresentaram valores superiores na 1ª avaliação (Tabela 8).

Segundo Larcher (2006) o aumento da expressão enzimática é balanceado com o metabolismo total para equilibrar os custos dentro da planta, pois se a condição de gastos para sobreviver ao ataque de determinado patógeno perdurar, a simples manutenção vegetativa, que demanda energia e metabólitos essenciais, levaria a planta a uma fase acentuada de estresse e possivelmente a morte.

O comportamento da atividade de PFO diferiu do comportamento apresentando pela atividade de POX. Enquanto a atividade de PFO foi maior na 1ª avaliação a atividade de POX foi superior na 3ª avaliação. De maneira geral, a atividade de POX aumentou ao longo do tempo após a presença do patógeno e a atividade de PFO teve a expressão da sua atividade independente da presença do patógeno, sendo apenas a presença do indutor responsável pelo aumento dessa expressão. Tanto o comportamento da atividade de POX e PFO diferem do comportamento ao longo do tempo do teor de proteínas solúveis totais, onde apenas um isolado (TI4) apresentou diferença em relação as coletas.

A sequência de reações químicas envolvendo as enzimas POX e PFO ainda são pouco conhecidas e não há um padrão de comportamento definido, pois a expressão de suas atividades dependem do tipo de indutor, sua concentração, tempo após a aplicação e patossistemas envolvidos (BARROS et al., 2010; PEITER-BENINCA et al., 2008).

Chowdappa et al. (2013) relataram que a presença de *T. harzianum* OTPB3 no substrato promoveu em mudas de tomateiro o aumento da atividade de POX em 59,93% e PFO em 67,77% em comparação com a testemunha. De acordo com os autores, o aumento da atividade dessas enzimas pode ter contribuído para a redução da severidade de *Alternaria solani* em 77,69% e *Phytophthora infestans* em 79,93%.

Li et al. (2014) observaram um rápido aumento da atividade de PFO e POX em plantas de repolho chinês (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*) na inoculação de uma solução de Trichokonins produzido por *T. pseudokoningii*. De acordo com os autores a expressão da atividade das enzimas teve um crescimento no 1º dia após a inoculação do metabólito com posterior redução no 2º dia.

Singh et al. (2013), utilizando *T. harzianum* no tratamento de sementes de plantas de girassol (*Helianthus annuus*), observaram aumento da atividade de PFO, POX e FAL nas raízes da plantas tratadas. A expressão de PFO e FAL atingiu seu valor máximo 10 dias após a semeadura e a atividade de POX aos 12 dias. O trabalho realizado pelos autores avaliou as plantas de girassol do 10º ao 20º dia após a semeadura. Para os autores, o aumento da

atividade dessas enzimas pode ter contribuído para o aumento da proteção das plantas de girassol a *Rhizoctonia solani*.

Para Yedidia et al. (2003) o aumento da atividade de PFO proporciona aumento na concentração de quinonas nos tecidos das plantas. Esses compostos possuem atividade antimicrobiana e, conseqüentemente, atuam restringindo a proliferação do patógeno. Ao realizarem cortes ultrafinos nas folhas de plantas de pepino tratados com *T. asperellum* para o controle de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, os autores observaram redução na proliferação da bactéria nas células e redução considerável na severidade da doença.

A supressão enzimática na atividade da expressão da enzima PFO ao longo do tempo, mesmo não apresentando resultado significativo para todos os tratamentos, seria um mecanismo de proteção do *Trichoderma* para não ser afetado por compostos tóxicos da oxidação de fenóis, conforme relatado por Piñol, Palazón e Cusidó (2013). De acordo com os autores o metabolismo dos polifenóis, em determinadas situações podem atuar como antioxidantes, o que pode levar a inativação de inúmeros campos de produção de enzimas fenolases.

Outra hipótese seria a desativação da via que envolve a enzima POX após o contato do patógeno pela própria planta para direcionar os esforços para outros mecanismos de defesa ou o próprio patógeno atuando no silenciamento das vias de transdução de sinais, conforme teoria levantada por Almeida et al. (2012).

4.2.2.4 Atividade de Fenilalanina Amônia-liase

Não houve diferença significativa na atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) entre os tratamentos na 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno), 2ª avaliação (72 horas após a inoculação do patógeno) e 3ª avaliação (144 horas após a inoculação do patógeno) (Tabela 9).

Diante disso, pode-se inferir que não houve aumento da atividade de FAL em função do tratamento de sementes com diferentes isolados de *Trichoderma* e em relação à ativação dos mecanismos de defesa da planta.

Quando comparados os tratamentos dentro do fator solo, apenas o isolado TLB9 (*T. virens*) na 1ª avaliação e o isolado TLB12 (*T. harzianum*) na 2ª avaliação apresentaram diferença significativa para atividade de FAL, sendo essa atividade maior no solo não autoclavado para o isolado TLB9 e maior para o solo autoclavado no isolado TLB12 (Tabela 9).

Tabela 8 – Atividade de fenilalanina amônia-liase (mg ácido *trans*-cinâmico h⁻¹ mg proteína⁻¹) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de *Trichoderma* spp.: TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*), em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).

Atividade de fenilalanina amônia-liase (mg ácido <i>trans</i> -cinâmico h ⁻¹ mg proteína ⁻¹)						
Isolados	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	NA	A	NA	A	NA	A
TI2	0,3269 Aa ^α	0,5335 Aa _α	0,3137 Aa ^α	0,4172 Aa _α	0,4153 Aa ^α	0,1437 Aa _α
TI4	0,3518 Aa ^α	0,1951 Aa _α	0,1320 Aa ^α	0,6407 Aa _α	0,7059 Aa ^α	0,3601 Aa _α
TM1	0,4590 Aa ^α	0,2732 Aa _α	0,2520 Aa ^α	0,2079 Aa _α	0,3509 Aa ^α	0,1912 Aa _α
TM2	0,6130 Aa ^α	0,3605 Aa _α	0,3102 Aa ^α	0,1567 Aa _α	0,4049 Aa ^α	0,3009 Aa _α
TM4	0,1693 Aa ^α	0,3603 Aa _α	0,3861 Aa ^α	0,2207 Aa _α	0,2142 Aa ^α	0,5056 Aa _α
TLB2	0,1945 Aa ^α	0,2103 Aa _α	0,1187 Aa ^α	0,1840 Aa _α	0,2172 Aa ^α	0,3421 Aa _α
TLB3	0,2214 Aa ^α	0,3959 Aa _α	0,2029 Aa ^α	0,2081 Aa _α	0,6069 Aa ^α	0,1662 Aa _α
TLB4	0,5505 Aa ^α	0,4452 Aa _α	0,1438 Aa ^α	0,1291 Aa _α	0,0531 Aa ^α	0,3497 Aa _α
TLB6	0,5657 Aa ^α	0,1277 Aa _α	0,2369 Aa ^α	0,1308 Aa _α	0,3426 Aa ^α	0,3325 Aa _α
TLB9	0,9895 Aa ^α	0,1780 Ba _α	0,2848 Aa ^β	0,1467 Aa _α	0,1083 Aa ^β	0,0779 Aa _α
TLB12	0,4642 Aa ^α	0,3595 Aa _α	0,1274 Ba ^α	0,3692 Aa _α	0,4726 Aa ^α	0,2132 Aa _β
TLB15	0,4482 Aa ^α	0,2102 Aa _α	0,7050 Aa ^α	0,2626 Aa _α	0,2849 Aa ^α	0,3405 Aa _α
TLB17	0,3197 Aa ^α	0,3322 Aa _α	0,0923 Aa ^α	0,1291 Aa _α	0,2183 Aa ^α	0,2168 Aa _α
TOD2B	0,4550 Aa ^α	0,2756 Aa _α	0,1311 Aa ^α	0,2658 Aa _α	0,4078 Aa ^α	0,4130 Aa _α
TOD3	0,2541 Aa ^α	0,1975 Aa _α	0,3592 Aa ^α	0,0717 Aa _α	0,3316 Aa ^α	0,1690 Aa _α
Controle P.	0,2504 Aa ^α	0,3531 Aa _α	0,0522 Aa ^α	0,1420 Aa _α	0,1431 Aa ^α	0,2767 Aa _α
Controle N.	0,3302 Aa ^α	0,1644 Aa _α	0,2137 Aa ^α	0,3036 Aa _α	0,1669 Aa ^α	0,2104 Aa _α
(CV%)	15,57					

¹1ª coleta, sem inoculação do patógeno;

²2ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno;

³3ª coleta, 144 horas após a inoculação do patógeno;

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

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

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha para cada avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra grega para cada tipo de solo (não autoclavado (NA): sobrescrito, autoclavado (A): subscrito), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x+1}$.

Em relação às avaliações apenas o isolado TLB12 no solo autoclavado e o isolado TLB9 no solo não autoclavado apresentou diferença significativa da atividade de FAL ao longo do tempo. A atividade de FAL promovida pelo isolado TLB12 no solo autoclavado foi

significativamente maior na 2ª avaliação e a promovida pelo isolado TLB9 no solo não autoclavado foi significativamente superior na 1ª avaliação (Tabela 9). De maneira geral, pode-se inferir que mesmo após a presença do patógeno a atividade de FAL foi constante e que a atividade expressa nas avaliações é indicativa de expressão constitutiva de metabólitos secundários que possuem natureza fenólica e são essenciais à estrutura celular.

Segundo Almeida et al. (2012), a enzima FAL está envolvida no primeiro passo da síntese de fenilpropanóides, atuando na conversão de fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico que resulta na formação de compostos como a lignina e alguns tipos de fitoalexinas. Para Barros et al. (2010) os fenilpropanóides são compostos que atuam na proteção das plantas contra estresses ambientais e também são compostos importantes no crescimento vegetal.

Reglinski et al. (2012) também não observaram diferença significativa na expressão da enzima FAL utilizando *T. antroviride* R33 na indução de resistência de mudas de pinheiro (*Pinus radiata*) a *Diplodia pinea*. De acordo com os autores, a inoculação de *T. antroviride* promoveu a expressão de POX e a redução da incidência da doença em até 20% quando comparado ao controle, porém a atividade de FAL não sofreu alteração.

Os resultados diferem dos encontrados por Raghavendra et al. (2013) que avaliando a eficácia de *T. harzianum* a proteção de plantas de algodão a *Xanthomonas campestris*, observaram aumento da atividade de FAL, PFO, POX e β -GASE em plantas tratadas com *T. harzianum*. De acordo com os autores, a expressão da atividade das quatro enzimas testadas foi superior em relação a testemunha (ausência do *T. harzianum*) em todas as avaliações realizadas: antes da inoculação e 12, 24, 48, 72 e 96 horas após a inoculação do patógeno. Para FAL e POX a expressão máxima ocorreu respectivamente, 24 horas e 72 horas após a inoculação do patógeno. Para PFO e β -GASE a expressão manteve-se constante durante todas as avaliações.

Yuan et al. (2016) observaram que plantas de fumo tratadas com *T. harzianum* SQR-T037 apresentaram maior atividade de FAL, PFO e POX. Para os autores, a expressão dessas enzimas pelo *T. harzianum* proporcionou redução na incidência de *Ralstonia solanacearum*.

Indicadora de indução de resistência, a enzima FAL está diretamente envolvida como um marcador bioquímico, sendo considerada essencial para a síntese de fenóis, possibilitando uma interação específica entre o hospedeiro, o microrganismo indutor e o patógeno (NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

4.2.2.5 Atividade de β -1,3-glucanases

Na 1ª avaliação (sem inoculação do patógeno) os isolados TI4, TLB4 e TLB12 (*T. harzianum*), TM1, TM4, TLB9 e TLB15 (*T. virens*), TLB6 (*T. asperellum*), TLB17 (*T. koningiopsis*) e TOD2B (*T. longibrachiatum*) mantiveram o nível de expressão de β -1,3-glucanases (β -GASE) elevado quando no solo autoclavado e os isolados TM4, TLB4, TLB12 e TLB17 no solo não autoclavado quando em comparação aos tratamentos controle. O isolado TLB6 (*T. asperellum*) proporcionou um aumento de 399,6% na atividade da enzima quando comparada ao tratamento testemunha negativa (Tabela 10).

Os resultados observados na 1ª avaliação são interessantes do ponto de vista da indução de resistência, pois segundo Pascholati (2011), o aumento de β -GASE proporcionado pelos isolados antes da chegada do patógeno garante aumento na resistência do hospedeiro.

Na 2ª avaliação (72 horas após a inoculação do patógeno) os isolados TI2, TLB2, TLB12 e TLB15 proporcionaram, quando no solo autoclavado, um aumento na atividade de β -GASE, enquanto no solo não autoclavado os isolados TI4, TLB3, TLB12, TLB15, TOD2B e TOD3 promoveram significativamente a expressão de β -GASE. Destaque para os isolados TLB12 (*T. harzianum*) e TLB15 (*T. virens*) que promoveram o aumento da atividade da enzima β -GASE tanto no solo autoclavado quanto no solo não autoclavado.

Analizando a 1ª e 2ª avaliação conjuntamente, é possível agrupar o comportamento dos isolados em três grupos distintos. O isolado TLB15 em solo autoclavado e o isolado TLB12 nas duas condições de substrato, foram capazes de manter elevada a expressão de β -GASE na 1ª e 2ª avaliação quando comparados às testemunhas. Já os isolados TM4, TLB4 e TLB17 na condição de solo não autoclavado e os isolados TI4, TM1, TM4, TLB4, TLB6, TLB9, TLB17 e TOD2B na condição de solo autoclavado apresentavam elevada expressão de β -GASE na 1ª avaliação, e após a inoculação do patógeno a condição de expressão da enzima não apresentou diferença quando comparados às testemunhas. Em contrapartida, os isolados TI4, TLB3 e TLB15 no solo não autoclavado e os isolados TI2, TLB2, TOD2B e TOD3 no solo autoclavado, que não apresentavam diferença significativa em relação aos tratamentos controle na 1ª avaliação, foram estimulados a promover a expressão de β -GASE, após a inoculação do patógeno, ou seja, na 2ª avaliação (Tabela 10). O comportamento desse último grupo pode estar relacionado ao estado de pré-condicionamento (*priming*), ou seja, ocorreu alteração metabólica no hospedeiro, porém, essa alteração só foi perceptível após a inoculação do patógeno.

O estado de pré-condicionamento (*priming*) da planta, é um componente da ativação da defesa, com capacidade para expressar genes que codificam os compostos de sinalização, porém não ocorre a expressão de mecanismos de defesa, apesar da planta estar em um estado de indução caracterizado pelo aumento da sensibilidade da planta em perceber a chegada de um patógeno. Este fenômeno pode ser interessante do ponto de vista da economia de energia pela planta, uma vez que os genes, só serão ativados após a chegada do patógeno, demandando menos energia e proporcionando rápida resposta ao ataque de patógenos (GOELLNER; CONRATH, 2008; KUHN et al., 2006).

Na 3ª avaliação (144 horas após a inoculação do patógeno), a atividade de β -GASE foi influenciada pelos isolados TLB3 (*T. harzianum*), TLB9 e TLB15 (*T. virens*) tanto no solo autoclavado quanto no solo não autoclavado. O aumento da atividade da enzima foi de até 363,4% superior quando comparado ao tratamento controle positivo, sendo o isolado TLB3 o responsável por esse aumento. O isolado TLB4 (*T. harzianum*) proporcionou aumento da atividade da enzima apenas no solo não autoclavado. Os demais isolados não diferiram dos tratamentos controle (Tabela 10).

Quando comparados os tratamentos dentro do fator solo, solo autoclavado e solo não autoclavado, a atividade da enzima foi significativamente diferente para o isolado TOD3 na 2ª avaliação e para os isolados TM2 e TOD2B na 3ª avaliação (Tabela 10).

Em relação às avaliações ao longo do tempo os isolados TM1, TLB3, TLB4 e TLB9, quando no solo não autoclavado e os isolados TM2, TLB2, TLB3, TLB9, TLB15 e TLB17, quando no solo autoclavado apresentaram maior atividade de β -GASE na 3ª avaliação. Apesar dos demais tratamentos não terem apresentando diferença significativa da atividade de β -GASE ao longo do tempo, apenas cinco isolados (TM2, TM4, TLB12 e TOD2B no solo não autoclavado e TLB6 para os dois tipos de solos) não apresentaram aumento da atividade da enzima com o passar do tempo (Tabela 10). Esse comportamento é similar ao apresentando pela enzima POX que também apresentou, para a maioria dos isolados, valores superiores na 3ª avaliação.

Tabela 9 – Atividade de β -1,3-glucanases ($\text{mg glicose mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$) em plantas de feijoeiro tratadas via semente por isolados de *Trichoderma* spp.. TI2, TI4, TLB2, TLB3, TLB4, TLB12 e TOD3 (*Trichoderma harzianum*); TM1, TM2, TM4, TLB9 e TLB15 (*Trichoderma virens*); TLB6 (*Trichoderma asperellum*); TLB17 (*Trichoderma koningiopsis*) e TOD2B (*Trichoderma longibrachiatum*), em diferentes substratos (solo autoclavado (A) e solo não autoclavado (NA)).

Atividade de β -1,3-glucanases ($\text{mg glicose mL}^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$)						
Isolados	1ª Coleta ¹		2ª Coleta ²		3ª Coleta ³	
	NA	A	NA	A	NA	A
TI2	0,0832 Ab ^a	0,1049 Ab _{α}	0,1147 Ab ^a	0,2222 Aa _{α}	0,2370 Ab ^a	0,2283 Ab _{α}
TI4	0,1705 Ab ^a	0,1501 Aa _{α}	0,2558 Aa ^a	0,1541 Ab _{α}	0,2641 Ab ^a	0,2982 Ab _{α}
TM1	0,1165 Ab ^b	0,1505 Aa _{α}	0,0319 Ab ^b	0,1076 Ab _{α}	0,2874 Ab ^a	0,2780 Ab _{α}
TM2	0,2081 Ab ^a	0,1068 Ab _{$\alpha\beta$}	0,1105 Ab ^a	0,0267 Ab _{β}	0,0643 Bb ^a	0,2547 Ab _{α}
TM4	0,2308 Aa ^a	0,1379 Aa _{α}	0,1124 Ab ^a	0,1749 Ab _{α}	0,1828 Ab ^a	0,3077 Ab _{α}
TLB2	0,0704 Ab ^a	0,0383 Ab _{β}	0,1567 Ab ^a	0,2029 Aa _{α}	0,1778 Ab ^a	0,2188 Ab _{α}
TLB3	0,1177 Ab ^b	0,0529 Ab _{β}	0,2428 Aa ^b	0,1504 Ab _{β}	0,5530 Aa ^a	0,6182 Aa _{α}
TLB4	0,2215 Aa ^b	0,1672 Aa _{α}	0,1605 Ab ^b	0,1366 Ab _{α}	0,4512 Aa ^a	0,2634 Ab _{α}
TLB6	0,1652 Ab ^a	0,2853 Aa _{α}	0,1176 Ab ^a	0,1493 Ab _{α}	0,1186 Ab ^a	0,2480 Ab _{α}
TLB9	0,1113 Ab ^b	0,2021 Aa _{$\alpha\beta$}	0,1163 Ab ^b	0,1056 Ab _{β}	0,5454 Aa ^a	0,3709 Aa _{α}
TLB12	0,2332 Aa ^a	0,1662 Aa _{α}	0,2704 Aa ^a	0,4077 Aa _{α}	0,1887 Ab ^a	0,3099 Ab _{α}
TLB15	0,1902 Ab ^a	0,1877 Aa _{β}	0,3016 Aa ^a	0,4220 Aa _{$\alpha\beta$}	0,4351 Aa ^a	0,4985 Aa _{α}
TLB17	0,2596 Aa ^a	0,1361 Aa _{$\alpha\beta$}	0,1316 Ab ^a	0,0529 Ab _{β}	0,3094 Ab ^a	0,2804 Ab _{α}
TOD2B	0,1905 Ab ^a	0,1521 Aa _{α}	0,1962 Aa ^a	0,1758 Ab _{α}	0,1326 Bb ^a	0,3283 Ab _{α}
TOD3	0,1547 Ab ^a	0,0623 Ab _{α}	0,3055 Aa ^a	0,1450 Bb _{α}	0,1752 Ab ^a	0,1735 Ab _{α}
Controle P.	0,0865 Ab ^a	0,0407 Ab _{α}	0,0858 Ab ^a	0,0765 Ab _{α}	0,1092 Ab ^a	0,1334 Ab _{α}
Controle N.	0,1222 Ab ^a	0,0571 Ab _{α}	0,1466 Ab ^a	0,1311 Ab _{α}	0,1224 Ab ^a	0,1491 Ab _{α}
(CV%)	34,97					

¹1ª coleta, sem inoculação do patógeno;

²2ª coleta, 72 horas após a inoculação do patógeno;

³3ª coleta, 144 horas após a inoculação do patógeno;

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

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

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha para cada avaliação, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Médias seguidas pela mesma letra grega para cada tipo de solo (não autoclavado (NA): sobrescrito, autoclavado (A): subscrito), não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Dados transformados por $\sqrt{x}$.

Segundo Larcher (2006) a atividade de β -GASE varia em função do tempo, pois ocorre o redirecionamento de metabólitos para processos responsáveis pela defesa. Para Temporal (2014) o aumento da atividade enzimática deve-se a formação de isoformas mais

ativas da enzima e ao predomínio de processos anabólicos. Van Loon, Rep e Pieterse (2006) destacam que o aumento da atividade de β -GASE em plantas tem aumentado a resistência das plantas a patógenos.

Pereira et al. (2014), testando a indução de resistência de *T. harzianum* a *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* na cultura do feijoeiro, também observaram aumento da atividade de β -GASE e POX antes da presença do patógeno. De acordo com os autores, a inoculação de *T. harzianum* na semeadura induziu a expressão das enzimas e essa expressão foi potencializada na presença dos patógenos, sendo maior na presença de *R. solani*.

O mesmo comportamento foi observado por Guzmán-Valle et al. (2014) na cultura da cebola (*Allium cepa* L.). A presença de *T. asperellum* TC74 no substrato das plantas promoveu um aumento da atividade de β -GASE e POX mesmo na ausência de um patógeno. De acordo com os autores a atividade das enzimas apresentou um crescimento após a inoculação de *Sclerotium rolfsii* e possibilitou a redução na gravidade dos sintomas, o que sugere que *T. asperellum* TC74 pode ser uma alternativa para o controle biológico de *S. rolfsii* em plantas de cebola.

Diferença na expressão da atividade de β -GASE por diferentes isolados de *Trichoderma* também foi observado por Saksirirat, Chareerak e Bunyatrachata (2009) em plantas de tomate. De acordo com os autores, ao testar 15 isolados de *Trichoderma* na indução de resistência a *X. vesicatoria* na cultura do tomate, apenas cinco isolados foram capazes de promover aumento na expressão de β -GASE, sendo essa expressão verificada apenas 14 dias após a inoculação do patógeno. Em relação a eficácia no controle de *X. vesicatoria* os cinco isolados foram capazes de reduzir de 69,32% a 34,41% a severidade da mancha bacteriana.

4.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DOS ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Os 15 isolados testados juntamente com o fator solo, autoclavado e não autoclavado, apresentaram resultados muito discrepantes em relação à severidade, os resultado *in vitro*, a concentração proteica e atividades das quatro enzimas relacionadas à indução de resistência avaliadas no trabalho.

Mesmo o patógeno *X. axonopodis* pv. *phaseoli* estando longe do sítio de ação direta do antagonista *Trichoderma*, os testes *in vitro* realizados, confronto direto e compostos voláteis e não voláteis, são importantes pois demonstram potencial de utilização do *Trichoderma* no manejo de bactérias fitopatogênicas presentes no solo, como *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Erwinia* e *Pseudomonas*.

O isolado TLB2 (*T. harzianum*) foi o que proporcionou maior redução da severidade da doença (80,58%), porém mostrou-se pouco eficiente nos testes *in vitro* de confronto direto e compostos voláteis. Em relação ao teor de proteínas totais e atividades enzimáticas testadas, o isolado TLB2 apresentou maior teor de proteínas na primeira avaliação, ou seja, antes da inoculação do patógeno, e na segunda avaliação para atividade de β -GASE. Para as demais enzimas testadas não houve diferença entre as plantas tratadas com o isolado e as testemunhas. Possivelmente a indução de resistência ocorreu através da ativação de outros mecanismos não avaliados, como por exemplo, lipoxigenases, fitoalexinas e espécies reativas de oxigênio. Segundo Romeiro (2007), a ação das lipoxigenases contribuem para ações de defesa, podendo inibir o crescimento de patógenos, induzir a síntese de fitoalexinas, a peroxidação de lipídios da membrana e a resposta de hipersensibilidade.

Já o isolado TLB15 (*T. virens*) que proporcionou redução da severidade de 69,86%, mostrou ação *in vitro* para ambos os compostos (voláteis e não voláteis) e induziu maior teor de proteínas totais e a expressão de POX, PFO e β -GASE. De maneira geral, o isolado TLB15 foi o isolado que mais vezes proporcionou, quando comparado a testemunha, aumento da expressão da atividade das enzimas avaliadas. Considerando que houve redução da severidade pode-se inferir que o aumento na atividade das enzimas avaliadas esteja relacionado ao controle do crescimento bacteriano comum do feijoeiro. Segundo Van Loon, Bakker e Pieterse (1998), um microrganismo pode atuar como indutor de resistência em plantas e também produzir substâncias com potencial atividade antagônica ao patógeno causador da doença.

Os isolados TLB15, TLB12, TI4 e TLB3 foram os únicos que proporcionaram aumento da expressão no teor de proteínas totais e em três das quatro enzimas testadas: POX, PFO e β -GASE. Apesar dos isolados TI4 e TLB3 proporcionarem aumento da expressão das enzimas citadas, reduziram a severidade em apenas 39,7% e 38,6% respectivamente.

Em contrapartida, o isolado TM2 (*T. virens*), além de não proporcionar a redução da severidade da doença, promoveu apenas aumento do teor de proteínas totais e na expressão de PFO na 1ª avaliação.

Várias pesquisas têm buscado esclarecer os mecanismos envolvidos pela aplicação de *Trichoderma* sp. na proteção de plantas contra fitopatógenos. Para Brotman, Kapuganti e Viterbo (2010) a colonização das células das raízes, pelo *Trichoderma*, ativam vias de sinalização que desencadeiam resposta de defesa nas plantas. A intensificação da resposta inicial de defesa ocorre através da ativação de moléculas sinalizadoras, que são a produção de espécies reativas de oxigênio, peróxidos de lipídeos, ácido benzoico, ácido salicílico, ácido

jasmônico e etileno (CAMPOS; RESENDE; SILVA, 2011). Para Djonovic et al. (2007), a indução de resistência por *Trichoderma* sp. geralmente ocorre pelas vias do ácido jasmônico e etileno, embora possa ocorrer pela via do ácido salicílico, ou ainda por ambas as vias. Segundo Pieterse et al. (2005) a comunicação cruzada entre as diferentes rotas já foi demonstrada, independentemente do agente biótico indutor.

Segundo Pinto, Ribeiro e Oliveira (2011), diversas vias de sinalização estão interligadas e interagem com a formação do ácido jasmônico, porém mesmo com o avanço nas pesquisas envolvendo a ação deste hormônio a maneira como ele é translocado no organismo vegetal e sua ação, ainda tem particularidades não esclarecidas.

Shoresh, Yedidia e Chet (2005) relataram que a utilização de *T. asperellum* ativou as vias de sinalização do ácido jasmônico e etileno em plantas de pepino, reduzindo em até 50% a severidade da doença causada por *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e aumento da expressão das enzimas quitinase, β -1,3-glucanase e peroxidase.

Para Guzzo e Harakava (2007) as respostas de defesa do hospedeiro associadas à resistência contra patógenos microbianos são reguladas por uma série de vias sinalizadoras interligadas que se afetam mutuamente. Estudos com vários modelos de interação planta-patógeno tem revelado o envolvimento de processos inicialmente não caracterizados como respostas de defesa, como a ativação de vias do metabolismo primário e a degradação controlada de proteínas.

A avaliação da indução de resistência em diferentes substratos, solo autoclavado e solo não autoclavado, é importante para verificar a variabilidade entre os isolados de *Trichoderma* quanto a sua capacidade competitiva na rizosfera. A capacidade de um isolado proporcionar aumento na expressão de enzimas relacionadas a defesa, independente da presença de outros microrganismos no substrato, indica ação particular do isolado em questão por um sítio de indução específico não desencadeado por outros microrganismos. Por outro lado, se um isolado é capaz de induzir a expressão apenas no substrato autoclavado, possivelmente esse isolado pode ter sua capacidade de indução mascarada por outros microrganismos presentes no solo que também atuam nesse sítio de indução. O grande problema de um isolado expressar seu potencial como indutor de resistência em plantas apenas em solo estéril é a ineficiência para utilização em condições de campo. Segundo Bar e Knudsen (2005), solos com elevada população microbiana apresentam menor crescimento da população de *T. harzianum*, por exemplo. Para Boer et al. (2003) este efeito pode estar relacionado a presença de bactérias do gênero *Pseudomonas*, que possuem habilidade de produzir sideróforos e antibióticos. Segundo Romeiro (2013b) sideróforos são moléculas orgânicas capazes de tornar

o meio inviável para o crescimento de outros microrganismos, pela capacidade de sequestrar íons de ferro do ambiente.

Para Akrami, Golzary e Ahmadzadeh (2011), muitos fatores podem influenciar o desempenho de agentes de indução bióticos, como é o caso dos isolados de *Trichoderma*. De acordo com os autores, fatores abióticos, como pH, temperatura e umidade do solo, moléculas, partículas e substâncias presentes nos substratos, são considerados importantes na interação entre os agentes de indução e o hospedeiro.

Muitos trabalhos envolvendo agentes de indução bióticos são conduzidos com a utilização de substratos autoclavados, para avaliar apenas o efeito do indutor na resposta do hospedeiro. Porém, considerar a interação do indutor *Trichoderma* com os demais microrganismos presentes na condição de campo, considerando assim que o solo é um sistema biológico dinâmico, possibilita verificar a real condição do indutor.

De acordo com o Dilley (2014), a interação dos isolados de *Trichoderma* na proteção de plantas de feijoeiro não está bem esclarecida. Acredita-se que o *Trichoderma* sp. induza a planta ao equilíbrio enzimático, em prol de seu benefício, de modo que, a relação simbiótica entre a planta e o *Trichoderma* sp. não seja prejudicada, pois a produção de enzimas de defesa pela planta, pode prejudicar o *Trichoderma* pela degradação de suas estruturas e possivelmente sua morte celular.

Apesar da importância do *Trichoderma* sp. na indução de resistência e das muitas pesquisas envolvendo o feijoeiro, pouco se sabe sobre o patossistema. O modo de interação entre hospedeiro e agente indutor ainda não está esclarecido, porém, conforme o avanço de pesquisas na área acontecem, aumentam a possibilidade de explicar o evento e as chances de se utilizar o *Trichoderma* sp. no manejo de doenças em diferentes culturas.

De maneira geral, *Trichoderma* sp. pode ser considerado promissor no manejo do cretamento bacteriano comum em feijoeiro, agindo através da ativação de mecanismos de defesa da planta.

5 CONCLUSÕES

1 – Os isolados TM4 (*Trichoderma virens*), TLB6 (*Trichoderma asperellum*), TLB4 e TI4 (*Trichoderma harzianum*) foram capazes de limitar o desenvolvimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* nos três testes *in vitro* realizados, confronto direto e compostos voláteis e não voláteis.

2 – Os isolados TLB15, TM4, TLB9 (*T. virens*), TLB6 (*T. asperellum*), TLB2, TLB12, TOD3 (*T. harzianum*) e TLB17 (*T. koningiopsis*) reduziram a severidade do cretamento bacteriano comum.

3 – Os isolados TLB3, TI4, TLB12 (*T. harzianum*) e TLB15 (*T. virens*) promoveram aumento na atividade das enzimas POX, PFO e β -GASE.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, J. A. M. **Análise de substâncias de *Trichoderma* spp. com atividade alelopática.** 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology.** Edition: 5, illustrated, annotated. Academic Press, 2005. 822p.
- AKRAMI, M.; GOLZARY, H.; AHMADZADEH, M. Evolution of diferente combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.10, p.2653-2658, 2011.
- ALFANO, G.; IVEY, M. L. L.; CAKIR, C.; BOS, J. I. B.; MILLER, S. A.; MADDEN, L. V.; KAMOUN, S.; HOITINK, A. J. Systemic modulation of gene expression in tomato by *Trichoderma hamatum* 382. **Biological Control**, San Diego, v.97, n.4, p.429-437, 2007.
- ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. O.; MARQUES, A. E.; PEREIRA, T. H. A.; MAGALHÃES JUNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G.; 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.
- AL-SADI, A. M.; AL-OWEISI, F. A.; EDWARDS, S. G.; AL-NADABI, H.; AL-FAHDI, A. M. Genetic analysis reveals diversity and genetic relationships among *Trichoderma* isolates from potting media, cultivated soil and uncultivated soil. **Biomed Central Microbiology**, London, v.15, n.147, p.1-11, 2015.
- 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 Phytology**, Trivandrum, v.2, n.10, p.34-37, 2010.
- ANDRADE, M. J. B.; OLIVEIRA, D. P.; FIGUEIREDO, M. A.; MARTINS, F. A. D. Exigências edafoclimáticas. In: CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão - do plantio à colheita.** Viçosa: UFV, 2015. p.68-95.
- ANDREOTE, F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Introdução à biologia do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (Org.). **Microbiologia do solo.** Piracicaba: ESALQ, 2016. p.9-22.
- ANTUNES, I. F. Feijão: sua história e seu futuro. In: BARBIERI, R. L.; STUMPF, E. R. T (Ed). **Origem e evolução de plantas cultivadas.** Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2008. p.357-376.
- ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C.; SOARES, G. J. D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-g2. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Pelotas, v.1, n.1, p.12-18, 1995.

ARAUJO, L.; STADNIK, M. J. Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.35, n.3, p.287-293, 2013.

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

ASSAD, E. D.; MARTINS, S. C.; PINTO, H. S. **Sustentabilidade no agronegócio brasileiro. Coleção de estudos sobre diretrizes para uma economia verde no Brasil**. Rio de Janeiro: Evolutiva Estúdio, 2011. p.1-52.

ATHAYDE SOBRINHO, C. A.; FERREIRA, P. T. O.; CAVALCANTI, L. S. Indutores abióticos. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. (Ed). **Indução de Resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p.51-80.

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

BAR, Y. S.; KNUDSEN, G. R. Soil microbial biomass influence on growth and biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum*. **Biological Control**, San Diego, v.32, p.236-242, 2005.

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

BARBOSA, L. Feijão com arroz e arroz com feijão: o Brasil no prato dos brasileiros. **Horizontes Antropológicos**, Porto Alegre, n.28, p.87-116, 2007.

BARRET, M.; MORRISSEY, J. P.; O'GARA, F. Functional genomic analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.47, p.729-743, 2011.

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

BEDENDO, I. P.; MASSOLA JUNIOR, N. S.; AMORIM, L. Controles cultura, físico e biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Ed). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Ceres, 2011. v.1, p.367-388.

BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, Ithaca, v.72, n.4, p.379-382, 1982.

BERNAL-VICENTE, A.; PASCUAL, J. A.; TITTARELLI, F.; HERNÁNDEZ, J. A.; DIAZ-VIVANCOS, P. *Trichoderma harzianum* T-78 supplementation of compost stimulates the antioxidant defence system in melon plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v.95, p.2208-2214, 2015.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. V.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, J. A. M.; REZENDE, A.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. Piracicaba: Ceres, 2005. v.2, p.353-376.

BLUM, L. E. Conceitos sobre resistência de plantas as doenças. In: BLUM, L. E. B.; CARES, J. E.; UESUGI, C. H. **Fitopatologia: o estudo das doenças de plantas**. Brasília: Otimismo, 2007. 2ed., p.249-260.

BOER, W.; VERHEGGEN, P.; GUNNEWIEK, P. J. A. K.; KOWALCHUK, G. A.; VEEN, J. A. V. Microbial community composition affects soil fungistasis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, p.835-844, 2003.

BOL, J. F.; LINTHORST, H. J. M.; CORNELISSEN, B. J. C. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.28, p.113-138, 1990.

BOLWELL, G. P.; BINDSCHEDLER, L. V.; BLEE, K. A.; BUTT, V. S.; DAVIES, D. R.; GARDNER, S. L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v.53, n.372, p.1367-1376, 2002.

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.

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

BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. CAB Internacional: Wallingford, UK, 1986.

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, p.248-254, 1976.

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.

BROTMAN, Y.; KAPUGANTI, J. G.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, London, v.20, n.9, p.390-391, 2010.

CAMPOS, M. A.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, M. S. Interações moleculares planta-patógeno. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS JUNIOR, F. B. (Ed). **Biotecnologia: estado da arte e aplicações agropecuárias**. Planaltina: EMBRAPA CERRADOS, 2011. p.355-378.

CAMPOS, A. D.; SILVEIRA, E. M. L. **Metodologia para determinação da peroxidase e da polifenol oxidase em plantas**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2003, 3p.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W. A.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; PINHEIRO, A. R. O.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Segurança alimentar e nutricional e saúde. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BURIGO, A. C. (Org.) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. São Paulo: Expressão Popular, 2015. p.46-89.

CARVALHO FILHO, M. R.; MENÊZES, J. E.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**, Brasília, v.1, n.225, p.1-21, 2008.

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

CHOWDAPPA, P.; KUMAR, S. P. M.; LAKSHMI, M. J.; UPRETI, K. K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, San Diego, v.65, p.109-117, 2013.

CLIVE LO, S. C.; NICHOLSON, R. L. Compostos fenólicos e a importância nas doenças em plantas. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.285-303.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Indicadores Agropecuários**, Brasília, n.2, 2016, 124p.

CONRATH, U.; PIETERSE, C. M. J.; MAUCH-MANI, B. Priming in plant-pathogen interactions. **Trends in Plant Science**, Oxford, v.7, n.5, p.210-216, 2002.

COTTA, S. R. O solo como ambiente para a vida microbiana. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (Org.). **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p.23-36.

CTSBF – Comissão técnica Sul-Brasileira de feijão. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 2.ed. Florianópolis: Epagri, 2012. 157p.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.57, p.363-369, 1971.

DILDEY, O. D. F. **Interação *Trichoderma*-feijoeiro e seus efeitos na fisiologia e indução de resistência contra antracnose**. 2014. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2014.

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.

DIXIT, R.; SINGH, R. B.; SINGH, H. B. Screening of antagonistic potential and plant growth promotion activities of *Trichoderma* spp. and fluorescent *Pseudomonas* spp. isolates against *Sclerotinia sclerotiorum* causing stem rot of French bean. **Legume research**, Nova Deli, v.38, n.3, p.375-381, 2015.

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

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

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. **Compendium of soil fungi**. CRC Press, London, 1980. 630p.

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

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

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do feijoeiro comum: Características da cultura**. Disponível em: <<https://www.spo.cnptia.embrapa.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

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

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

FACCHINI, L. A.; SOUZA, L. E. Apresentação. In: CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. (Org.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. São Paulo: Expressão Popular, 2015. p.37-40.

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

FAO – Food and agriculture organization of the united nations. **Base de dados Faostat 2012**. Disponível em: < <http://www.fao.org/faostat/en/>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

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

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.

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

FRANCISCO, N. F.; MORALES, G. G.; FUENTES, Y. M. O.; CASTILLO, F. D. H.; MENDOZA, A. B.; REYES, F. C. Aspectos fundamentales del tizón común bacteriano (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* Smith), características, patogenecidad y control. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Texcoco, v.31, n.2, p.147-160, 2013.

GAJERA, H. P.; KATAKPARA, Z. A.; PATEL, S. V.; GOLAKIYA, B. A. Antioxidant defense response induced by *Trichoderma viride* against *Aspergillus niger* Van Tieghem causing collar rot in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Microbial Pathogenesis**, Salt Lake City v.91, p.26-34, 2016.

GANGWAR, G. P.; SINHA, A. P. Effect of fungal and bacterial bioagente application on total phenolic content in rice leaves pre-inoculated with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Uyeda and Ishiyama) Dowson. **Journal of Applied and Natural Science**, Haridwar, v.6, n.1, p.254-257, 2014.

GANGWAR, G. P. Effect of bioagent application on progress of bacterial leaf blight of rice, under glasshouse conditions. **International Journal of Agriculture e Innovations ad Research**, Bhopal, v.2, n.2, p.152-155, 2013.

GANGWAR, G. P.; SINHA, A. P. Comparative antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Plant Protection Sciences**, Praga, v.18, n.2, p.458-463, 2010.

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

GUZMÁN-VALLE, P.; BRAVO-LUNA, L.; MONTES-BELMONT, R.; GUIGÓN-LÓPEZ, C.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. Induction of resistance to *Sclerotium rolfsii* in different varieties of onion by inoculation with *Trichoderma asperellum*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v.138, p.223-229, 2014.

GUZZO, S. D.; HAKAVAM, R. Mecanismos envolvidos na resistência induzida em plantas a doenças: sinalização e expressão de genes de defesa. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed). **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema, 2007. p.281-302.

HAMMERSCHMIDT, T. R. Introduction: definitions and some history. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Org.). **Induced resistance for plant disease control: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p.1–8.

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

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

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, Hague, v. 12, n.1/2, p.7–14, 2008.

HERMOSA, M. R.; GRONDONA, I.; ITURRIAGA, E. A.; DIAZ-MINGUEZ, J. M.; CASTRO, C.; MONTE, E.; GARCIA-ACHA, I. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.66, n.5, p.1890-1898, 2000.

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.

INDEX FUNGORUM. **Banco de dados de taxonomia de fungos**. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>>. Acesso em: 10 jan. 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.

JAGTAP, G. P.; JANGAM, A. M.; DEY, U. Management of bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Scientific Journal of Microbiology**, Dhaka, v.1, n.1, p.10-18, 2012.

KARSTEN, J.; CHAVES, D. V.; FINGER, F. L.; BARBOSA, J. G. Papel e caracterização da polifenoloxidase em hastes de ave-do-paraíso (*Strelitzia reginae* Ait.). **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, Jundiaí, v.19, n.2, p.161-171, 2013.

KESWANI, C.; MISHRA, S.; SARMA, B. K.; SINGH, S. P.; SINGH, H. B. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.98, p.533-544, 2014.

KHALEDI, N.; TAHERI, P. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. **Journal of plant protection research**, Poznan, v.56, n.1, p.21-31, 2016.

KUHN, O. J.; STANGARLIN, J. R. Importância dos microrganismos do solo. In: SEIDEL, E. P.; MELLO, E. C. T.; ZAMBOM, M. A (Org.). **Sustentabilidade agropecuária em sistemas agroecológicos e orgânicos de produção**. Marechal Cândido Rondon: Unioeste, 2016. p.155-159.

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. 140 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F. Custo adaptativo da resistência induzida no controle de fitopatógenos. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed). **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema, 2007. p.67-90.

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

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2006. 531p.

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

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**, Oxford, v.354, p.75-82, 2014.

LOBO JUNIOR, M.; ABREU, M. S. Inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.24, n.2, p.521-526, 2000.

LUCON, C. M. M. **Trichoderma: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura**. São Paulo: Instituto Biológico, 2014, 35p.

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, p.244-249, 1999.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Detecção, isolamento e inoculação de bactérias fitopatogênicas. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p.139-160.

MANOS, M. G. L.; OLIVEIRA, M. G. C.; MARTINS, C. R. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro 2013-2014**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013, 199p.

MATEI, S.; MATEI, G. M.; CORNEA, P.; POPA, G. Characterization of soil *Trichoderma* isolates for potential biocontrol of plant pathogens. **Soil Forming Factors and Processes from the Temperate Zone**, Iasi, v.10, p.29-37, 2011.

MATOS, E. R.; DURRER, A.; ANDREOTE, F. D. Ecologia microbiana. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (Org.). **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p.37-46.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, New York, v.60, p.551-565, 2002.

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**, León, v.6, n.685, p.1-11, 2015.

MELLO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.261-295, 1996.

MENEZES, M.; MACHADO, A. L. M.; SILVEIRA, M. C. V.; SILVA, R. L. X. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciências Agrônomicas**, Recife, v.1, p.133-140, 2004.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **American Society for Clinical Nutrition**, Rockville, v.70, p.439S-450S, 1999.

MÉTRAUX, J. P. Induced defenses in plants. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed). **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema, 2007. p.7-24.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M., MENEZES, M. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. Cap.1 In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Ed). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. p.1-18.

MONTALVÃO, S. C. L. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro**. 2012. 105 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, Barcelona, v.4, p.1-4, 2001.

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

MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.7-14.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2009. 625 p.

MOURA, A. D.; BRITO, L. M. Aspectos socioeconômicos. In: CARNEIRO, J. E.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão - do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2015. p.16-36.

NALEPA, K. C.; FERREIRA, S. M. R. Avaliação da qualidade do feijão preto. **Demetra: alimentação, nutrição e saúde**, Rio de Janeiro, v.8, n.2, p.115-124, 2013.

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

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

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

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

PEITER-BENINCA, C.; 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.

PEREIRA, J. L.; QUEIROZ, R. M. L.; CHARNEAU, S. O.; FELIZ, C. R.; RICART, C. A.; SILVA, F. L.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J.; NORONHA, E. F. Analysis of *Phaseolus vulgaris* responde to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **Journal Plos One**, Napoli, v.9, n.5, p.1-23, 2014.

PÉREZ, S. Las proteínas relacionadas con la patogéneses (pr) em plantas. **Biotecnologia Aplicada**, La Habana, v.7, n.2, p.121-131, 1990.

PIETERSE, C. M. J.; VAN PELT, J. A.; VA WEES, S. C. M.; TOM, J.; VERHAGEN, B. W. M.; LÉON-KLOOSTERZIEL, K. M.; HASE, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JUNIOR, A.; RESENDE, M. L. V.; VAN LOON, L. C. Indução de resistência sistêmica por rizobactérias e comunicação na rota de sinalização para uma defesa refinada. **Revisão Annual e Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.13, p.277-295, 2005.

PIÑOL, M. T.; PALAZÓN, J.; CUSIDÓ, R. M. Introducción al metabolismo secundario. In: AZCÓN-BIETO, J.; TALÓN, M. (Ed). **Fundamentos de Fisiología Vegetal**. 2.ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2013. p.323-348.

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.

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

RAGHAVENDRA, V. B.; SIDDALINGAIAH, L.; SUGUNACHAR, N. K.; NAYAK, C.; RAMACHANDRAPPA, N. S. Induction of systemic resistance by biocontrol agents against bacterial blight of cotton caused by *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v.2, p.59-69, 2013.

RAHMAN, M.; PUNJA, Z. K. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.43, p.1103-1114, 2005.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**, Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.217-242.

REGLINSKI, T.; RODENBURG, N.; TAYLOR, J. T.; NORTHCOTT, G. L.; CHEE, A. A.; SPIERS, T. M.; HILL, R. A. *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. **Forest Pathology**, Berlin, v.42, p.75-78, 2012.

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

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

ROMAGNOLI, E. M.; ANDREOTE, F. D. Rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. (Org.). **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, 2016. p.47-60.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de enfermidades de plantas: fundamentos**. 1reimp. Viçosa: UFV, 2013a. 269p.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2ed. 2reimp. Viçosa: UFV, 2013b. 417p.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed). **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.411-431.

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

SAHASHI, N.; TSUJI, H.; SHISHIYAMA, J. Barley plants grown under germ-free conditions have increased susceptibility to two powdery mildew fungi. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.34, p.163-170, 1989.

SAKSIRIRAT, W.; CHAREERAK, P.; BUNYATRACHATA, W. Induced systemic resistance of biocontrol fungus, *Trichoderma* spp. against bacterial and gray leaf spot in tomatoes. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, Bancoque, v.Special, p.99-104, 2009.

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

SANTOS, H. G. dos; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C. dos; OLIVEIRA, V. A. de; LUMBRERAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A. de; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. de. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3.ed. Brasília: Embrapa, 2013. 353p.

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

SEIDEL, E. P. O solo no contexto agroecológico. In: SEIDEL, E. P.; MELLO, E. C. T.; ZAMBOM, M. A (Org.). **Sustentabilidade agropecuária em sistemas agroecológicos e orgânicos de produção**. Marechal Cândido Rondon: Unioeste, 2016. p.143-148.

SHORESH, M. I.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of Jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum*. **Phytopathology**, v.95, p.76-84, 2005.

SILVA, E. K. C.; MELO, L. G. L. Manejo de doenças de plantas: um enfoque agroecológico. **Revista Educamazônia, Educação, Sociedade e Meio Ambiente**, Humaitá, v.10, n.1, p.143-157, 2013.

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

SILVA, R. A.; REIS, V. M; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008, 49p.

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**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. p.181-220.

SIMON, A.; DUNLOP, R. W.; GHISALBERTI, E. L.; SIVASITHAMPARAM, K. *Trichoderma koningii* produces a pyrone compound with antibiotic properties. **Soil Biology and Biochemistry**, v.20, n.21, p.263-264, 1988.

SINGH, B. N.; SINGH, A.; SINGH, B. R.; SINGH, H. B. *Trichoderma harzianum* elicits induced resistance in sunflower challenged by *Rhizoctonia solani*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.116, p.654-666, 2013.

SINGH, B. N.; SINGH, A.; SINGH, S. P.; SINGH, H. B. *Trichoderma harzianum* mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v.131, p.121-134, 2011.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Tropica**, Chapadinha, v.1, n.1, p.9-19, 2007.

SOUSA, M. F.; SILVA, L. V.; BRITO, M. D.; FURTADO, D. C. M. Tipos de controle alternativo de pragas e doenças nos cultivos orgânicos no estado de Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v.7, n.1, p.132-138, 2012.

STADNIK, M. J. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v.26, p.175-177, 2000.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.57, p.25-34, 2000.

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.; 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, p.265-304, 2008.

STINTZI, A.; HEITZA, T.; PRASADB, V.; WIEDEMANN-MERDINOGLU, S.; KAUFFMANN, S.; GEOFFROYA, P.; LEGRANDA, M.; FRITIGA, B. Plant “pathogenesis-related” proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, Paris, v.75, p.687-706, 1993.

TALLAPRAGADA, P.; GUDIMI, M. Phosphate solubility and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v.35, p.593-600, 2011.

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

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, Berlin, v.220, p.105-117, 2004.

THRANE, C.; JENSEN, D. F.; TRONSMO, A. Substrate colonization, strain competition, enzyme production *in vitro*, and biocontrol of *Pythium ultimum* by *Trichoderma* spp. Isolates P1 and T3. **European Journal of Plant Pathology**, London, v.106, p.215-225, 2000.

TORRES, J. P.; SILVA JUNIOR, T. A. F.; MARINGONI, A. C. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro provenientes do Estado do Paraná, Brasil. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.35, n.2, p.136-139, 2009.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied in Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.782-787, 2009.

TRAN, L. T.; TAYLOR, J. S.; CONSTABEL, C. P. The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. **Biomed Central Microbiology**, London, v.13, n.395, p.1-12, 2012.

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

VALE, F. X. R.; FERNANDES FILHO, E. I.; LIBERATO, J. R. **Quantificação de doenças - Quant**: versão 1.0.1. Viçosa: UFV, 2001. Software.

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

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.55, p.85-87, 1999.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, London, v.36, p.453-483, 1998.

VIECELLI, C. A.; MOERSCHBÄCHER, T. Controle do cretamento bacteriano comum na cultura do feijoeiro pelo uso de fertilizantes foliares. **Scientia Agraria Paranaensis**, Marechal Cândido Rondon, v.12, n.1, p.66-72, 2013.

VIECELLI, C. A. **Controle da mancha angular e análise bioquímica de resistência em feijoeiro tratado com extratos de *Pycnoporus sanguineus***. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2008.

VIEIRA JUNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S. Resistência sistêmica induzida em feijoeiro comum mediada por *Bacillus cereus*, uma bactéria residente de fitoplasma da cultura. In: RODRIGUES, F. A.; ROMEIRO, R. S. (Ed). **Indução de Resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Suprema, 2007. p.91-104.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; WOO, S. L.; NIGRO, M.; MARRA, R.; LOMBARDI, N.; PASCALE, A.; RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; MANGANIELLO, G.; LORITO, M. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and pathogens. **The Open Mycology Journal**, Sharjah, v.8, p.127-139, 2014.

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, p.60-69, 1993.

WALTERS, R. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. **Crop Protection**, Toowoomba, v.28, p.459-465, 2009.

WENDLAND, A.; MOREIRA, A.S.; BIANCHINI, A.; GIAMPAN, J. S.; LOBO JR. M. Doenças do feijoeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. **Manual de Fitopatologia**. v2. 5ed. Ouro Fino: Editora Agronômica Ceres Ltda, 2016, p.383-396.

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**, Leuven, v.35, 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, p.7343-7353, 2003.

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

YUAN, S.; LI, M. FANG, Z. LIU, Y.; SHI, W.; PAN, B.; WU, K.; SHI, J.; SHEN, B.; SHEN, Q. Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae*. **Biological Control**, San Diego, v.92, p.164-171, 2016.

ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; SOUZA, B. F. M.; MATOS, C. S. M. Crescimento micelial, produção e germinação de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* na presença de fungicidas químicos e *Trichoderma harzianum*. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.5, p.782-789, 2012.

ZAUZA, E. A. V.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Esterilização, preparo de meios de cultura e fatores associados ao cultivo de fitopatógenos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Ed.). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2007. p.23-51.

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.

ZHANG, T.; CHATURVEDI, V.; CHATURVEDI, S. Novel *Trichoderma polysporum* strain for the biocontrol of *Pseudogymnoascus destructans*, the fungal etiologic agent of bat white nose syndrome. **Journal Plos One**, Napoli, v.10, n.10, p.1-17, 2015.