



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE

**Avaliação de linhagens mutantes de *Trichoderma harzianum* na indução de resistência ao mofo branco e promoção do crescimento de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*).**

Renata Silva Brandão

GOIÂNIA-2019



**UFG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

## **TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES**

### **E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### **1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação       Tese

#### **2. Nome completo do autor**

RENATA SILVA BRANDÃO

#### **3. Título do trabalho**

Avaliação de linhagens mutantes de *Trichoderma harzianum* na indução de resistência ao mofo branco e promoção do crescimento de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*)

#### **4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

**[1]** Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

**a)** consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

**b)** novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **Cirano José Ulhôa, Coordenador de Pós-graduação**, em 10/07/2020, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **RENATA SILVA BRANDÃO, Discente**, em 14/07/2020, às 15:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufq.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufq.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1432852** e o código CRC **F4F5EE79**.

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E  
BIODIVERSIDADE

**Avaliação de linhagens mutantes de *Trichoderma harzianum* na indução de resistência ao mofo branco e promoção do crescimento de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*).**

Tese apresentada ao programa de  
pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade  
da Universidade Federal de Goiás  
por Renata Silva Brandão.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa

Co-orientador: Murillo Lobo Junior

GOIÂNIA – 2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Brandão, Renata Silva

Avaliação de linhagens mutantes de *Trichoderma harzianum* na indução de resistência ao mofo branco e promoção do crescimento de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). [manuscrito] / Renata Silva Brandão. - 2019.

2, 56 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa; co-orientador Dr. Murillo Lobo Junior.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2019.

Bibliografia.

1. Atividade enzimática. 2. expressão de gene. 3. mofo branco. 4. indução de resistência.. I. Ulhoa, Cirano José, orient. II. Título.

CDU 60



**ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE RENATA SILVA BRANDÃO** - Aos dois dias do mês de dezembro do ano de 2019 (02/12/2019), às 08h:30min, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs CIRANO JOSÉ ULHOA, ANDRÉ KIPNIS, VALDIRENE NEVES MONTEIRO, LEILA GARCÉS ARAÚJO e MARTA CRISTINA CORSI DE FILIPPI, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no Instituto de Ciências Biológicas/UFV - Campus Samambaia, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "Avaliação de linhagens mutantes de *Trichoderma harzianum* na indução de resistência ao mofo branco e promoção do crescimento de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*.)" em nível de DOUTORADO, área de concentração em BIOTECNOLOGIA, de autoria de RENATA SILVA BRANDÃO, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo orientador da discente, Prof. Dr. CIRANO JOSÉ ULHOA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamentou o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Prof. Dr. Cirano José Ulhoa	<u>Aprovado</u>
Prof. Dr. André Kipnis	<u>Aprovado</u>
Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro	<u>Aprovada</u>
Profa. Dra. Leila Garcés Araújo	<u>Aprovada</u>
Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi	<u>sem Aprovação</u>

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada (Habilitada ou não-Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, na área de concentração em BIOTECNOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às \_\_\_h\_\_\_min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (ICB/UFV) Cirano José Ulhoa  
 Prof. Dr. André Kipnis (IPTSP/UFV) André Kipnis  
 Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG/GO) Valdirene  
 Profa. Dra. Leila Garcés Araújo (ICB/UFV) Leila  
 Profa. Dra. Marta Cristina Corsi de Filippi (EMBRAPA) Marta Corsi de Filippi  
 Secretária da Pós-Graduação: Helôisa de Sousa Vieira

**Dedico a minha mãe Marta Maria Brandão, por todo incentivo que sempre  
recebi, pelo apoio nos momentos difíceis e pelo amor incondicional, por ser meu porto  
seguro e exemplo de vida para mim.**

**AMO VOCÊ!**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pelo dom da vida e por tudo que consegui até hoje. Com Ele tudo é possível.

A Universidade Federal de Goiás e EMBRAPA pela infraestrutura disponibilizada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade pela oportunidade, suporte e conhecimento adquirido durante a realização deste doutorado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cirano José Ulhoa, por toda a ajuda, paciência e orientação recebida durante a realização deste trabalho.

Ao meu Co-orientador Dr. Murillo Lobo Junior, por todos os anos e por me mostrar o caminho.

Agradeço também a toda a equipe de pesquisa da Universidade Federal de Goiás e EMBRAPA que não mediram esforços para que o trabalho fosse realizado, em especial aos analistas de laboratórios Paula e Marcio Vinicius.

A FAPEG pela bolsa concedida.



*"A ciência de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."*

*Galileu Galilei*

## RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a espécie mais cultivada entre as demais espécies do gênero *Phaseolus* com 95% da produção mundial. Existem diversos patógenos de importância epidemiológica que causam prejuízos econômicos a esta cultura, dentre os quais, *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo-branco. Este patógeno pode sobreviver em sementes por mais de três anos e, através delas estabelecer a doença em novas áreas. O fungo *Trichoderma* spp. destaca-se como importante agente de controle biológico de *S. sclerotiorum*. Mutantes de *Trichoderma* podem ser uma alternativa não só para o controle biológico, sugerindo-se que cepas que superexpressam aquoporinas auxiliam na sobrevivência do bioagente ao fornecer proteção contra choque osmótico. Já o mutante  $\Delta Epl-1$  está envolvido no processo de micoparasitismo contra fungos fitopatogênicos, com respostas na proteção de plantas ainda não definidas. O objetivo do estudo foi avaliar os aspectos fisiológicos e bioquímicos quanto ao uso do fungo *Trichoderma* mutantes *Aquo* e  $\Delta Epl-1$  em plantas de feijoeiro comum contra *S. sclerotiorum*. O experimento foi conduzido na Embrapa arroz e feijão e no Laboratório de Enzimologia da UFG. Análises fisiológicas e bioquímicas foram realizadas em folhas e raízes de plantas de feijão comum, produzidas a partir de sementes tratadas com o isolado silvestre All 42 de *Trichoderma harzianum*, suas linhagens de mutantes *Aquo* e  $\Delta Epl-1$ , e controle sem tratamentos. O tratamento *Aquo* promoveu um aumento de 25% na área foliar das plantas em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) e superou os tratamentos All42 e  $\Delta EPL-1$  em 28% e 91%, respectivamente. A atividade específica da enzima  $\beta$ -1,3 glucanase foi maior em plantas tratadas com *T. harzianum*  $\Delta Epl-1$ , em folhas e raízes com  $2,07 \text{ Umg}^{-1}$  e  $2,57 \text{ Umg}^{-1}$ , com e sem inoculação de *S. sclerotiorum* apresentou com  $2,27 \text{ Umg}^{-1}$  e  $2,34 \text{ Umg}^{-1}$ , respectivamente, apresentado um resultado significativo na folha em relação aos demais tratamentos.

Palavras-Chave: Atividade enzimática, expressão de gene, mofo branco, indução de resistência.

## ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the most cultivated species among the other species of the *Phaseolus* genus with 95% of world production. There are several pathogens of epidemiological importance that cause economic damage to this crop, among which, *Sclerotinia sclerotiorum*, Which causes white mold. This pathogen can survive in seeds for more than three years and, through them, establish the disease in new areas. The fungus *Trichoderma* spp. stands out as an important biological control agent for *S. sclerotiorum*. *Trichoderma* mutants may be an alternative not only for biological control, suggesting that strains that overexpress aquaporins help the bioagent survive by providing protection against osmotic shock and  $\Delta Epl-1$  mutant, on the other hand, is involved in the process of mycoparasitism against phytopathogenic fungi, with responses in the protection of plants not yet defined. The aim of the study was to evaluate the physiological and biochemical aspects regarding the use of the fungus *Trichoderma* mutants *Aquo* and  $\Delta Epl-1$  in common bean plants against *S. sclerotiorum*. The experiment was conducted at Embrapa rice and beans and at the UFG Enzymology Laboratory. Physiological and biochemical analyzes were carried out on leaves and roots of common bean plants, produced from seeds treated with the wild isolate All 42 of *Trichoderma harzianum*, their strains of mutants *Aquo* and  $\Delta Epl-1$ , and control without treatments. The *Aquo* treatment promoted an increase of 25% in the leaf area of the plants in relation to the control ( $p < 0.05$ ) and surpassed the treatments All42 and  $\Delta Epl-1$  by 28% and 91%, respectively. The specific activity of the enzyme  $\beta$ -1,3 glucanase was higher in plants treated with *T. harzianum*  $\Delta Epl-1$ , in leaves and roots with 2.07  $\text{Umg}^{-1}$  and 2.57  $\text{Umg}^{-1}$ , with and without inoculation of *S. sclerotiorum* presented 2.27  $\text{Umg}^{-1}$  and 2.34  $\text{Umg}^{-1}$ , respectively, presenting a significant result on the leaf in relation to the other treatments.

**Keywords:** biocontrol, white mold, resistance induction, mutants  $\Delta Epl1$ , ALL-42 e *Aqua*.

## SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	13
Lista de Tabelas.....	14
1. Introdução .....	15
2. Revisão Bibliográfica .....	17
2.1. Feijoeiro Comum ( <i>Phaseolus vulgaris</i> L.) .....	17
2.2. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	20
2.3. Interação Patógeno Hospedeiro .....	22
2.4. <i>Trichoderma</i> no Controle Biológico .....	23
2.5. Linhagens Mutantes de <i>Trichoderma</i> .....	27
2.6. Indução de Resistência em Plantas .....	29
2.7. Proteínas relacionadas à indução de resistência.....	31
3. Metodologia .....	35
3.1. Obtenção do inóculo.....	36
3.2. Produção das plantas em casa de vegetação .....	37
3.3. Inoculação das plantas com o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	37
3.4. Obtenção e armazenamento das amostras.....	38
1.5. Análises Fisiológicas da área foliar, sistema radicular e massa seca .....	38
1.6. Ensaio Enzimáticos.....	39
4. Resultados e Discussão.....	40
5. Conclusão.....	48
6. Referências Bibliográfica .....	49

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Isolados inoculados em arroz e suspensão dos esporos de *T. harzianum*.....32
- Figura 2:** Vasos que foram semeados para produção das plantas em casa de vegetação.....33
- Figura 3:** Plantas inoculadas com o patógeno *S. sclerotiorum*.....34
- Figura 4:** Raiz de feijão comum no estágio R5 escaneada pelo programa WinRHIZO pro 2007.....35
- Figura 5:** Efeito dos isolados de *T. harzianum* na Área foliar, Comprimento radicular, Volume radicular, Área da superfície e Massa seca em plantas de feijão comum sem o patógeno *S. sclerotiorum* e com patógeno *S. sclerotiorum*. Médias da mesma, não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de significância.....38
- Figura 6:** Análise de componentes principais (biplot) com características de promoção de crescimento de planta (Área foliar, Massa seca, volume radicular, comprimento radicular e superfície radicular) e enzimas relacionadas a indução de resistência no feijoeiro comum com *Trichoderma* e *S. sclerotiorum*.....44

## Lista de Tabelas

Tabela 01: Descrição dos estágios de desenvolvimento da planta de feijão.....	15
Tabela 02: Atividade específica das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, lipoxigenase e fenilalanina amônia liase, em amostras de folhas e raiz de feijoeiro comum.....	42
Tabela 03: Atividade específica das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, lipoxigenase e fenilalanina amônia liase, em plantas de feijoeiro comum inoculadas e não inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i> ...	42
Tabela 04: Atividade específica da média das enzimas $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, lipoxigenase e fenilalanina amônia liase, em folha e raiz de feijoeiro comum inoculadas e não inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i> .....	43

## 1. Introdução

O feijoeiro-comum, *Phaseolus vulgaris* L., é uma espécie vegetal cujos grãos compõem uma importante fonte proteica na alimentação humana. Atualmente, o Brasil posiciona-se como o segundo maior produtor mundial de feijão, com uma produção anual de aproximadamente três milhões de toneladas, superada apenas pela Índia (FAO, 2014).

O mofo branco é uma das principais doenças que afetam o feijoeiro. É causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, fungo que pode atacar mais de 408 hospedeiros e se encontra mundialmente distribuído. Culturas como o feijão, soja, algodão, alface, repolho, tomate, girassol, amendoim e ervilha, e diversas espécies de plantas daninhas, como o picão, carrapicho, caruru e vassoura que também são suscetíveis. O patógeno tem sido introduzido em novas áreas principalmente por intermédio de sementes infectadas com o micélio do fungo no tegumento e também o transporte de escleródios, que são as estruturas de resistência do fungo.

Espécies do gênero *Trichoderma* vêm sendo utilizadas com sucesso no controle biológico de fitopatógenos, por serem capazes de proteger plantas utilizando diferentes mecanismos de ação, tais como o parasitismo que designa uma relação nutricional entre dois seres vivos em que um dos componentes da relação, o parasita, obtém todo ou parte de seu alimento às custas do outro componente, o hospedeiro. A antibiose que é a interação, que na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm efeito danoso sobre o outro, a competição processo referente à interação entre dois ou mais organismos, empenhados na mesma ação é outro modo de ação de *Trichoderma*. Os organismos competem entre si para obter nutrientes, água, luz, espaço, fatores de crescimento, oxigênio, entre outros e a indução de resistência, além de colonizar o sistema radicular e promover o crescimento de diversas espécies de plantas (HARMAN et al., 2004; WOO et al., 2006).

Fungos do gênero *Trichoderma* são uns dos principais microrganismos de importância para o aumento do crescimento vegetal. Este fungo pode influenciar positivamente na germinação de sementes, no desenvolvimento e rendimento da cultura devido, também, à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas, principalmente pela solubilização de fósforo, tendo grande importância econômica para a agricultura, também, por serem capazes de atuarem como agentes de controle de doenças de várias plantas cultivadas e indutores de resistência de doenças nas plantas (CHAGAS et al., 2017).

A promoção de crescimento de plantas pela aplicação de isolados de *Trichoderma* spp. foi inicialmente relacionada ao controle de microrganismos prejudiciais presentes na rizosfera e/ou no solo e, mais recentemente, está sendo relacionada à produção de hormônios ou fatores de crescimento; maior eficiência no uso de alguns nutrientes e aumento da disponibilidade e absorção de nutrientes pela planta (CONTRERAS-CORNEJO, 2009).

Na bioquímica e na genômica funcional do processo de defesa têm sido estudadas em muitas espécies de *Trichoderma* devido à sua importância como agente de controle biológico na agricultura. Enzimas, proteínas e efetores envolvidos na interação têm sido identificados, sendo que poucos têm seu papel exato descrito na simbiose *Trichoderma* spp. - planta hospedeira (GOMES et al., 2016)

A indução de resistência (IR) em plantas é um processo fisiológico que aumenta a capacidade defensiva provocada por estímulos específicos. As plantas podem desenvolver IR como resultado de uma infecção por um agente patogênico, em resposta a inseto, após a colonização das raízes por específicos micróbios benéficos e após tratamentos com produtos químicos específicos. Nos últimos anos tem aumentado o interesse da IR a doenças em plantas baseado em duas formas conhecidas como resistência sistêmica induzida-ISR, e a resistência sistêmica adquirida-SAR. A SAR e a ISR, podem ser induzidas pela simbiose entre as raízes de plantas e *Trichoderma* spp. (HARMAN et al., 2004; HERMOSA et al., 2012).

A indução de resistência de plantas, atualmente, é vista nos países desenvolvidos como o mecanismo central pelo qual isolados de *Trichoderma* spp. atuam para diminuir as doenças foliares. Este fenômeno denominado indução de resistência sistêmica (ISR) ou resistência sistêmica adquirida (SAR), envolve a ativação de mecanismos de defesa nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. Esses mecanismos de resistência podem incluir o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas com a patogênese, tais como  $\beta$  1,3 glucanases, quitinases e peroxidase (PASCHOLATI et al., 2010).

A interação molecular entre *Trichoderma* e patógenos tem sido estudada em detalhes. Para tanto, a crescente disponibilização de genomas de espécies *Trichoderma* tem permitido a análise funcional de genes envolvidos no controle biológico e elicitores de defesa em plantas em maior escala. É possível comparar as propriedades de biocontrole de isolados nativos dos solos (selvagens) com os mutantes obtidos em laboratório, para observar resultados diretos confrontando o organismo transformado e o patógeno, detectar alterações morfológicas e também medir atividades enzimáticas em caldos de cultura (GRUBER et al., 2012).

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os aspectos fisiológicos e bioquímicos quanto ao uso das linhagens mutantes do fungo *Trichoderma harzianum* Aquo e  $\Delta Epl-1$  em plantas de feijoeiro comum contra *S. sclerotiorum*.



## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Feijoeiro Comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma espécie de grande importância econômica e social para a alimentação da população brasileira, sendo a espécie mais cultivada entre as demais do gênero *Phaseolus* com 95% da produção mundial (ASSIS SILVA et al., 2011).

O gênero *Phaseolus* abrange cerca de 60 espécies, das quais cinco são as mais cultivadas: *P. vulgaris* L. (feijoeiro comum), *P. lunatus* (feijão de lima), *P. coccineus* L. (feijão ayocote), *P. acutifolius* A. Gray (feijão tepari) e *P. polyanthus* Greenman. A espécie de maior relevância econômica é o *P. vulgaris*, por ser cultivada há mais tempo e a mais utilizada (SINGH, 2001; SANTOS; GAVILANES, 2008).

O feijoeiro-comum é originário do continente americano, possuindo dois centros de origem, o mesoamericano e andino (McCLEAN, 1993). No Brasil, a espécie foi introduzida da América Central e, desde então, os seus grãos compõem, diariamente, uma importante fonte proteica na alimentação. A leguminosa tornou-se um dos pilares da dieta de diversos países, fundamental para a segurança alimentar e nutricional, sobretudo para as classes mais carentes (BARBOSA; GONZAGA, 2012).

É uma planta herbácea, anual, autógama, diplóide ( $2n=2\times=22$  cromossomos), com taxa de fecundação cruzada estimada entre 3% e 5%. Pelo fato de ser cultivado em grande diversidade de ambientes e em muitos países, ele é uma das espécies com maior variabilidade de caracteres agrônômicos, como hábito de crescimento, tamanho e cor de grãos e ciclo (SANTOS; GAVILANES, 2008).

Leguminosa mais importante para consumo humano direto, a produção é especialmente importante na América Latina, África tropical e Europa Oriental, e onde é consumido por milhões de pessoas (HANAI et al., 2010). O feijão é altamente nutritivo com quase o dobro dos níveis de proteínas em relação aos cereais, menor teor de gordura do que a soja ou amendoim e maior quantidade de lisina, fósforo, ferro, zinco, magnésio, cobre e cálcio do que cereais (BLAIR et al., 2009; BOTELHO et al., 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijão com produção média anual de 3,5 milhões de toneladas. Típico produto da alimentação brasileira é cultivado por pequenos e grandes produtores em todas as regiões. Os maiores são Paraná, que colheu 298 mil toneladas na safra 2009/2010, e Minas Gerais, com a produção de 214 mil toneladas no mesmo período. A safra tem taxa anual de aumento projetada de 1,77%, de acordo com estudo da Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura. Os dados também mostram crescimento no consumo, cerca de 1,22% ao ano, no período 2009/2010 a 2019/2020, passando de

3,7 milhões de toneladas para 4,31 milhões de toneladas. As projeções indicam também a possibilidade de importação de feijão nos próximos anos. Porém, a taxa equivaleria a 161,3 mil toneladas em 2019/2020, quantidade pouco expressiva (BRASIL, 2016).

As sementes não possuem albume e as reservas nutritivas estão concentradas nos cotilédones. Compõe-se de um tegumento que envolve um embrião bem desenvolvido. Tegumento ou testa corresponde à capa de proteção da semente, onde se localizam os pigmentos. Externamente ao tegumento, há o hilo, micrópila e rafe. Já internamente, está o embrião, o qual é formado pela plúmula, duas folhas primárias, hipocótilo, dois cotilédones e a radícula (VILHORDO et al., 1996).

A cor do tegumento apresenta ampla variabilidade de cores, podendo ser brilhante, opaca ou apresentar nuances. As diferenças das características externas apresentadas pelos grãos são usadas para classificar os grãos em tipos comerciais: Preto, Mulatinho, Carioca, Roxinho, Rosinha, Amarelo, Manteigão, Branco e outros (COSTA, 2014; SILVA, 2014).

As plantas de feijoeiro podem ser de hábito de crescimento determinado ou indeterminado. As plantas de hábito de crescimento determinado são as que desenvolvem uma inflorescência no ápice da haste principal e das hastes laterais. O florescimento ocorre do ápice para a base da planta, e dado o seu início, a emissão e a alongação de folhas e ramos são interrompidas. O período de floração é curto e a maturação uniforme (SANTOS; GAVILANES, 2008; COSTA, 2014).

Nas plantas de crescimento indeterminado os meristemas apicais da haste principal e das laterais continuam vegetativos durante o florescimento. Portanto, as plantas continuam a produzir folhas e flores por um período mais longo do que as determinadas. As inflorescências são axilares, isto é, desenvolvem-se nas axilas das folhas, e a floração inicia-se da base para o ápice da planta (COSTA, 2014; SANTOS; GAVILANES, 2008; SILVA, 2014).

A escala de desenvolvimento usual para a planta de feijão compreende dez estádios (Tabela 1). A identificação de cada estádio é feita com base em um código com uma letra e um número. A letra corresponde a fase à qual o estádio pertence, isto é, V = fase vegetativa e R = fase reprodutiva. Os números de zero a nove indicam, de forma crescente, a posição do estádio na escala (FERNÁNDEZ et al., 1985).

**Tabela 01:** Descrição dos estágios de desenvolvimento da planta de feijão

Estágio	Descrição
V0	<b>Germinação:</b> absorção de água pela semente; emissão da radícula e caulículo e sua transformação em raiz primária
V1	<b>Emergência:</b> os cotilédones aparecem ao nível do solo, separam-se e o epicótilo começa seu desenvolvimento
V2	<b>Folhas primárias:</b> folhas primárias totalmente abertas
V3	<b>Primeira folha trifoliolada:</b> abertura da primeira folha trifoliolada e aparecimento da segunda folha trifoliolada
V4	<b>Terceira folha trifoliolada:</b> abertura da terceira folha trifoliolada e formação de ramos nas gemas dos nós inferiores
R5	<b>Pré-floração:</b> aparecimento do primeiro botão floral e do primeiro rácemo. Os botões florais das cultivares com hábito de crescimento determinado (tipo I) se formam no último nó do talo e do ramo. Nas cultivares com hábito indeterminado (Tipo II, III e VI) os rácemos aparecem primeiro nos nós mais baixos
R6	<b>Floração:</b> abertura da primeira flor
R7	<b>Formação das vagens:</b> aparecimento da primeira vagem até apresentar 2,5 cm de comprimento, ou seja, com corola murcha ainda ligada ou caída
R8	<b>Enchimento das vagens:</b> início do enchimento da primeira vagem (crescimento da semente). Ao final do estágio, as sementes perdem a cor verde e começam a mostrar as características da variedade. Início da desfolha
R9	<b>Maturação:</b> as vagens perdem sua pigmentação e começam a secar. As sementes desenvolvem a cor típica da cultivar

V = vegetativa; R = reprodutiva. Cada estágio começa quando 50% das plantas apresentam as condições relativas ao estágio. Fonte: Adaptado de Fernández et al., (1985).

Aproximadamente 90 dias após o plantio, o feijão pode ser colhido. No Brasil o plantio da cultura é dividido em três safras: (I) a safra das águas – onde o plantio e a colheita são beneficiados pelo alto índice de chuvas de julho a outubro, (II) a safra da “seca” ou “safrinha” no período com o menor índice de chuvas, com plantio de dezembro a março, e (III) a safra irrigada que geralmente é feita sob sistema de pivô central, concentrada na região Centro-Sul, de abril a junho (FERREIRA, 2007).

Além da importância econômica, o feijão possui um importante papel social, uma vez que é reconhecido como cultura de subsistência em pequenas propriedades. No Brasil, a produção é feita principalmente através da agricultura familiar e de acordo com os dados do Ministério do Desenvolvimento Agrário, esse setor emprega quase 75% da mão-de-obra no campo e é responsável pela segurança alimentar dos Brasileiros, produzindo 70% do feijão consumido no país (FAO, 2014; BRASIL, 2010).

Entre diversos patógenos de importância epidemiológica que causam prejuízos a essa cultura, destaca-se *S. sclerotiorum*. Este pode sobreviver em sementes por mais de três anos e, através delas estabelecer a doença em novas áreas. BIANCHINI et al., 2005 comentam que em áreas com histórico dessa doença, podem ocorrer sérios problemas, pois este patógeno é um dos mais destrutivos do feijoeiro comum, capaz de causar 100% de perdas na produção, sobretudo pela dificuldade de manejo.

## 2.2. *Sclerotinia sclerotiorum*

No Brasil, o primeiro relato do mofo branco causado por *S. sclerotiorum* ocorreu em São Paulo, em 1921, na cultura da batata (CHAVES, 1964). Na cultura da soja, a doença foi relatada, pela primeira vez, em 1924, na Hungria, e desde então foi detectada em vários outros países (GRAU; HARTMAN, 1999). No cerrado, a doença foi detectada, pela primeira vez, na década de 90, sendo considerada uma doença de pouca importância, com ocorrência esporádica em regiões mais altas e em anos apresentando temperaturas mais baixas (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010).

O fungo *S. sclerotiorum* vem ganhando importância nos últimos anos, devido aos prejuízos causados e às dificuldades no manejo. É um fungo polífago, mas entre suas mais de 400 hospedeiras, não estão incluídas as gramíneas (ALMEIDA et al., 2005). Dentre as culturas suscetíveis, encontram-se espécies economicamente importantes, como soja, feijão, tomate, algodão, alface, repolho, amendoim e girassol, e plantas daninhas, como carrapicho, picão, caruru, mentrasto e vassoura (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

O mofo branco é considerado uma doença de grande importância econômica, especialmente em regiões que possuem clima mais ameno, como nas condições encontradas nas regiões Sul, Sudeste e em áreas elevadas do Centro-Oeste e Nordeste, onde ocorrem temperaturas mais baixas (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). Os prejuízos acontecem em função da queda na produtividade da lavoura e, dentre as perdas, estão o aumento do custo de produção em função do emprego de métodos químicos de controle e, o mais importante, a condenação de áreas para a produção de sementes (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

*S. sclerotiorum* pertence ao Filo Ascomycota, Classe Discomycetes, Ordem Helotiales e família Sclerotiniaceae. Este patógeno é cosmopolita e inespecífico, podendo infectar mais de 408 espécies de plantas entre elas, monocotiledôneas e dicotiledôneas. A espécie *S. sclerotiorum* é conhecida e estudada desde 1837 e está distribuído mundialmente (GÖRGEN, 2009). Essa doença ocorre em um grande número de países, principalmente de clima temperado e subtropical (BIANCHINI et al., 2005).

Essa doença demonstrou um aumento considerável a partir da safra de 2008, com estimativa de 23,7% da área de cultivo de soja no Brasil infestados pelo patógeno na safra 2012/2013, superando 2,6 milhões de

hectares (MEYER et al., 2015). De acordo com a Sociedade Nacional de Agricultura (SNA), nada menos que seis milhões de hectares (de um total de 70 milhões de hectares cultivadas) apresentam a doença no Brasil (MENTEN; CALAÇA; KREYCI, 2015).

Os escleródios são constituídos por um enovelamento de hifas, de coloração inicialmente branca, tornando-se negros posteriormente. A coloração escura é resultado da presença de melanina, pigmento que possivelmente desempenha um papel importante na proteção contra condições adversas e na degradação microbiana (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006).

Os escleródios podem germinar de duas formas miceliogênica ou carpogênica. A germinação miceliogênica é caracterizada pelo crescimento de hifas hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas, formadas a partir de microporos do escleródio. A germinação carpogênica é considerada, por vários autores, como a principal responsável pelas epidemias em campo. Os fatores ambientais condicionantes da germinação carpogênica do escleródio incluem temperatura, umidade do solo e profundidade em que o escleródio se encontra no solo. Ocasionalmente, o micélio do fungo presente no solo infecta a planta por meio do seu contato direto com injúrias nos tecidos do caule. A germinação inicia-se com o crescimento das células fúngicas, denominadas estipes; estes, por sua vez, quando expostos à luz, diferenciam-se em apotécios que liberam milhares de ascósporos responsáveis por iniciar a doença na parte aérea da planta. (LIU; PAUL, 2007).

O apotécio possui formato de taça, conforme descrito por Hao et al., 2003, e coloração branca, amarela ou marrom, chegando a medir até 130 mm de comprimento. Os ascósporos (esporo sexual), citado anteriormente, são cobertos por uma mucilagem pegajosa que, além de formar agregados de esporos, auxilia sua adesão à superfície da planta (CLARKSON, 2003). Como os ascósporos germinam e colonizam tecidos senescentes e mortos, flores senescentes são frequentemente fontes de novas infecções; portanto, as novas flores na base da planta podem ser infectadas durante as fases finais do período de infecção.

Os escleródios possuem formato e tamanho irregular, variando de acordo com o hospedeiro, sendo que em certas culturas, como no girassol, o escleródio pode cobrir todo o capítulo, atingindo mais de 35 cm de diâmetro, enquanto que, no feijão, o escleródio possui de 2 a 10 mm de diâmetro (BOLTON; THOMMA; NELSON, 2006). Os escleródios podem germinar de forma miceliogênica, produzindo hifas, ou então carpogênicamente, com a produção de corpos de frutificação denominados apotécios. Para que ocorra a germinação carpogênica, os escleródios passam por um período de condicionamento no solo (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Cada escleródio é capaz de dar origem a mais de 20 apotécios, nos quais são formados milhares de ascos e, a partir destes, são liberados os ascósporos, sendo que durante o período funcional (5 a 10 dias), mais de dois milhões de ascósporos podem ser liberados de um único apotécio (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

O patógeno pode atacar a planta o feijoeiro em qualquer estágio fisiológico, porém, os maiores danos acontecem em plantas adultas, sendo considerados os estádios de florescimento e formação de vagens os períodos de maior suscetibilidade (CASSETARI NETO; MACHADO; SILVA, 2010). Em geral, o processo de infecção se inicia na junção do pecíolo com a haste, cerca de 10 a 15 cm acima do solo, onde flores, pétalas e folhas senescidas se aderem (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999).

O mofo-branco uma doença de difícil controle, devido, principalmente, à formação de estruturas de resistência que garantem a sobrevivência do patógeno por longos períodos no solo. Diante disso, a principal medida de controle da doença é a prevenção, evitando a entrada do patógeno na área, pois, após introduzido no local, é praticamente impossível erradicá-lo (ALMEIDA et al., 2005; PAULA JÚNIOR et al., 2010). Após detectada a doença no campo, a utilização de diferentes técnicas de controle, realizadas em conjunto, são essenciais para a manutenção do inoculo em baixos níveis.

### **2.3. Interação Patógeno Hospedeiro**

Uma vez instalado sobre o tecido vegetal, o *S. sclerotiorum* inicia seu crescimento invasivo nas camadas celulares do hospedeiro, a partir da lamela média seguindo para a parede celular primária. As células vegetais possuem em sua composição uma complexa rede de microfibrilas de celulose, moléculas de hemicelulose e pectina. Esta última é um carboidrato, formado por polímeros de ácido poligalacturônico, que, juntamente com os polissacarídeos que compõem a hemicelulose e celulose, são responsáveis pela rigidez da parede celular, formando uma verdadeira barreira física. Estes componentes funcionam como verdadeiros elicitores ao entrar em contato com estruturas infectantes de *S. sclerotiorum*, principalmente os monômeros de pectina, que, sofrendo despolimerização, proporcionam uma rica fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo (VRIES et al., 2001).

Com o início do processo de invasão, a planta ativa a formação de uma barreira tóxica contra o patógeno através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), o ânion super-óxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que buscam eliminar a fonte agressora, seja pelo efeito tóxico direto das ERO ou pela - 4 - ativação de genes de defesa da planta, a exemplo dos inibidores de poligalacturonases, PGIs (REZENDE et al., 2003).

Em *S. sclerotiorum*, a síntese do oxalato é catalisada pela enzima oxalacetato acetil-hidrolase, e a sua atividade enzimática aumenta de forma proporcional à diminuição de pH do meio. Sua catálise é mediada pela ação da enzima oxalato descarboxilase, presente em altas concentrações intracelulares neste fungo (ROLLINS et al., 2003). O sucesso do processo patogênico se deve inicialmente à síntese e secreção de ácido oxálico pelo fungo. O pH neutro ou ligeiramente alcalino do tecido do hospedeiro estimula a síntese de oxalato, resultando em uma acidificação do meio extracelular que tem sido mostrada como um sinal chave na diferenciação entre o crescimento saprofítico e o crescimento necrotrófico (DURMAN et al., 2005). Relatos recentes, no entanto, mostraram que é na verdade, pH baixo, e não ácido oxalato em si, o que estabelece melhores condições para a patogenicidade de *S. sclerotiorum* (XU et al., 2015).

Outro dado relevante a ser considerado é que enzimas pectinolíticas, proteolíticas e outras hidrolases possuem uma maior atividade em condições ácidas, proporcionado pela ação do ácido oxálico. O potencial patogênico está diretamente relacionado com a produção do oxalato e a alteração do pH do meio, visto que a análise de isolados mutantes que não secretavam oxalato não eram capazes de infectar o hospedeiro, não sendo, desta forma, patogênicos. O oxalato secretado além de ser diretamente tóxico à planta, funciona como quelante de íons cálcio, desestabilizando o sistema bioquímico funcional do hospedeiro, sequestra o cálcio da parede celular, suprime o estresse oxidativo gerado pela planta, pela neutralização das espécies reativas de oxigênio e diminui a afinidade da ligação entre as Poligalacturonases (PGs) do fungo com os inibidores de poligalacturonases (PGIs) do hospedeiro (FAVARON et al., 2004).

Dentre as várias enzimas secretadas, *S. sclerotiorum* sintetiza um grupo conhecido como poligalacturonases (PGs), que é composto por isoformas que atuam em conjunto, cujo alvo são as ligações endo e exo dos polímeros de ácido poligalacturônico da pectina presente na parede celular da planta, sendo o resultado final a maceração tecidual, quebra do talo e morte do hospedeiro. Uma isoforma de endopoligalacturonase foi descrita também como indutora de morte celular programada no hospedeiro, favorecendo o ataque necrotrófico do fungo *S. sclerotiorum* (ZUPPINI et al., 2005).

#### **2.4. *Trichoderma* no Controle Biológico**

Atualmente, a adoção de métodos de controle desempenha um papel importante dentro do manejo integrado de doenças. O uso de agentes de biocontrole no tratamento de sementes é uma medida já aceita por muitos produtores, pois pode ser uma alternativa para diminuir a dependência dos fungicidas nos cultivos agrícolas, e também evitar a resistência dos patógenos a tais produtos químicos. Nesse sentido, o fungo *Trichoderma* spp. destaca-se como importante agente de biocontrole na microbiolização de sementes. No Brasil, a área tratada com *Trichoderma* spp. cresceu nos últimos anos, e sua viabilidade, como medida de

controle de doenças é justificada não só pela sua ação antagonista, mas está relacionada com a sustentabilidade na agricultura moderna (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O gênero *Trichoderma* (teleomorfo *Hypocrea*) é um fungo pertencente à classe *Hyphomycetes*, ordem *Hyphomycetales*, família *Moniliaceae* (HARMAN, 2008). Pelo fato de muitas linhagens não apresentarem o ciclo sexual conhecido (HARMAN et al., 2004), estes microrganismos são classificados como fungos anamórficos ou imperfeitos. Os fungos imperfeitos são caracterizados pela produção de conídios formados a partir de células conidiógenas, contidas ou não em estruturas especializadas (conidiomas), ou por fragmentação do talo micelial (MASSOLA JR; KRUGNER; 2011).

No ambiente, as espécies de *Trichoderma* spp. costumam ser microrganismos de vida livre, que interagem no solo, nas superfícies radiculares e no interior dos tecidos vegetais (RAJENDIRAN et al., 2010). Esses fungos também colonizam outros substratos, como a madeira, onde a fase sexual (gênero *Hypocrea*) é frequentemente encontrada. O *Trichoderma* é um fungo encontrado naturalmente em diferentes tipos de solos, vivendo saprofiticamente e parasitando outros fungos, comportando-se como antagonista a vários fitopatógenos, sendo um dos fungos mais pesquisados na atualidade, uma vez que, são capazes de atuarem como agentes de controle biológico, como promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas a doença em diferentes culturas (LOUZADA et al., 2009).

Nesse sentido, para a cultura do feijoeiro, há apenas dois produtos à base de *Trichoderma* spp., registrados no Brasil, para o controle de *Fusarium solani* e *Rhizoctonia solani*, representados pelas espécies de *T. asperellum* e *T. harzianum* (AGROFIT, 2015). No entanto, de acordo com Lopes (2009), existe no mercado um grande número de produtos que não possuem registro junto ao MAPA, porém são utilizados no tratamento de substrato e de sementes e pulverização na parte aérea das plantas.

O fungo *Trichoderma* spp. possui linhagens de algumas espécies utilizadas no controle de fitopatógenos (MACHADO et al., 2012), sendo *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. viride* as principais espécies comercializadas como agentes de biocontrole (MORANDI; BETTIOL, 2009). Por sua vez, a eficiência no controle de patógenos associados às sementes foi constatada por diversos pesquisadores em culturas como arroz, feijão, soja e trigo (D'AGOSTINO; MORANDI, 2009).

As primeiras publicações sobre o uso de *Trichoderma* como agente de controle biológico de plantas no Brasil e no exterior foram nas décadas de 1950 e 1930, respectivamente. Foster descreveu a inativação do vírus do mosaico do fumo (TMV) por filtrados da cultura de *Trichoderma* sp. e Weindling descreveu a inibição dos patógenos *R. solani* e *S. americana* pelos mecanismos de parasitismo e antibiose de *T. lignorum* (HOWELL, 2003; BETIOL; MORANDI, 2009). Entretanto, embora as habilidades deste gênero como agente



de biocontrole sejam conhecidas há mais de 80 anos, somente recentemente algumas linhagens começaram a ser comercializadas e empregadas na produção agrícola mundial (HARMAN et al., 2004).

A capacidade de se associar às raízes das plantas (rizocompetência) é um destaque desse gênero. A simbiose ocorre por mecanismos similares aos de fungos micorrízicos, iniciando-se com a colonização da superfície externa das raízes que se estende por todo o rizoplano, seguida da produção de celulases e da invasão da primeira ou da segunda camada de células da epiderme, com a produção de hidrofobinas, que são proteínas que permitem a adesão às superfícies hidrofóbicas (BENÍTEZ et al., 2004).

O controle biológico está diretamente influenciado pelo equilíbrio ambiental, com objetivo de criar um ambiente favorável ao antagonista, interagindo em todo o sistema biológico. Esses métodos visam manter um equilíbrio no agroecossistema, de modo que a planta, na presença do patógeno, não sofra danos significativos, em função da ação controladora dos antagonistas (BIZI et al., 2005).

O sucesso do emprego desses fungos depende do seu crescimento, colonização e sobrevivência nos ambientes onde são aplicados. Portanto, o tipo de solo, teor de matéria orgânica, pH, temperatura, disponibilidade de água, micro-organismos presentes e disponibilidade de oxigênio e nutrientes, influenciam diretamente a atuação dos agentes de biocontrole.

Na agricultura, *Trichoderma* tem despertado um interesse cada vez mais expressivo, especialmente com relação ao seu uso como agentes de biocontrole de doenças de plantas. Desde então, pesquisas têm elucidado os mecanismos que estes fungos desenvolvem, configurando-os assim, como verdadeiros antagonistas de fitopatógenos. Os mecanismos mais conhecidos são: competição por nutrientes, antibiose, micoparasitismo, competência rizosférica e indução de resistência (BENÍTEZ et al., 2004).

Dentre microrganismos benéficos, fungos do gênero *Trichoderma* têm sido os mais estudados para melhorar o desenvolvimento e a produção de plantas devido, principalmente, à sua capacidade de colonizar raízes, formando associações simbióticas com as plantas (HARMAN, 2008). Produzem um grande número de substâncias (enzimas e antibióticos) que atuam na decomposição de resíduos vegetais e na inibição de agentes patogênicos, interferindo de forma direta ou indireta no desenvolvimento das plantas (HARMAN et al., 2004; HOYOS-CARVAJAL et al., 2009; SHANMUGAIAH et al., 2009). A presença do *Trichoderma* spp. no solo torna os nutrientes mais solúveis, permitindo uma maior e mais rápida absorção pelas plantas, causando aumento no crescimento do sistema radicular, acompanhado pelo aumento da massa verde.

O processo de antagonismo desenvolvido por este fungo é complexo e pode ocorrer por diferentes mecanismos, ou por uma combinação destes, como a predação, amensalismo (antibiose), parasitismo, e pela

competição por nutrientes, espaço e sítios de infecção. Uma das vantagens do emprego de fungos antagonistas é que estes podem ser introduzidos em ambientes diferentes dos quais foram isolados por serem capazes de estabelecer e parasitar o patógeno, bem como se adaptar ao micro-habitat deste (MELO; AZEVEDO, 2000).

Algumas linhagens de *Trichoderma* são utilizadas no controle de fitopatógenos e na promoção de crescimento vegetal com uma versatilidade de ação, atuando por mecanismos diretos e/ou indiretos, dos quais, destacam-se, micoparasitismo, antibiose e competição, além de atuarem como indutores de resistência das plantas contra doenças (HOYOS-CARVAJAL, ORDUZ, E BISSETT, 2009).

A atividade de biocontrole pode ocorrer indiretamente, competindo por espaço e nutrientes, modificando as condições ambientais, produzindo antibióticos, inativando as enzimas do patógeno ou, diretamente, mediante o micoparasitismo. (MUKHERJEE et al., 2012).

O micoparasitismo de *Trichoderma* é um processo complexo, de base molecular ainda em muito desconhecida. A atividade micoparasita de *Trichoderma* spp. pode ser devido a produção de antibióticos, competição por nutrientes, produção de enzimas envolvidas na hidrólise da parede celular ou uma combinação dessas atividades antagonistas. O conhecimento de proteínas intracelulares, extracelulares e de parede celular de *Trichoderma* é necessário para identificar produtos gênicos desempenhando funções no controle biológico. Num contexto mais amplo, a separação e identificação de proteínas de *Trichoderma* poderão fornecer possíveis alvos com atividade antifúngica (DRUZHININA et al., 2011).

O processo envolve eventos sequenciais que incluem reconhecimento, ataque, penetração e morte do hospedeiro. Durante o ataque *T. harzianum* secreta ao meio extracelular enzimas degradadoras da parede celular que incluem endoquitinases,  $\beta$ -glicosidase, manosidases, fosfatases ácidas e proteases as quais agem sinergicamente causando o controle efetivo de micoparasitas como *Botrytis cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, *R. solani* e *Fusarium* spp. Quando se estabelece o contato físico entre micoparasita e hospedeiro, as hifas do primeiro aderem-se por meio de estruturas especializadas denominadas ‘apressórios’ e enovelam-se ao redor das hifas do hospedeiro (MONTEIRO et al., 2010).

O micoparasita, então, penetra no lúmen da hifa do hospedeiro, onde assimila e metaboliza o conteúdo protoplasmático, utilizando seu aparato enzimático. Os fungos do gênero *Trichoderma* são considerados excelentes hiperparasitas, atacando hifas e estruturas de reprodução e sobrevivência dos patógenos de plantas, assim reduzindo a capacidade infectiva e o inóculo do patógeno para infecções subsequentes (AMORIM et al., 2011).

Antibiose é uma a interação entre organismos na qual indivíduos de uma população secretam metabólitos voláteis e/ou não-voláteis capazes de inibir ou impedir o desenvolvimento dos indivíduos de uma população de outra espécie. (BENÍTEZ et al., 2004).

Inibindo o patógeno pela produção de diversas substâncias tóxicas, metabólitos voláteis e não voláteis, como os ácidos harziânico e heptelídico, e enzimas tais como alamicinas, tricholinas e glisopreninas (REINO et al., 2008).

A competição por substratos é considerada um dos mais eficientes mecanismos de ação utilizados por *Trichoderma*. Baseia-se no fato de que os microorganismos competem uns com os outros para obter fontes a base de carbono, nitrogênio, oxigênio, ferro e outros micronutrientes. Aqueles mais eficientes em usar os recursos disponíveis se multiplicam e colonizam rapidamente a rizosfera. Provavelmente esse mecanismo é a forma mais comum no controle biológico. A competição por espaço ou sítios de infecção poderá ocorrer concomitantemente contribuindo para a atividade de biocontrole (VINALE et al., 2009).

O uso de microrganismos que antagonizam patógenos de plantas é uma saída sustentável para a problemática do controle de doenças na agricultura, a qual se perpetua por anos de cultivo agrícola, apesar do uso intenso de agrotóxicos. Espécies do gênero *Trichoderma* possuem propriedades antagônicas baseadas na ativação de um arsenal de mecanismos variados, o que possibilita atividade contra um largo espectro de fitopatógenos, e capacidade de controlar um grande número de doenças de plantas (RIBEIRO, 2009).

### **2.5.Linhagens Mutantes de *Trichoderma***

As Aquoporinas têm sido descobertas em organismos dos vários reinos da vida, incluindo organismos unicelulares, como bactérias, leveduras e protozoários, e organismos multicelulares, como plantas e animais (BENGA, 2009). Nas plantas, por exemplo, as Aquoporinas mais abundantes encontram-se na membrana plasmática e na membrana do vacúolo (tonoplasto) (MAUREL et al., 2008). Apesar de não se encontrarem em todas as células e em todos os seres vivos, as Aquoporinas desempenham um importante papel e estão presentes nas membranas onde é necessária uma passagem rápida das moléculas de água de modo a que essas células possam desempenhar as suas funções (BENGA, 2009). Para além de transportarem água, algumas destas proteínas podem transportar glicerol, contribuindo, por exemplo, para o metabolismo dos lípidos nos mamíferos. Outros estudos também sugerem que podem transportar outras pequenas moléculas e gases, como aminoácidos e dióxido de carbono (VERKMAN, 2011). As Aquoporinas desempenham, assim, funções em diversos processos biológicos, como as relações de simbiose nos nódulos das leguminosas e nas micorrizas, nas plantas, e a hidratação da pele, nos mamíferos.

As Aquoporinas são pequenas proteínas integrais de membrana, que pertencem à antiga família proteínas intrínsecas principais, com membros em animais, micro-organismos e plantas (KALDENHOFF et al., 2008). Principais proteínas intrínsecas ou aquaporinas são sinônimos que são frequentemente utilizados na literatura. Tais proteínas foram descobertas em todos os reinos, archaeas e eubactérias, fungos, animais e Plantas (ENGEL; STAHLBERG, 2002). Isolados de *Trichoderma* mutantes que superexpressam proteínas podem ser uma alternativa não só para o controle biológico, pois foi sugerido que Aquaporinas auxiliam na sobrevivência ao fornecer proteção contra o choque osmótico (TANGHE et al., 2006).

Em eucariotos superiores, os membros da família das Aquoporinas executam uma grande variedade de funções fisiológicas, incluindo: concentrar a urina nos rins (CHEN et al., 2013), controlar a absorção de glicerol nas células (FRÜHBECK, 2005), manter a homeostasia de água no cérebro (AMIRY-MOGHADDAM; OTTERSEN, 2003), e regulação da osmolaridade na célula vegetal (AZAD et al., 2008; MAUREL et al., 2002). São canais proteicos presentes na membrana plasmática e em membranas intracelulares, responsáveis pelo transporte de água e pequenos solutos neutros, como ureia, ácido bórico, ácido salicílico e gases como amônia e dióxido de carbono (MAUREL et al., 2008). A estrutura proteica das Aquoporinas apresenta características conservadas. É constituída de seis hélices conectadas por três alças extracelulares e duas alças intracelulares, com as porções Ne C-terminal projetadas para o citoplasma (KALDENHOFF et al., 2008).

Apesar do número crescente de genomas sequenciados, as proteínas da família cerato-platanina (CPPs) parecem existir apenas em fungos. Bactérias, Oomycota, plantas e animais não possuem de fato homólogos de CP, enquanto que genes que codificam para CPPs foram encontrados, até agora, em mais de 50 genomas fúngicos (CHEN et al., 2013). Os dados experimentais sugerem que os CPPs desempenham um papel durante as interações fungo-planta. Quando *T. virens* e *T. harzianum* foram co-cultivados respectivamente com raízes de algodão ou tomate, a expressão de CPPs aumentou em comparação com a cultura obtida na ausência da planta (DJONOVIC et al., 2006; SAMOLSKI et al., 2009).

As cerato-plataninas são uma pequena família de proteínas caracterizadas por possuir homologia em sequências, mas nem sempre com uma clara identidade funcional. Entretanto, elas são todas secretadas e, em alguns casos, estão envolvidas no fenômeno de reconhecimento biológico (BODDI et al., 2004). A proteína elicitora de defesa, denominada Epl-1 foi identificada como maior componente do secretoma de *Hypocrea atroviridis* (SEIDL et al., 2006). A análise da sequência desta proteína revelou ser uma proteína a SM1 (VARGAS et al., 2008) e, também, membro da família cerato-plataninas.

Proteínas da família Cerato-platanina (CP) são liberadas durante os primeiros estádios de desenvolvimento de fungos filamentosos. Eles podem atuar como elicitores e induzir respostas de defesa em

plantas. Por exemplo, as proteínas Sm1 ou  $\Delta Epl-1$  de *T. virens* e *T. atroviride*, respectivamente, demonstraram induzir a produção de fitoalexina e ou morte celular em plantas hospedeiras e não hospedeiras.

O mutante  $\Delta Epl-1$  de *T. harzianum* está envolvido no processo de microparasitismo contra fungos fitopatogênicos, na proteção, reconhecimento, no enrolamento nas hifas hospedeiras e expressão de defesas relacionadas em plantas de feijão-comum. O grupo de pesquisa do laboratório de enzimologia da Universidade Federal de Goiás, vem trabalhando com o fungo do gênero *Trichoderma*, dentre os estudos está linhagens mutantes deste fungo, que estão sendo utilizadas neste trabalho.

## 2.6. Indução de Resistência em Plantas

A indução de resistência é um fenômeno em que a planta expressa um aumento da sua capacidade de resistência eliciada por estímulos ambientais específicos. Tal resistência é efetivada contra um amplo espectro de patógenos parasitas, incluindo fungos, bactérias, vírus, nematóides, plantas parasíticas e até insetos herbívoros (WALLING, 2006).

Os primeiros relatos de indução de resistência foram descritos por Beauverie, 1901 e Ray, 1901 que observaram o fenômeno em begônias pelo uso de isolados atenuados de *Botrytis cinerea* e relacionaram a indução com as condições ambientais de cultivo. No Brasil, os primeiros estudos de indução de resistência foram desenvolvidos pela Dra. Walkyria B. C. Moraes ao usar uredíniosporos inativados de *Hemileia vastatrix* em plantas de cafeeiro contra a ferrugem alaranjada (ROMEIRO, 2005).

As plantas não aceitam passivamente a agressão por parte de seus inimigos, pois possuem mecanismos de resistência pré-formados e pós-formados que podem ser estruturais ou bioquímicos. Os mecanismos pré-formados apresentam barreiras já existentes antes do contato com os patógenos e que visam conter a agressão, sendo que estas barreiras são denominadas de defesas constitutivas e são representadas por mecanismos estruturais como: ceras, cutículas, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, bem como substâncias bioquímicas pré-formadas, como fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fitotoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (AGRIOS, 2005).

Além destes, existem os mecanismos de resistência pós-formados que são ativados ou aumentam a concentração de compostos pré-existentes após a infecção do patógeno. Estes mecanismos envolvem a formação de papila, halo, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, que são mecanismos estruturais, já os compostos constituintes dos mecanismos bioquímicos pós-formados são as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e espécies reativas de oxigênio (AGRIOS, 2005).

A expressão de defesa na planta pode ocorrer por meio de duas rotas metabólicas diferentes, sendo

assim a indução de resistência pode ser dividida em resistência induzida por microrganismos patogênicos que tem o ácido salicílico (AS) como principal sinalizador, levando a expressão principalmente de proteínas-RP, sendo designada como resistência sistêmica adquirida ou SAR (do inglês – systemic acquired resistance) (MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1996), e a resistência sistêmica induzida ou ISR (do inglês – induced systemic resistance), cujos principais sinalizadores são ácido jasmonico (JA) e etileno (ET) e independe do AS (BOSTOCK,1999). De qualquer maneira, independentemente do agente biótico indutor, a comunicação cruzada entre as diferentes rotas já foi demonstrada (PIETERSE et al., 2005).

Os hormônios das plantas JA, ET e SA são reguladores centrais do sistema de resistência nas plantas. JA e ET são jogadores importantes na regulamentação do ISR e provaram ser eficazes contra-atacantes de fungos necrótrofos típicos que são sensíveis às defesas dependentes de JA / ET (CHOUDHARY et al., 2011), enquanto a via SA é importante na regulamentação da SAR, AS (ALKOORANEE et al., 2015).

Os agentes patogênicos das plantas estimulam a planta hospedeira a ativar as respostas da defesa contra os invasores, mas essa fraca reação de defesa não limitará a disseminação do patógeno na planta hospedeira (THORDAL-CHRISTENSEN, 2003). No entanto, as respostas de defesa podem ser reforçadas desencadeando a planta antes do ataque de patógenos. A aplicação de microrganismos para o controle de doenças, que é uma forma de controle biológico, é uma abordagem ecológica (LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

Os fungos promotores do crescimento das plantas (PGPF) e as rizobactérias promotoras do crescimento das plantas (PGPR) são grupos de fungos / bactérias de rizosfera de vida livre que colonizam os sistemas radiculares e exercem efeitos benéficos sobre o crescimento e o rendimento das plantas. Esses grupos estimulam a defesa das plantas a uma ampla gama de agentes patogênicos, um processo conhecido como resistência sistêmica induzida (ISR) (NAZNIN et al., 2014).

O indutor biótico é um microrganismo benéfico não-patogênico presente na rizósfera das raízes das plantas, que desempenha um papel importante na melhoria do crescimento e proteção das plantas. Este indutor tem mecanismos diferentes de elicitação que podem induzir a resistência sistêmica nos hospedeiros contra agentes patogênicos através da produção de algumas enzimas, polisacáridos, hormônios e metabólitos secundários entre outros, que atuam como estímulos internos, o que desempenha um papel de ativação dos genes de resistência.

*Trichoderma* spp. é um fungo simbiote de planta que induz o crescimento e a resistência a uma grande variedade de fitopatógenos (BROTMAN et al., 2013). Foi relatado que alguns *Trichoderma* spp., podem estimular ISR em culturas através de moléculas de sinalização, como JA, ET e SA, e agir como defesa em plantas com doenças causadas por agentes patogênicos biotróficos ou necrotróficos, tais como como *S. sclerotiorum*, *Erysiphe cruciferarum*, *Fusarium verticillioides* e *B. cinerea* entre outros (HERMOSA et al., 2012).

Para a indução são necessários compostos elicitores que podem ser biológicos (derivada de plantas ou microorganismos) ou sintética, como ácido beta-amino-butírico (BABA), cis-jasmona e acibenzolar-S-metil (ASM) (WALTERS et al., 2013). As plantas geralmente reconhecem três tipos de elicitores químicos: Padrões moleculares associados a micro-organismos benéficos (MAMPs) liberados por estes, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) liberados por microorganismos patogênicos e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) produzidos por plantas em lesões por insetos herbívoros ou mesmo durante a degradação microbiana (HENRY et al., 2012; NEWMAN et al., 2013). Essas moléculas acima mencionadas são reconhecidos pelas plantas através de receptores de reconhecimento de padrões transmembranares (PRRs) (JONES; DANGL, 2006; MAFFEI et al., 2012; NEWMAN et al., 2013). Após o reconhecimento, a defesa das plantas é ativada. Essa estimulação da reação de defesa estimula a planta através do mecanismo de indução de resistência sistêmica (HENRY et al., 2012).

A proteção fornecida por isolados de *Trichoderma* spp. que estimulam o ISR nos hospedeiros pode ser tão eficaz a os fornecida por materiais químicos ou fungicidas (HOITINK et al., 2006). Além disso, filtrados de cultura sem células (CF) de *Trichoderma* spp. podem melhorar a SAR em plantas, estimulando moléculas de sinalização contra uma variedade de agentes patogênicos.

## **2.7. Proteínas relacionadas à indução de resistência**

As proteínas relacionadas a resistência de plantas são conhecidas como PR-Proteínas, termo utilizado primeiramente para descrever numerosas proteínas extracelulares que se acumulavam em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum*) infectadas com o vírus do mosaico do fumo (TMV) (VAN LOON; VAN KAMMEN, 1999). Algumas dessas PR-Proteínas encontram-se expressas, em baixos níveis, de forma constitutiva em plantas, ou seja, sob condições normais. Entretanto, seus níveis são aumentados quando as plantas são submetidas a condições de estresses. Há outras que, embora não sejam detectadas em condições fisiológicas normais, têm seus genes correspondentes ativados, vindo a ser detectadas nos tecidos vegetais após injúria, após o ataque de patógenos e/ou pragas e sob condições de estresses ambientais do tipo salinidade, seca e baixas/altas temperaturas (MARTINS-MIRANDA, 2002).

As PR-proteínas formam um diverso grupo de proteínas presentes em pequenas quantidades, porém, são altamente sintetizadas em resposta ao ataque de patógenos. São classificadas de acordo com suas funções e propriedades, se apresentam extremamente ácidas ou extremamente básicas e, por isso, são altamente solúveis e reativas. Dentre as suas diversas funções, algumas proteínas-PR induzem a síntese de etileno, enquanto outras induzem a produção de enzimas oxidativas e proteínas envolvidas na modificação e reforço da parede celular. Elas também podem sintetizar compostos antimicrobianos, tais como as fitoalexinas, ou

destruir os componentes da parede celular do patógeno, ou serem inibidoras de proteases, que neutralizam enzimas específicas do patógeno (AGRIOS, 2005).

Dentre as 14 famílias de proteínas-PR, as mais conhecidas são as PR1 (antioomicetos e antifúngicas), as PR2 ( $\beta$ -1,3-glucanases), as PR3 (quitinases), as PR4 (antifúngicas) e PR6 (inibidoras de proteases), dentre outras como defensinas, tioninas, lisozimas, lipoxigenases, proteinases, quitosanases e peroxidases. (AGRIOS, 2005). A indução de proteínas-PR pode estar relacionada à patogênese por infecções ou por agentes químicos ou ambientais. As alterações nas atividades dessas enzimas-chave permitem acompanhar o estado de indução de resistência em plantas expostas a patógenos (MACAGNAN et al., 2008). Entre essas enzimas, estão as lipoxigenases, as peroxidases, a fenilalanina amônia-liase, as  $\beta$ -1,3-glucanases e as quitinases (BAYSAL; DEMIRDOVEN, 2007).

As lipoxigenases vegetais utilizam ácido linolênico ou ácido linoleico como substrato e estão envolvidas na biossíntese de compostos regulatórios, tais como o ácido traumático e ácido jasmônico (Anderson et al., 1989; Farmer e Ryan, 1992; Bunker et al., 1995). As lipoxigenases ocorrem em várias partes da planta, onde desempenham várias funções e processos como: crescimento e desenvolvimento, resistência a insetos e patógenos, germinação de sementes dentre outras (CHRISTENSEN; KOLOMIETS, 2011). A relação estrutura/função desempenhada pelas enzimas lipoxigenases não está completamente elucidada e por isso são muito importantes, (BATISTA et al., 2002).

As lipoxigenases catalisam a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, o que origina compostos voláteis e o regulador traumatina, entre outros, envolvidos no crescimento, na maturação, na senescência e em respostas de defesa das plantas (BAYSAL; DEMIRDOVEN, 2007). Nas plantas as lipoxigenases são particularmente interessantes no contexto de patógenos micóticos micotoxígenos, porque há evidências crescentes de que a sinalização de oxilipina está envolvida tanto na patogênese quanto na estimulação da produção de micotoxinas (TSITSIGIANNIS; KELLER, 2007). As oxilipinas são uma classe diversificada de ácidos graxos oxigenados, derivados da via das lipoxigenases (GAO; KOLOMIETS, 2009). Suas funções relacionadas à defesa estão bem caracterizadas, mas há evidências de que as lipoxigenases da planta desempenham um papel essencial na susceptibilidade do hospedeiro à contaminação por micotoxinas (CHRISTENSEN; KOLOMIETS, 2011).

As peroxidases são glicoproteínas antioxidantes que catalisam a oxiredução entre  $H_2O_2$  e vários agentes redutores. São capazes de catalisar grande número de reações, como a produção ou catálise de  $H_2O_2$  (CHOI et al., 2007), formação de lignina e suberina (QUIROGA et al., 2000), além de estarem envolvidas nos processos de senescência (VELJOVIC-JOVANOVIC et al., 2006), germinação de sementes (SCHOPFER; PLACHY; FRAHRY, 2001) e florescimento (LOKHANDE et al., 2003). As peroxidases oxidam substratos orgânicos por meio da eliminação do peróxido de hidrogênio, espécies reativas de oxigênio e acceptora de



elétrons. Além disso, essas enzimas participam do crescimento e do desenvolvimento vegetais, da destoxificação celular e de mecanismos de defesa como lignificação, cicatrização de ferimentos e oxidação de compostos fenólicos (BAYSAL; DEMIRDOVEN, 2007).

Ocorrendo em plantas, animais e microrganismos, esses catalizadores possuem inúmeras funções que variam de acordo com o grupo taxonômico. Alguns de seus papéis são: oxidação de fenóis, ligação de polissacarídeos e defesa contra patógenos; estas também têm sido aplicadas em análises clínicas, na espectrofotometria de biomoléculas e em imunoenaios (HAMID; REHMAN, 2009). De acordo com suas propriedades estruturais e catalíticas, as peroxidases são classificadas em três superfamílias: peroxidases animais, catalase e peroxidases vegetais. As peroxidases vegetais estão subdivididas em três classes. A classe I é constituída por enzimas intracelulares, como a citocromo-C-peroxidase de plantas, bactérias e leveduras; e a ascorbato-peroxidase. A classe II é formada por enzimas extracelulares de fungos, como a lignina-peroxidase. A classe III é constituída por peroxidases que são secretadas no apoplasto ou acumuladas no vacúolo, apresentam uma ampla variedade de substratos e são responsáveis pela maioria das reações de oxiredução estimuladas pelas variações ambientais, ferimentos ou reações infecciosas (HIRAGA et al., 2001).

A atividade desta enzima pode ser alterada em função da resistência ou suscetibilidade de diferentes hospedeiros na presença de diferentes patógenos. Além disso, parecem ter um papel importante na indução de resistência, atuando como um mecanismo de defesa contra patógenos. As principais funções das peroxidases não foram bem esclarecidas. Estudos das alterações provocadas pela indução de estresses fisiológicos podem contribuir para a melhor compreensão da ação específica das isoformas da GPX (BOUDJEKO et al., 2005).

A fenilalanina amônia-liase é um importante intermediário na formação da maioria dos compostos fenólicos, situada nas ramificações entre os metabolismos primário e secundário, é a enzima responsável pela catalisação dessa etapa reguladora. A atividade é aumentada em condições de estresse. Esse aumento provoca aumento na concentração de compostos fenólicos, os quais são substratos das enzimas oxidativas. Esta enzima é fundamental na biossíntese de fenilpropanóis e participa da síntese de monômeros de lignina, ácido salicílico, fitoalexinas e flavonoides (GERASIMOVA et al., 2005). É uma das principais enzimas que atuam na formação dos precursores da lignina, a qual atua na resposta de defesa das plantas por reforçar as paredes celulares contra invasão dos patógenos, catalisando a fenilalanina a ácido trans-cinâmico (RAES et al., 2013).

A atividade da fenilalanina amônia-liase aumenta em resposta a diferentes tipos de estresse, especialmente ao estresse térmico, sendo considerada por muitos autores como “proteína do estresse”, relacionando-se com desenvolvimento de mecanismos de proteção e adaptação de plantas a situações adversas (CHAKRABORTY et al., 2008), sendo influenciada por vários fatores externos e internos, como: hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por patógenos e ferimentos. A invasão de fungos, por exemplo, induz a

transcrição do mRNA que codifica para essa enzima, aumentando assim sua síntese e, conseqüentemente, estimulando a produção de compostos fenólicos (SILVA et al., 2006)

As quitinases são endoglicosil-hidrolases que clivam de forma específica as ligações glicosídicas da quitina, um homopolissacarídeo linear formado por unidades de 2-acetamida- 2-desoxi-D-glicose (N-acetil-D-glucosamina) unidas por ligações do tipo  $\beta$ -[1-4], encontradas principalmente nas carapaças de crustáceos, cutículas de insetos e na parede celular de fungos. Depois da celulose, este é o biopolímero mais abundante na natureza (ADRANGI; FARAMARZI, 2013)

As quitinases estão distribuídas por entre duas numerosas famílias de glicosil-hidrolases (famílias 18 e 19), que diferem em relação às suas estruturas primárias e terciárias e ao mecanismo de catálise. As quitinases da família 18 formam produtos  $\beta$ -anoméricos, através de um mecanismo de retenção, enquanto as enzimas da família 19 formam produtos  $\alpha$ -anoméricos, por um mecanismo de inversão (BOLDO et al., 2009). As quitinases constituem um importante grupo de enzimas associadas à hidrólise de quitina e possuem diversas funções na natureza como associação aos mecanismos de defesa, nutrição e morfogênese numa ampla diversidade de organismos (SUGINTA et al., 2009). Nas plantas, estão envolvidas nos mecanismos de resistência a fungos, insetos e outros fitopatógenos, evitando assim o surgimento de doenças (AJIT et al., 2006).

As quitinases são expressas constitutivamente em níveis relativamente baixos em todos os órgãos e tecidos das plantas, compartimentalizadas no vacúolo e apoplasto. As quitinases de plantas fazem parte do grupo de proteínas-PR, capazes de induzir resistência, local ou sistêmica, ao ataque de fungos e outros fitopatógenos (DEVAPPA et al., 2010). Posteriormente, descobriu-se que as proteínas-PR (incluindo as quitinases) são também induzidas por vários outros estresses, como estiagem, salinidade, danos mecânicos, metais pesados e reguladores do crescimento vegetal. (PUNJA et al., 1993). As quitinases constituem até 50% das proteínas solúveis em uvas (*Vitis vinifera*). Danos mecânicos aos tecidos da planta, ocasionados por fungos ou mastigação por insetos, provocam a liberação de uma variedade de hormônios vegetais, como etileno, que juntamente com o ácido salicílico estimulam a produção de quitinase. Durante o amadurecimento as uvas produzem níveis relativamente elevados de quitinase, provavelmente como uma forma de proteção contra o aumento da suscetibilidade de ataques por fungos, devido ao aumento da concentração de açúcares e ao amaciamento da casca do fruto. As quitinases parecem ter um papel direto na defesa do vegetal ao hidrolisar os polímeros de quitina, o principal componente da parede celular da maioria dos fungos (LI et al., 2010).

As quitinases catalisam a hidrólise das ligações  $\beta$ -1,4 das N-acetilglicosaminas, que constituem a quitina das paredes celulares dos fungos. Já as  $\beta$ -1,3-glucanases (EC 3.2.1.6) hidrolisam  $\beta$ -1,3-glucanas das paredes celulares e dos esporos de fungos (WU; BRADFORD, 2003). Em plantas, as quitinases e as  $\beta$ -1,3-glucanases são pouco expressas constitutivamente, mas prontamente induzidas sob estresse (WU; BRADFORD, 2003). A maioria libera oligômeros compostos por duas a seis unidades de glicose pela ação

hidrolítica sobre  $\beta$ -1,3-glucana, laminarina (extraída da alga *Laminaria* sp.) ou curdlan (extraído de *Alcaligenes faecalis*) (MARTINS, 2008). Essas enzimas já foram encontradas em plantas (NAZEEM et al., 2008), algas (CORDEIRO et al., 2006) fungos (EL-KATATNY et al., 2001), bactérias (LIN et al., 2009),

Os vegetais apresentam quatro classes estruturais de  $\beta$ -1,3 glucanases que se diferenciam na estrutura e sequência de aminoácidos. A classe I é composta por proteínas básicas, localizadas no vacúolo e com massa aproximada de 33 kDa. As proteínas das classes II e III são básicas e encontradas no apoplasto, bem como possuem entre 34 e 36 kDa, além de duas isoformas da classe II com 41 kDa expressas em flores de plantas de fumo. A classe IV é composta por apenas uma proteína extracelular, que é localizada em anteras de flores de plantas de fumo e tem a função de degradar a calose durante o desenvolvimento do grão de pólen (LEUBNER-METZGER, 2003).

A  $\beta$ -1-3-glucana é componente da parede celular das plantas e da parede de fungos patógenos, por isso, esta enzima tem sido de interesse em estudos envolvendo as interações planta- fungo e seu uso como marcadores bioquímicos para resistência a doenças. Em inoculações com *P. palmivora* em diferentes genótipos de citros, verificou-se que a atividade da  $\beta$ -1-3-glucanase foi alterada em folhas e raízes das plantas infectadas (ULBRECHT; BOWMAN, 2007).

Outro mecanismo ativado na planta como resposta ao ataque dos patógenos é representado pelo estresse oxidativo, o qual é um tipo de resposta fisiológica da planta logo após o reconhecimento do patógeno. Neste tipo de resposta, temos as espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species - ROS), como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila (OH), que são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares, bem como nos eventos de sinalização durante as interações planta-patógeno (HEISER; OSSWALD, 2008).

### 3. Metodologia

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Enzimologia da UFG e na Embrapa Arroz e Feijão, foram utilizados três isolados do fungo *T. harzianum* o ALL 42 cepa silvestre, linhagem mutante de *T. harzianum* *Aquo*, sendo que esta superexpressa a proteína aquaporina e a linhagem mutante de *T. harzianum*  $\Delta Epl-1$ , este gene está envolvido no processo de microparasitismo contra fungos fitopatogênicos, e ainda plantas controles sem a inoculação de isolados de *Trichoderma* e *S. sclerotiorum*.

Os isolados de *Trichoderma* mutantes são oriundo de outros trabalhos desenvolvidos por este grupo de pesquisa, sendo que a construção do vetor e transformação da linhagem mutante do *T. harzianum* *aquo*, foram feitas via biobalística, por bombardeamento, micropartículas de tungstênio M5 contendo 5  $\mu$ g do vetor de superexpressão foram preparadas de acordo com ARAGÃO et al., (2002).

Já para a linhagem mutante de *T. harzianum*  $\Delta Epl-1$ , inicialmente foram selecionados para análise os genes que codificam às proteínas Epl-1 (ID da Proteína: 508110) e Exoglucanase (ID da Proteína: 129594) de *T. harzianum*, baseado em dados preliminares obtidos pelo grupo, como determinar o papel da proteína Epl-1 no processo de micoparasitismo, indução de resistência em plantas e produção de compostos bioativos com a finalidade de desenvolver linhagens e produtos mais eficientes no combate a fitopatógenos. As linhagens *Knockout* foram geradas a partir da linhagem selvagem de *T. harzianum* utilizando os oligonucleotídeos para deleção do gene Epl-1, a transformação dos fungos foi conduzida por geração de protoplasto como descrito por GRUBER et al., (1990).

As sementes utilizadas para o plantio são da cultivar estilo, nestas foram inoculadas suspensão de esporos dos isolados citados acima, para o controle também foram cultivadas plantas sem a inoculação da suspensão de esporos nas sementes. As sementes foram semeadas em vasos de 5 litros com solo, as plantas foram coletadas no estágio R5 quando estão florescendo no quadragésimo sétimo dia.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com 5 repetições para análises fisiológicas e enzimáticas. Os dados foram submetidos separadamente à análise de variância. Quando se observou diferença significativa pelo F-teste (5%), foi realizado o teste Duncan (5%) para a separação de médias.

### 3.1.Obtenção do inóculo

As linhagens de *Trichoderma* utilizados nos ensaios, foram cultivados em grãos de arroz parboilizado em Erlenmeyer (250 mL) umedecidos com água destilada a 60 % e autoclavados (121° C; 40 min). Os frascos serão mantidos em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12 horas durante sete dias. Foram preparadas suspensões de esporos com uma concentração de  $2 \times 10^9$  conídios viáveis.mL<sup>-1</sup>, obtidas após a lavagem do arroz com água destilada (Figura: 1).



**Figura 1:** Isolados inoculados em arroz e suspensão dos esporos de *T. harzianum*.

### 3.2. Produção das plantas em casa de vegetação

As sementes de feijão para o plantio foram fornecidas pela Embrapa Arroz e Feijão, sendo que nestas foram feitos testes de sanidade. As sementes foram imersas em uma suspensão de esporos, por 10 minutos, e depois expostas ao ar natural para secagem durante duas horas, em seguida serão plantadas (Figura: 2).



**Figura 2:** Vasos que foram semeados para produção das plantas em casa de vegetação.

### 3.3. Inoculação das plantas com o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*

A inoculação do patógeno foi feita no estágio de florescimento no 47º dia após o plantio, antes da inoculação, o isolado de *S. sclerotiorum* foi cultivado em meio de cultura BDA por três dias, a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , em fotoperíodo de 12 horas, de onde se obtiveram os discos de BDA com micélio. O método de inoculação consistiu em fixar uma ponteira de plástico de 1.000  $\mu\text{L}$ , preenchida com discos de BDA com micélio no pecíolo do 3º trifólio (Hoffman et al., 2002). O meio de cultura foi perfurado com a própria ponteira utilizada

para inoculação, que foi totalmente preenchida com os discos; desta forma, o micélio ficou em contato direto com a planta no local da inoculação (Figura: 3).



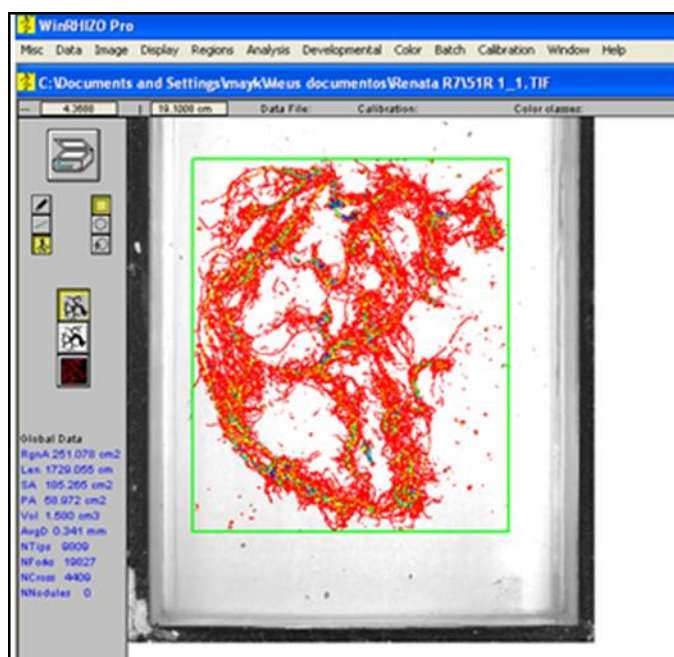
**Figura 3:** Plantas inoculadas com o patógeno *S. sclerotiorum*.

### **3.4. Obtenção e armazenamento das amostras**

As plantas foram coletadas por inteiro (parte aérea e radicular) e armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para análises bioquímicas e moleculares. As análises fisiológicas foram feitas logo em seguida a coleta.

### **1.5. Análises Fisiológicas da área foliar, sistema radicular e massa seca**

Para determinação da área foliar foi utilizado o medidor Area Meter modelo LI3100, as análises da morfologia do sistema radicular, sendo feita por meio do sistema WinRHIZO Pro 2007 a (Régent Instr. Inc.), acoplado a um scanner profissional Epson XL 10000 equipado com unidade de luz adicional (TPU) (Figura: 4).



**Figura 4:** Raiz de feijão comum no estádio R5 escaneada pelo programa WinRHIZO pro 2007.

As raízes foram dispostas em uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento, com uma lâmina de água de aproximadamente um centímetro, que permite a aquisição de imagens de raízes lavadas e medição do comprimento, diâmetro, superfície e volume da raiz. Para obtenção da massa seca, as amostras serão submetidas à secagem em estufa regulada 60 °C, por aproximadamente 72hs.

## 1.6. Ensaios Enzimáticos

A dosagem da atividade da enzima  $\beta$ -1,3-glicanase foi efetuada em meio reacional, composto de 50  $\mu$ L de extrato bruto das folhas das plantas e laminarina 1% em tampão acetato de sódio 1,0 M com pH 4,5 a qual foi incubada a 35°C. Trabalhou-se em condições de velocidade inicial de reação. A quantificação do produto da reação deu-se através do método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) 1%, efetuando-se as leituras com auxílio de espectrofotômetro FENTO 600 Plus em comprimento de onda igual a 540 nm. Uma curva padrão de glicose foi elaborada. A atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de glicose em mg produzida em meio reacional por tempo em minuto e por miligrama de proteína ( $\text{mg de glicose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Um miligrama de glicose produzida por minuto foi definido como uma unidade (1U) de atividade enzimática.

A atividade da enzima peroxidase foi efetuada em meio reacional, composto de 10  $\mu$ L de extrato bruto das folhas das plantas, peróxido de hidrogênio 0,5% e ácido 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic) (ABTS) 1,0 mM em tampão acetato de sódio 1,0 M com pH 4,5 a qual foi incubada a 30°C. Trabalhou-se em condições de velocidade inicial de reação. A quantificação do produto reacional foi efetuada em espectrofotômetro Spectrum SP-2000UV em comprimento de onda igual a 405 nm. As concentrações do

produto da reação foram estimadas pela utilização do coeficiente de extinção molar do produto ( $3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). A atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de produto em  $\mu\text{mol}$  produzida em meio reacional por tempo em segundos e por miligrama de proteína ( $\mu\text{mol de ABTS}^* \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Um  $\mu\text{mol}$  de  $\text{ABTS}^*$  produzido por segundo foi definido como uma unidade (1U) de atividade enzimática.

A dosagem da atividade da enzima quitinase também foi efetuada em meio reacional, composto de 50  $\mu\text{L}$  de extrato bruto das folhas das plantas, solução de quitina 0,25% 1,0 mM em tampão acetato de sódio 1,0 M com pH 4,5 a qual foi incubada a  $35^\circ\text{C}$ . Trabalhou-se em condições de velocidade inicial de reação. A quantificação do produto da reação deu-se através do método do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) 1%, efetuando-se as leituras com auxílio de espectrofotômetro FEMTO 600 Plus em comprimento de onda igual a 540 nm. Uma curva padrão de glicose foi elaborada. A atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de glicose em mg produzida em meio reacional por tempo em minutos e por miligrama de proteína ( $\text{mg de glicose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ). Um miligrama de açúcar redutor produzido por minuto foi definido como uma unidade (1U) de atividade enzimática.

Atividade de fenilalanina amônia-liase amônia-liase amônia-liase foi realizada com um composto de extrato bruto de folhas de plantas homogeneizado em tampão borato de sódio (pH 8,8) e em 20 mM de L-fenilalanina, a absorbância dos derivados do ácido trans-cinâmico foi medida em espectrofotômetro a 290 nm.

A atividade de lipoxigenase foi medida por espectrofotômetro usando ácidolínolico (10mM) como substrato, segundo metodologia adotada por Rangel e colaboradores (2002). Por este método foi quantificado o aumento da absorbância a 234 nm, resultante da formação de um sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado. Uma unidade de atividade de lipoxigenase foi definida como a quantidade de enzima que gera 1  $\mu\text{mol}$  de hidroperóxidos por minuto.

#### 4. Resultados e Discussão

Na interação planta, patógeno e *Trichoderma* não apresentou diferença em relação a planta e *Trichoderma*, dos quatro tratamentos analisados, ou seja, o patógeno não influenciou na promoção do crescimento das plantas.

O tratamento *Aquo* promoveu um aumento de 25% na área foliar das plantas em relação ao controle, e se diferencia significativamente dos demais tratamentos, em relação as plantas com tratamentos *All42* e *ΔepI-1* aumentou 28% e 91%, respectivamente. O controle apresentou uma área foliar 2,3% maior do que as plantas com o tratamento *All42* e 54% maior do que as plantas com o tratamento *ΔepI-1*.



O comprimento radicular foi maior 40% em relação ao controle nas plantas com os tratamentos *Aquo* e All42, e não apresentaram diferença significativa entre si. Nas plantas com o tratamento  $\Delta epl-1$  o comprimento radicular foi 65% menor em relação ao controle e 131% menor em relação aos demais tratamentos.

O volume radicular das plantas com o tratamento *Aquo* foi maior 25%, 75% e 169%, quando comparados com as plantas com os tratamentos All 42, Controle e  $\Delta epl-1$ , respectivamente. As plantas com o tratamento All42 apresentaram um volume radicular maior 40% e as plantas com tratamento  $\Delta epl-1$  menor 67%, em relação as plantas controle.

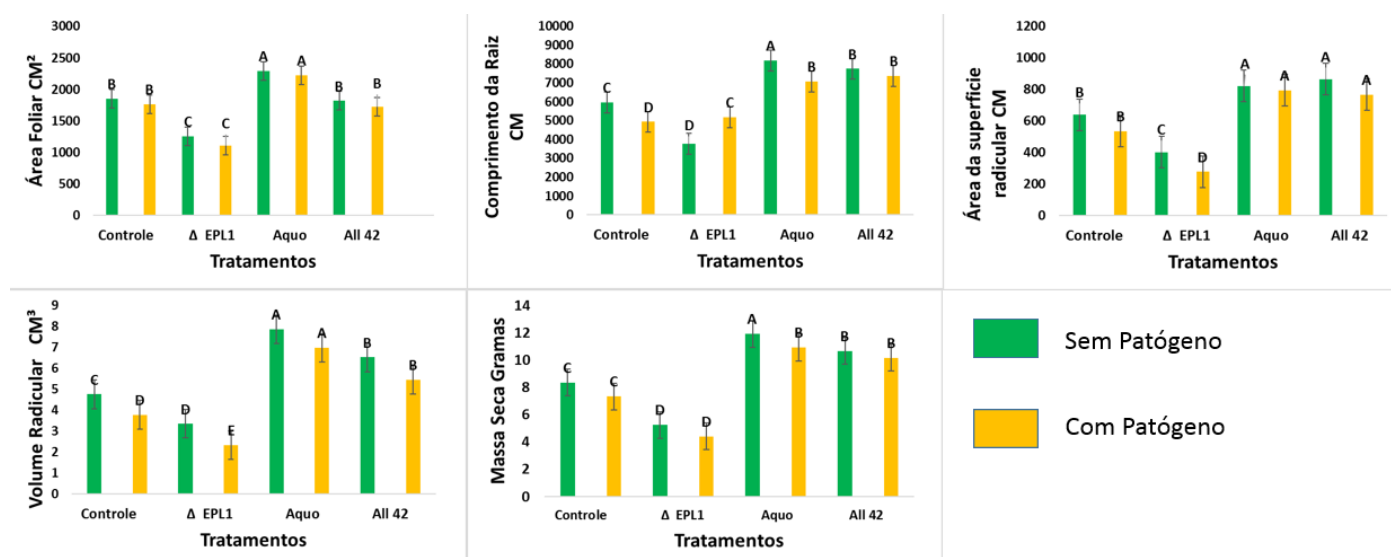
As plantas tratadas com o isolado All 42 e linhagem do mutante *Aquo* quando comparados não apresentam diferença significativa em relação a superfície radicular 815,63 cm<sup>2</sup> e 807,21 cm<sup>2</sup>. Apresentaram um incremento de 39% de superfície radicular das plantas com o tratamento All 42 e 37% da linhagem do mutante *Aquo*, quando comparados ao controle, e para as plantas tratadas com o isolado mutante  $\Delta epl-1$  foi menor 72%.

Quanto a massa seca os maiores resultados foram das plantas com o tratamento de linhagem do mutante *Aquo* de 11,42 gramas e para as plantas tratadas com o isolado All 42 10,43 gramas, e os menores resultados para as plantas tratadas com o isolado mutante  $\Delta epl-1$  4,83 gramas e controle com 7,83 gramas.

Pereira et al., 2014, observaram a interação entre *T. harzianum* com plantas hospedeiras de *Phaseolus vulgaris* na presença ou ausência dos fungos fitopatogênicos *F. solani* e *R. solani* e mostraram que o *Trichoderma* poderia promover o crescimento de plantas de feijão aumentando seu tamanho total, área foliar e radicular, e o número de raízes secundárias, bem como modificando sua arquitetura de sistema de raiz

*Trichoderma* spp. possui vários mecanismos para modular o crescimento e desenvolvimento das plantas, que, em combinação com o genótipo da planta, podem resultar em diferentes fenótipos de plantas, indicando que o genótipo *Trichoderma* também é importante para modular o fenótipo da planta (Salas-Marina et al., 2015).

Crescentes linhas de evidência têm mostrado que o efeito direto exercido por *Trichoderma* nas plantas é através da produção de fitohormônios, moléculas semelhantes a fito-hormônios, compostos orgânicos voláteis, metabólitos secundários, ou alterando a homeostase fitohormônica da planta (Salas-Marina et al., 2015; Olmedo-Monfil e Casas-Flores, 2014; Sáenz-Mata et al., 2014).



**Figura 5:** Efeito dos isolados de *T. harzianum* na Área foliar, Comprimento radicular, Volume radicular, Área da superfície e Massa seca em plantas de feijão comum sem o patógeno *S. sclerotiorum* e com patógeno *S. sclerotiorum*. Médias da mesma, não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de significância.

O crescimento é ocasionado por microrganismos ocorre devido à ação de vários fatores ainda pouco esclarecidos, envolvendo produção de fitohormônios, produção de vitaminas ou conversão de materiais a uma forma para a planta utilizar, absorção e transporte de minerais e controle de patógenos. Diversos estudos mostram o efeito benéfico de espécies de *Trichoderma* no desenvolvimento vegetal. Filho et al., 2008, concluíram que o isolado CEN 262 de *Trichoderma* spp. proporcionou maior índice de desenvolvimento em mudas de eucalipto. Estudos realizados com *Arabidopsis thaliana* investigaram o papel da auxina produzida e isolada de *Trichoderma* spp. na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta em resposta à inoculação de *T. virens* e *T. atroviride*, desenvolvendo um sistema de interação fungo-planta, o qual resultou em características fenotípicas relacionadas com a auxina, como o aumento da produção de biomassa e estimulação do desenvolvimento das raízes (CONTRERAS-CORNEJO, 2009).

Carvalho et al., 2011, fizeram um experimento onde foram utilizados seis isolados de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de plantas de feijão e observaram que quatro deles proporcionaram aumentos na massa de matéria seca da parte aérea das plantas entre 4,42 e 5,71%, alguns dos isolados *Trichoderma* utilizados neste trabalho também proporcionaram o aumento das plantas. Brotman et al., 2010, também utilizaram espécies de *Trichoderma* que promoveram aumentos de até 300% no crescimento de plantas. O efeito benéfico desses fungos tem sido relatado no desenvolvimento de várias culturas de importância, como mamoeiro, tomateiro, soja, milho, pepineiro, pimentão e eucalipto (CARVALHO et al., 2008; TAVARES, 2009; FONTENELLE et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Chagas et al., 2017, trabalharam com diferentes culturas como: milho, arroz, soja e feijão caupi, a inoculação de *T. asperellum* UFT 201 foi superior para as características de biomassa, mostrando o potencial como promotor de crescimento, com aumento acima de 60% em relação à testemunha, para todas as culturas, estes resultados corroboram com os reportados neste trabalho.

Segundo Baugh e Escobar 2007, a ação de *Trichoderma* como estimulador do crescimento é complexa e realizada por interações com fatores bioquímicos e produção de diversas enzimas e compostos benéficos para as plantas. Neste estudo a característica de promoção de crescimento pode ser observada.

Pedro et al., 2012, avaliando a capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. em promover o crescimento de plantas de feijão e reduzir a severidade da antracnose do feijoeiro observaram que os isolados mais eficientes podem proporcionar aumentos superiores a 30% na produção de matéria seca da parte aérea das plantas.

A atividade específica da enzima  $\beta$  1,3 glucanase foi maior em plantas tratadas com o isolado mutante de *T. harzianum*  $\Delta Epl-1$ , em folha e raiz com 2,07  $Umg^{-1}$  e 2,57  $Umg^{-1}$  (tabela 1), com e sem inoculação de *S. sclerotiorum* apresentou com 2,27  $Umg^{-1}$  e 2,34  $Umg^{-1}$  (tabela 3 e 4), respectivamente, apresentado um resultado significativo na folha em relação aos demais tratamentos. Na raiz a diferença significativa apareceu apenas em relação ao controle, não apresentou diferença em relação ao isolado silvestre, este resultado também foi observado em plantas com patógenos, a deleção de EPL1 e a superexpressão da proteína aquaporina não afetou a atividade específica da enzima  $\beta$  1,3 glucanase. O que aconteceu também com a atividade específica de quitinase, que não apresenta variação entre as plantas inoculadas com isolados mutantes e silvestres.

Tentativas de explorar o antagonismo de fungos, tais como espécies de *Trichoderma* com potencial biológico, recentemente levaram à proposta de que além de suas propriedades antifúngicas reconhecidas. Tais organismos podem também ser usados como eliciadores de reações de defesa de plantas, promovendo a expressão de produtos relacionados à defesa de plantas (LORITO et al., 2010).

A glucanase é uma importante enzima de defesa, particularmente contra os oomicetos, uma vez que possuem celulose e glucana como principais componentes da parede celular. Nossos resultados se correlacionam com estudos anteriores que mostraram níveis aumentados de glucanase durante a indução mediada por *Trichoderma* em muitos sistemas patógenos-hospedeiros. Resistência induzida por *Trichoderma* contra *Phytophthora capsici* em pimenta e resistência induzida por *Trichoderma roseum* contra *Macrophomina phaseolina* em grão-de-bico foi associada com atividades aumentadas de glucanase em um trabalho feito por Vieira, 2013.

Não houve diferença significativa entre plantas tratadas com o isolado mutante de *T. harzianum*  $\Delta epl-1$  e *Aquo*, na atividade enzimática de quitinase na folha foi 2,03  $Umg^{-1}$  e 1,93  $Umg^{-1}$  e na raiz 2,51  $Umg^{-1}$  e

2,48 Umg<sup>-1</sup>, (tabela 1) respectivamente, apresentando assim as maiores atividades enzimática, estes tratamentos nas plantas com e sem inoculação de *S. sclerotiorum* também não apresentaram diferença significativa entre si, com patógeno (2,24 Umg<sup>-1</sup> e 2,22 Umg<sup>-1</sup>) sem patógeno (2,30 Umg<sup>-1</sup> e 2,18 Umg<sup>-1</sup>), no entanto, em relação ao controle apresentaram variação significativa (tabela 3 e 4).

Segundo Saksirirat et al., 2009, trabalhando com quinze isolados de *Trichoderma* spp. para controlar *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* houve uma diminuição de 69,32% dos sintomas, observou que quatro isolados das espécies *T. harzianum* e *T. asperellum*, induziram atividade de quitinase nas folhas, mostrando que essas espécies são promissoras para a indução de resistência em plantas de tomate. Os mesmos autores, relatam que esta enzima é conhecida por desempenhar um papel importante na degradação da parede celular do fungo. Além disso, estão relacionados a proteínas relacionadas à patogênese (proteínas PR) em diversas plantas, incluindo o feijão.

As atividades enzimáticas das enzimas peroxidase e lipoxigenase não apresentaram diferença significativa na folha em relação aos outros tratamentos, já na raiz e em plantas com e sem patógenos o controle apresentou maiores resultados, peroxidase (0,86 Umg<sup>-1</sup>, 0,74 Umg<sup>-1</sup> e 0,83 Umg<sup>-1</sup>) lipoxigenase (1,41 Umg<sup>-1</sup>, 1,35 Umg<sup>-1</sup> e 1,22 Umg<sup>-1</sup>), propondo assim que o isolado *Trichoderma* nestas condições não tem efeito na atividade específica da enzima peroxidase (tabela 2,3 e 4).

Resultados semelhantes para atividade de peroxidase foram obtidos por Silva et al., (2011), que observou o efeito de 60 isolados de *Trichoderma* spp. na indução de resistência sistêmica à antracnose em plantas de pepino. Eles não encontraram diferença significativa em relação à ativação da enzima peroxidase na planta.

Este trabalho apresentou médias inferiores a do controle, o que evidencia supressão da atividade enzimática da peroxidase ocasionadas pela ação dos isolados de *Trichoderma*. Corroborando com estes resultados, Dildey et al., 2013, não observaram atividade de indução da enzima peroxidase em feijoeiro contra o patógeno *Macrophomina phaseolina*, na inoculação via semente de diferentes isolados de *T. harzianum*.

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

As plantas tratadas com isolado mutante de *T. harzianum*  $\Delta$ *epl-1* apresentaram maiores atividades da enzima fenilalanina anônia liase com 1,47 Umg<sup>-1</sup> na folha, no entanto, não apresentou diferença significativa em relação ao controle, na raiz e em plantas com e sem inoculação de patógeno mostraram maiores índices de

atividades enzimáticas no controle (1,09 U $mg^{-1}$ , 1,31 U $mg^{-1}$  e 1,59 U $mg^{-1}$ ), estas plantas possivelmente não apresentam indução na produção da enzima fenilalanina amônia liase (tabela 2, 3 e 4).

A fenilalanina amônia liase está bem estabelecida como uma importante enzima de defesa de plantas induzida pelo tratamento com *Trichoderma* em vários modelos de patógenos hospedeiros. A enzima fenilalanina amônia liase foi significativamente aumentada durante a indução da resistência do hospedeiro por espécies de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani* em girassol e *F. oxysporum* e *A. alternata* em um trabalho feito por Surekha, 2014. Estes resultados não corroboram com os encontrados neste trabalho.

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

Ribas et al., 2016, ao tratar plantas de feijoeiro com isolados de *Trichoderma* spp., visando a indução de resistência, observou que dentre estes o *T. harzianum* ICB05 foi o que mais se destacou, promovendo um notório aumento na atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase, resultados contários aos encontrados no presente estudo.

Em nosso estudo, atividade da enzima peroxidase com 0,84 U $mg^{-1}$  na raiz apresentou maiores níveis com a presença do patógeno, a atividade da enzima lipoxigenase foi maior na folha sem patógeno com 1,26 U $mg^{-1}$  e da enzima fenilalanina amônia liase na raiz com 1,03 U $mg^{-1}$ , os demais tratamentos não resultaram em diferenças significativas nos níveis de atividade das enzimas quando relacionado com a presença e ausência da *S. sclerotiorum* (Tabela 4).

Os resultados mostraram que as plantas com a inoculação de *S. sclerotiorum* registraram um aumento da atividade de peroxidase. As enzimas relacionadas a defesa, especialmente a peroxidase, contêm a disseminação do patógeno através da formação de barreiras fenólicas polimerizadas próximo aos locais de infecção e desencadeiam a síntese de compostos anti-nutritivos, antibióticos e citotóxicos, acarretando a uma resistência aumentada contra patógenos (LI E STEFFENS, 2002). Diversos trabalhos têm enfatizado o papel da peroxidase na resistência induzida por *Trichoderma* em plantas cultivadas.

**Tabela 02:** Atividade específica das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, lipoxigenase e fenilalanina amônia liase, em amostras de folhas e raiz de feijoeiro comum.

Amostras	At. Esp. $\beta$ 1,3 glucanase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. de Quitinase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. Peroxidase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. Lipoxigenase Umg <sup>-1</sup>		At. Específica Fenilalanina Umg <sup>-1</sup>	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
<b>Controle</b>	1,86B	2,22B	1,78B	2,19B	0,71 <sup>a</sup>	0,86A	1,17A	1,41A	1,37A	1,09 A
<b>ALL 42</b>	1,85C	2,44 <sup>a</sup>	1,82B	2,42A	0,70 <sup>a</sup>	0,77B	1,20A	1,09B	1,28B	0,95 B
<b>EPL1</b>	2,07 <sup>a</sup>	2,54 <sup>a</sup>	2,03A	2,51A	0,72 <sup>a</sup>	0,79B	1,30A	0,81C	1,47A	0,91 B
<b>AQUO</b>	1,96B	2,50 <sup>a</sup>	1,93A	2,48A	0,71 <sup>a</sup>	0,76B	1,08A	1,02B	0,78C	1,05 A
<b>Coef. De Variação:</b>	4,46	4,01	4,38	3,94	0,46	5,25	8,77	9,73	8,24	5,64

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

**Tabela 03:** Atividade específica das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, lipoxigenase e fenilalanina amônia liase, em plantas de feijoeiro comum inoculadas e não inoculadas com *S. sclerotiorum*.

Amostras	At. Esp. $\beta$ 1,3 glucanase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. de Quitinase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. Peroxidase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. Lipoxigenase Umg <sup>-1</sup>		At. Específica Fenilalanina Umg <sup>-1</sup>	
	C/ Pat	S/Pat	C/ Pat	S/Pat	C/ Pat	S/Pat	C/ Pat	S/Pat	C/ Pat	S/Pat
<b>Controle</b>	2,03B	2,05C	1,99B	1,98C	0,74 <sup>a</sup>	0,83A	1,35A	1,22A	1,31A	1,59A
<b>ALL 42</b>	2,18 <sup>a</sup>	2,11B	2,15A	2,10B	0,73B	0,74B	1,27A	1,03B	1,16B	1,07B
<b>EPL1</b>	2,27 <sup>a</sup>	2,34 <sup>a</sup>	2,24A	2,30A	0,74 <sup>a</sup>	0,76B	1,08B	1,03B	1,20B	1,19A
<b>AQUO</b>	2,25 <sup>a</sup>	2,22B	2,22A	2,18B	0,71B	0,76B	0,99B	1,11B	0,95C	1,24A
<b>Coef. De Variação:</b>	3,80	4,02	3,82	3,85	2,82	4,80	9,99	7,49	6,95	7,70

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade; A sigla pat significa patógeno.

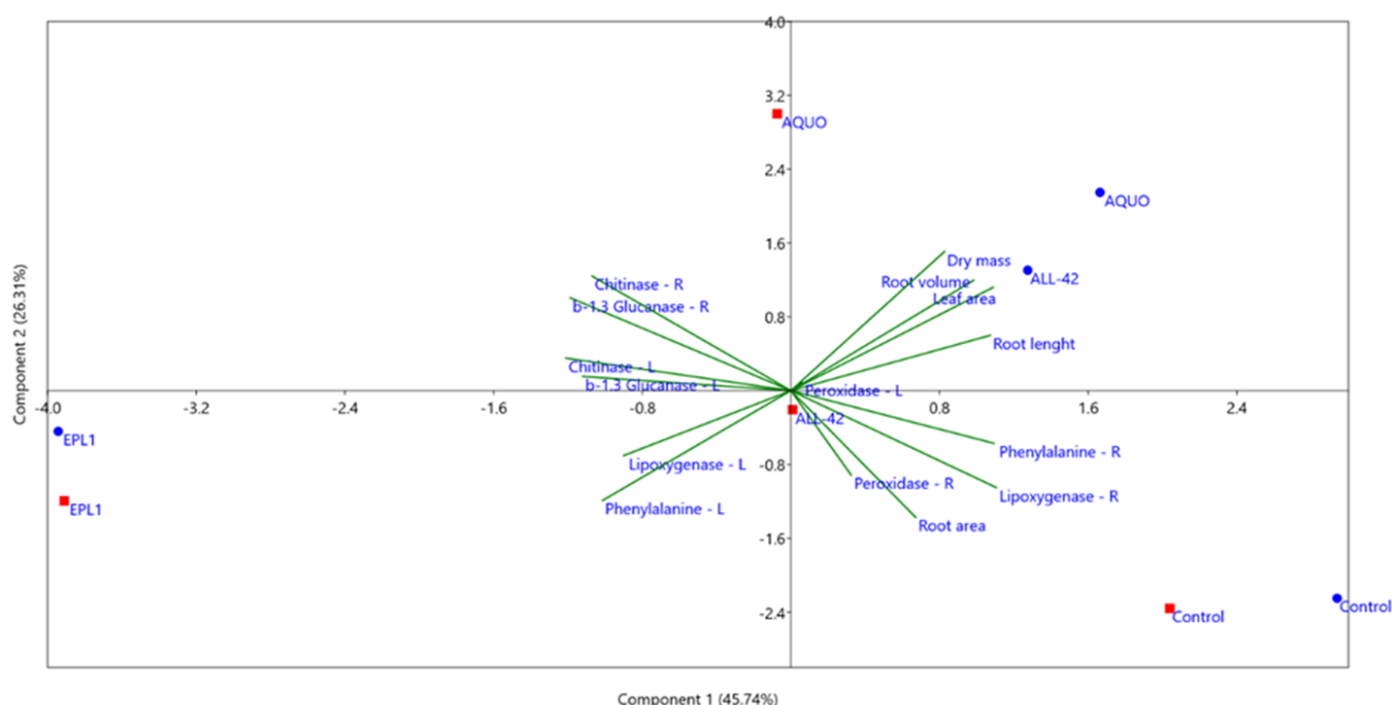
**Tabela 4:** Atividade específica das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, lipoxigenase e fenilalanina amônia liase, em folha e raiz de feijoeiro comum inoculadas ou não inoculadas com *S. sclerotiorum*.

Amostras	At. Esp. $\beta$ 1,3 glucanase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. de Quitinase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. Peroxidase Umg <sup>-1</sup>		At. Esp. Lipoxigenase Umg <sup>-1</sup>		At. Específica Fenilalanina Umg <sup>-1</sup>	
	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz	Folha	Raiz
<b>Com Patógeno</b>	1,92 A	2,44 A	1,89 A	2,41 A	0,72 A	0,84 A	1,12 B	1,09 A	1,34 A	0,97 B
<b>Sem Patógeno</b>	1,95 A	2,41 A	1,88 A	2,39 A	0,71 A	0,75 B	1,26 A	1,08 A	1,30 A	1,03 A

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

## Análise de componentes principais.

A análise de componentes principais revelou que os três primeiros componentes representaram 45,74%, 26,31% e 11,83% da variância, totalizando 83,88%. Responsável por grande parte da variação nos dados (Figura 6). Área foliar, comprimento radicular, volume da raiz, as enzimas fenilalanina amônia lase e lipoxigenase na raiz são responsáveis por uma grande variação nos dados. As variáveis relacionadas ao crescimento da planta como área foliar, comprimento e volume radicular foi negativamente correlacionada com a atividade enzimática da lipoxigenase e fenilalanina amônia lise na folha, quitinase e 1,3 glucanase na folha e raiz, tal correlação indica que a promoção do crescimento da planta e inversamente proporcional a atividade enzimática destas enzimas.



**Figura 6:** Análise de componentes principais (biplot) com características de promoção de crescimento de planta (Área foliar, Massa seca, volume radicular, comprimento radicular e superfície radicular) e enzimas relacionadas a indução de resistência no feijoeiro comum com *Trichoderma* e *S. sclerotiorum*.

## 5. Conclusão

O isolado mutante *T. harzianum aquo* demonstrou ter excelentes propriedades para promoção de crescimento.

Crescimento da planta é inversamente proporcional a atividade enzimática da planta.

Os isolados mutantes não induzem a resistência nas plantas de feijoeiro;



A presença dos patógenos também não induziram resistência nas plantas.

## 6. Referências Bibliográfica

ADRANGI, S.; FARAMARZI, M. A. From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 8, p. 1786-1795, Dec 2013.

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 20/01/2016.

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. 5. Ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 922 p., 2005.

AJIT NS, VERMA R, SHANMUGAM V. Extracellular chitinases of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi causing carnation wilt. *Curr. Microbiol.* 52: p. 310-316, 2006.

ALKOORANEE JT, YIN Y, ALEDAN TR, JIANG Y, LU G, WU J. Systemic Resistance to Powdery Mildew in *Brassica napus* (AACC) and *Raphanus alboglabra* (RRCC) by *Trichoderma harzianum* TH12. *PLoS ONE*, 2015.

ALMEIDA, A.M.R.; PEREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V.; HENNING, C.V.; GODOY, L.M.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.C. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres. v. 2. cap. 64, p. 569-588, 2005.

AMIRY-MOGHADDAM, M.; OTTERSEN, O. The molecular basis of water transport in the brain. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 4, n. 12, p. 991–1001, dez. 2003.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. *Manual de Fitopatologia*. Piracicaba: Agronômica Ceres. v. 1, 4. Ed, p. 383-387, 2011.

ASSIS SILVA, S.; BUCKER MORAES, W.; SOARES DE SOUZA, G. Doses de cálcio no crescimento do feijoeiro cultivado em solução nutritiva na presença de alumínio. *Idesia, Arica*, v. 29, p. 53-58, 2011.

AZAD, A. K. et al., Characterization of four plasma membrane Aquaporins in tulip petals: a putative homolog is regulated by phosphorylation. *Plant & cell physiology*, v. 49, n. 8, p. 1196–208, ago. 2008.

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

BATISTA, R B. et al., Efeito da aplicação foliar de ácidos graxos na “via das lipoxigenases” de plantas de soja. *Quim. Nova.*, Viçosa, v. 25, n. 6, p. 914-920, jan., 2002.

BAYSAL, T.; DEMIRDOVEN, A. Lipoxygenase in fruits and vegetables: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.491-496, 2007.

BEAUVÉRIE, J. Le Botrytis cinerea et al maladie de la toile. *Les Comptes rendus de l' Academie des sciences Paris*. 128: 846-849, p. 1251-1251253, 1901.

BENGA, G. Water channel proteins (later called Aquaporins) and relatives: Past, present, and future. *Life*, 61(2), p. 112-133, 2009.

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

BETTIOL, W; MORANDI, M.A.B. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTILO,W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas, Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, p. 7-14, 2009.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 2, cap. 37, p. 333-349, 2005.

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

BLAIR MW, MUNOZ MC, PEDRAZA F, GAITAN E, TOHME J, MAIN D, FRISCH D, WING R: Generation of expressed sequence tags (ESTs) from vegetative tissues of a common bean (*Phaseolus vulgaris*) mapping parent, 2009.

BODDI S, COMPARINI C, CALAMASSI R, PAZZAGLI L, CAPPUGI G, SCALA A. Cerato-platanin protein is located in the cell walls of ascospores, conidia and hyphae of *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*. FEMS Microbiol Lett. 2004.

BOLDO J. T. et al., Endochitinase CHI2 of the biocontrol fungus *Metarhizium anisopliae* affects its virulence toward the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*. Curr Genet, v. 55, n. 5, p. 551-60. ISSN 1432-0983, 2009.

BOLTON, M.D.; THOMMA, B.P.H.J.; NELSON, B.D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. Molecular Plant Pathology, London, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2006.

BOSTOCK, R.M. Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. Physiological and molecular plant pathology, London, v.55, p.99-109, 1999.

BOTELHO, F. J. E.; GUIMARÃES, R. M.; OLIVEIRA, J. A.; EVANGELISTA, J. R. E.; ELOIIV, T. de A.; BALIZAI, D. P. Desempenho fisiológico de sementes de feijão colhidas em diferentes períodos do desenvolvimento. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 34, p. 900-907, 2010.

BOUDJEKO, T.; OMOKOLO, N.A., DRIOUICH, A.; BALANGÉ, A.P. Peroxidase and pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. Journal of Phytopathology, Berlin, v. 153, p. 409-416, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Desenvolvimento Agrário. Perfil do feijão do Brasil. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Desenvolvimento Agrário. Perfil do feijão do Brasil. Brasília, DF, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>.

BROTMAN Y, LANDAU U, CUADROS-INOSTROZA Á, TAKAYUKI T, FERNIE AR, CHET I. Correction: *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. PLoS Pathog, 2013.

BROTMAN, Y.; GUPTA, J.K.; VITERBO, A. *Trichoderma*. Current Biology, v.20, p.390-391, 2010.

- CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico. Ponta Grossa: UEPG, 178 p, 1999.
- CARVALHO FILHO, M.R.; MELLO, S.C.M. de; SANTOS, R.P. dos; MENÊZES, J.E. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético in vitro e colonização endofítica de mudas de eucalipto. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 13p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento, 226), 2008.
- CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção de crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. *Tropical Plant Pathology*, v.36, p.28-34, 2011.
- CHAGAS, L. F. B.; COLONIA, B. S. O.; SANTOS, G. R.; SCHEIDT, G. N.; PORTELLA A. C. F.; SOARES, L. P.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Rice growth influence by *Trichoderma* spp. with natural phosphate fertilization under greenhouse conditions. *International Journal of Development Research*, v. 07, n. 6, p. 13147-13152, 2017.
- CHAKRABORTY, U.; DUTTA, S. & CHAKRABORTY, B. Drought induced biochemical changes in Young tea leaves. *Indian Journal of Plant Physiology*, 6:103-106
- CHAVES, G.M. Estudo sobre *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Experientiae*, Viçosa, v. 4, n. 2, p. 69-133, 1964, 2008.
- CHEN, S. The RING finger ATPase Rad5p of *Saccharomyces cerevisiae* contributes to DNA double-strand break repair in a ubiquitin-independent manner. *Nucleic Acids Res* 33(18):5878-86, 2013.
- CHOI, H.W.; KIM, Y.J.; LEE, S.C.; HONG, J.K.; HWANG, B.K. Hydrogen peroxide generation by pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. *Plant Physiology*, Rockville, v. 145, p. 890-904, 2007.
- CHOUDHARY D. K. Plant growth-promotion (PGP) activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from soybean (*Glycine max* L. Merrill) plants against charcoal rot pathogen, *Macrophomina phaseolina*. *Biotechnol*, 2011.
- CHRISTENSEN SA. KOLOMIETS MV. The lipid language of plant-fungal interactions. *Fungal Genetics and Biology*. V 48:4-14, 2011.

CLARKSON, J. P. Ascospore release and survival in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mycological Research*, Cambridge, v. 107, n. 2, p. 213–222, 2003.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍASRODRÍGUES, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZBUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxindependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v.149, n.3, p.1579-1592, 2009.

CORDEIRO, R.A.; GOMES, V.M.; CARVALHO, A.F.U.; MELO, V.M.M. Effect of proteins from the red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux on the growth of human pathogen yeasts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 49, n. 6, p. 915-921, 2006.

COSTA, J.G.C. Feijão: morfologia. AGEITEC: Agência Embrapa de Informação Tecnológica, 2014.

D'AGOSTINO, F; MORANDI, MAB. Análise da viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o controle de fitopatógenos no Brasil. In: BETTIOL, W; MORANDI, MAB. *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas - Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente*, 341 p.2009.

DEVAPPA, R.K., MAKKAR, H.S., BECKER, K. Nutritional, Biochemical, and Pharmaceutical Potential of Proteins and Peptides from *Jatropha*: Review. *Agric. Food Chem.*58:6543–6555, 2010.

DRUZHININA IS, SEIDL-SEIBOTHV, HERRERA-ESTRELLA A, HORWITZ BA, KENERLEYCM, et al., *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:749–59, 2011.

DURMAN, S.B., MENENDEZ, A.B., GODEAS, A.M., Variation in oxalic acid production and mycelial compatibility within field populations of *Sclerotinia sclerotiorum*, *Soil Biology & Biochemistry*, v. 37, p. 2180–2184, 2005.

EL-KATATNY, H.M.; GUDELJ, M.; ROBRA, K.H.; ELNAGHY, M.A.; GÜBITZ, G.M. Characterization of a chitinase and an endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 56, p. 137-143, 2001.

FAO. FAOSTAT. Rome . Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostatgateway/FAO>. Perfil da agricultura familiar no Brasil: dossiê estatístico. Brasília, DF . 24 p. (FAO. Projeto UFT/BRA/036/BRA), 2014.

FAVARON, F., SELLA, L. and D'OVIDIO, R. Relationships Among Endo-Polygalacturonase, Oxalate, pH, and Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP) in the Interaction Between *Sclerotinia sclerotiorum* and Soybean. *MPMI*, v. 17, n. 12, p. 1402–1409, 2004.

FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. Etapas de desarrollo em La planta de frijol. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHIINHOVEN, A. van. Frijol: Investigación y producción. Santiago de Cáli, Colômbia: Ciat. p.61-78, 1985.

FERREIRA, C. M. Mercado de feijão. Brasília DF: Agência de Informação Embrapa, 2007. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/A01\\_69\\_1162003151646.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/A01_69_1162003151646.html)> Acesso em: 05. jan. 2017.

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

FRÜHBECK, G. Obesity: Aquaporin enters the picture. *Nature*, v. 438, n. 7067, p. 4367, 24 nov. 2005.

GAILITE, A.; SAMSONE, I.; IEVINSH, G. Ethylene is involved in *Trichoderma*-induced resistance of bean plants against *Pseudomonas syringae*. *Biology*, v. 691, p. 59-70, 2005.

GAO X. KOLOMIETS MV. Host-derived lipids and oxylipins are crucial signals in modulating mycotoxin production by fungi. *Toxin Reviews*. 28: 79–88, 2009.

GRAU, C.R.; HARTMAN, G.L. *Sclerotinia* stem rot. In: HARTMAN, G.L.; INCLAIR, J.B.; RUPE, J.C. Compendium of soybean diseases. 4th ed. Saint Paul: American Phytopathological Society, p. 46-48. 1999.

GOMES L.; GODOY, W. A. & VON ZUBEN, C. J. Postfeeding larval dispersal: implications to forensic entomology. *Naturwissenschaften* 93:207-215, 2006.

GRUBER, S. Generation of *Trichoderma atroviride* mutants with constitutively activated G protein signaling by using geneticin resistance as selection marker. 2012.

HAMID, M.; REHMAN, K. Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry*, Barking, v. 115, p. 1177–1186, 2009.

HANAI, L. R.; SANTINI, L.; CAMARGO, L. E. A.; FUNGARO, M. H. P.; GEPTS, P.; HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in the perceptions derived from the research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease, Saint Paul, v. 84, p. 377-393, 2010.

HAO, J.J.; SUBBARAO, K.V.; DUNIWAY, J.N. Germination of the *Sclerotinia* minor and *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia under various soil moisture and temperature combinations. Phytopathology, Lancaster, v. 93, p. 443–450, 2013.

HARMAN, G.E.; BJÖRKMAN, T.; ONDIK, K.; SHORESH, M. Changing paradigmas on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. For biocontrol. Outlooks on Pest Management, Burnham, v.19, p.24-29, 2008.

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

HEISER, I.; OSSWALD, W.F. Formação e função das espécies reativas de oxigênio nas interações planta-patógeno. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R. ; CIA, P. (Ed.). Interação planta-patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ, p. 249-282, 2008.

HENRY G., THONART P., ONGENA M. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the diversity of plant immunity elicitors. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 16 257–268, 2012.

HERMOSA R, VITERBO A, Chet I and Monte E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology. 2012.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y. MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. Plant and Cell Physiology, Oxford, UK, v. 42, n. 2, p. 462-468, 2001.

HOITINK HAJ, MADDEN LV, AND DORRANCE AE. Systemic Resistance Induced by *Trichoderma* spp.: Interactions Between the Host, the Pathogen, the Biocontrol Agent, and Soil Organic Matter Quality. Phytopathology, 2006.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease. v. 87, n. 4, p. 10, 2003.

HOYOS-CARVAJAL L, ORDUA S, BISSETT J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. *Biological Control*, v.51, p. 409-416, 2009.

JONES J. D., DANGL J. L. The plant immune system. *Nature* 444 323–329, 2006.

KALDENHOFF R, RIBAS-CARBO M, FLEXAS J, LOVISOLO C, HECKWOLF M, UEHLEIN U. Aquaporins and plant water balance. *Plant Cell Environ* 31 658–666, 2008.

LEUBNER-METZGER, G. Functions and regulation of  $\beta$ -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Science Research*, Cambridge, v. 13, p. 17-34, 2003.

LI, H., GREENE, L.H. Sequence and Structural Analysis of the Chitinase Insertion Domain Reveals Two Conserved Motifs Involved in Chitin-Binding. *PLoS ONE*, 5(1): e8654, 2010.

LIN, L.; MENG, X.; LIU, P.; HONG, Y.; WU, G.; HUANG, X.; LI, C.; DONG, J.; XIAO, L.; LIU, Z. Improved catalytic efficiency of Endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Bacillus subtilis* BME-15 by directed evolution *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 82, p. 671-679, 2009.

LIU, Y.; PAUL, V. H. Studies on the germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, Berlin, v. 114, p. 7–9, 2007.

LOKHANDE, S.D.; OGAWA, K.; TANAKA, A.; HARA, T. Effect of temperature on ascorbate peroxidase activity and flowering of *Arabidopsis thaliana* ecotypes under different light conditions. *Journal of Plant Physiology*, New York, v. 160, p. 57-64, 2003.

LOPES, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). *Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 15–28, 2009.

LORITO, M., HARMAN, G. E., HAYES, C. K., BROADWAY, R., TRONSMO, A, WOO, S. L. & DI PIETRO, A. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma barxianum* : antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase. *Phytopathology* 83, 302-307. 2010.



MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R. da S.; BARACAT-PEREIRA, M.C.; LANNA-FILHO, R.; BATISTA, G.S.; POMELLA, A.W.V. Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em mudas de cacaueteiro expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. *Summa Phytopathologica*, v.34, p.34-37, 2008.

MACHADO, DFM; PARZIANELLO, FR.; SILVA, ACF; ANTONIOLLI, ZI. 2012. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias* 26: 274-288.

MAFFEI M. E., ARIMURA G. I., MITHOEFER A. Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses. *Nat. Prod. Rep.* 29 1288–1303. 2012.

MARTINS, E.M.F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S.F.; EITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). *Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular*. Piracicaba: FEALQ, 2008. 627 p

MARTINS-MIRANDA, A. S. Atividade de enzimas relacionadas com estresses bióticos e abióticos em plântulas de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] expostas à salinidade e deficiência hídrica. 2002

MASSOLA JR., N.; KRUGNER, T.L. Fungos fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO A.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M. *Manual de fitopatologia*. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. p. 149-206, 2011.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J-P. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *The Plant Cell*, Baltimore, v.8, p.203-212, 1996.

MAUREL, C. Molecular physiology of Aquaporins in plants. *International review of cytology*, v.215, p. 105–48, jan. 2002.

MAUREL, C., VERDOUCQ, L., LUU, D.-T., & SANTONI, V. Plant Aquaporins: Membran channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 595-624, 2008.

McCLEAN, P.E.; MYRES, J.M.; HAMMOND, J.J. Coefficient of parentage and cluster analysis of North American dry bean cultivars. *Crop Science*, Madison, v. 33, n. 1, p. 190-193, 1993.

MELO IS. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) *Controle biológico*. Jaguariúna: Embrapa, 2000.

MENTEN, J. O. M.; MORAES, M. H. Evolução dos produtos fitossanitários para tratamento de sementes no Brasil. In: ZAMBOLIM, L. Sementes: qualidade fitossanitária. Viçosa: UFV; DFP, 2005.

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C. M.; ACHADO, A. Q.; PIMENTA, C. B. Eficiência de fungicidas para controle de mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em soja, na safra 2013/2014 – resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: Embrapa Soja, 2015.

MONTEIRO, V. N. et al., New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. *Curr Microbiol*, v. 61, n. 4, p. 298-305, Oct 2010.

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, p. 7-14, 2009.

MUKHERJEE, P.K.; HORWITZ, B.A.; KENERLEY, C.M. Secondary metabolism in *Trichoderma* - a genomic perspective. *Microbiology*, Washington, v. 158, p. 35-45, 2012.

NAZEEM, P.A.; ACHUTHAN, C.R.; BABU, T.D.; PARAB, G.V.; GIRIJA, D.; KESHAVACHANDRAN, R. SAMIYAPPAN, R. Expression of pathogenesis related proteins in black pepper (*Piper nigrum* L.) in relation to *Phytophthora* foot rot disease. *Journal of Tropical Agriculture*, Thrissur, v. 46, n. 1/2, p. 45-51, 2008.

NAZNIN HA, KIYOHARA D, KIMURA M, MIYAZAWA M, SHIMIZU M, HYAKUMACHI M. Systemic Resistance Induced by Volatile Organic Compounds Emitted by Plant Growth-Promoting Fungi in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 2014.

NEWMAN M. A., SUNDELIN T., NIELSEN J. T., ERBS G. MAMP (microbe associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front. Plant Sci.* 2013.

PASCHOLATI, S.F.; BLUNER, S.; REZENDE, D.C.; BRAND, S.C. Resistência adquirida (SAR) x Resistência sistêmica induzida (ISR). In: Simpósio de controle de doenças de plantas: indução de resistência: novos conceitos e aplicações. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, p.29-39, 2010.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M.A.B.; CARNEIRO, J.E.S. Mofobranco. In: PRIA, M.D.; SILVA, O.C. Cultura do feijão: doenças e controle. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2010.

PEREIRA, G.J.M.; MURGAS, L.D.S.; SILVA, J.M. de A.; MILIORINI, A.B.; LOGATO, P.V.R.; LIMA, D. de. Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG e EBHC. Revista Ceres, v.56, p.156-160, 2014.

PIETERSE, C.M.J.; VAN PELT, J.A.; VAN WEES, S.C.M.; TON, J.; VERHAGEN, B.W.M.; LEÓN-KLOOTERZIEL, K.; HASE, S.; DE VOS, M.; VAN OOSTEN, V.; POZO, M.; SPOEL, S.; VAN DER ENT, S.; KOORNNEEF, A.; CHALFUN-JÚNIOR, 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 Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo, v. 13, p. 277-295, 2005.

PUNJA, Z.K., ZHANG, Y.Y. Plant Chitinases and Their Roles in Resistance to Fungal Diseases. Journal of Nematology. 25(4):526-540, 1993.

QUIROGA, M.; GUERRERO, C.; BOTELLA, M.A.; BARCELÓ, A.; AMAYA, I.; MEDINA, M.I.; ALONSO, F.J.; DE FORCHETTI, S.M.; TIGIER, H.; VALPUESTA, V. A. Tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. Plant Physiology, Rockville, v. 122, p. 1119-1127, 2000.

RAES, J. et al., Genome-wide characterization of the lignification toolbox in arabidopsis. Plant Physiology, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 1051-1071, Mar. 2013.

RAJENDIRAN, R.; JEGADEESHKUMAR, D.; SURESHKUMAR, B.T.; NISHA, T. In vitro assessment of antagonistic activity of *Trichoderma viride* against post harvest pathogens. Journal of Agricultural Technology, Bangkok, v. 6, n. 1, p. 31-35, 2010.

REINO, J.L., GUERRERO, R.F., HERNÁNDEZ-GALÁN, R. & COLLADO, I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews, 7: 89-123.

RIBEIRO, T. S. O fungo *Trichoderma* spp. No controle de fitopatógenos: Dificuldades e perspectiva, 2015.

ROLLINS, J.A. The *Sclerotinia sclerotiorum* *pac1* Gene Is Required for Sclerotial Development and Virulence. MPMI, v. 16, n. 9, p. 785–795. 2003.

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

SALAS-MARINA, M.A.; SILVA-FLORES, M.A.; URESTI-RIVERA, E.E.; CASTRO LONGORIA, E.; HERRERA-ESTRELLA, A.; CASAS-FLORES, S. Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. European Journal of Plant Pathology, v.131, p.15-26, 2011.

SAMOLSKI I., DE LUIS A., VIZCAÍNO J. A., MONTE E., SUÁREZ M. B. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. BMC Microbiol. 9:217. 2009.

SANTOS, J.B.; GAVILANES, M.L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, J.; BORÉM. A. (Ed.). Feijão. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 41-66. 2008.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. Plant Physiology, Rockville, v. 125, p. 1591-1602, 2001.

SHANMUGAIAH, V.; BALASUBRAMANIAN, N.; GOMATHINAYAGAM, S.; MONOHARAN, P.T.; RAJENDRAN, A. Effect of single application of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* on growth promotion in cotton plants. African Journal of Agricultural Research, v.4, p.1220-1225, 2009.

SILVA, A.N.; AZEVEDO, G.B.; SOBRINHO, G.G.R.; NOVAES, Q.S. Effect of chemical products and use of the *Trichoderma* spp. for control of *Fusarium solani* in passion fruit trees: Interciencia, Caracas, v. 39, p. 398-403, 2014.

SILVA, M. C. et al., Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. Brazilian Journal of Plant Physiology, Piracicaba, v. 18, n. 1, p. 119-147, 2006.

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

SINGH, S.P. Broadening the genetic base of common bean cultivars: a review. *Crop Science*, Madison, v. 41, n. 6, p. 1659-1675, 2001.

SUGINTA W, VONGSUWAN A, SONGSIRIRITTHIGUL C, et al., An endochitinase A from *Vibrio carchariae*: cloning, expression, mass and sequence analyses, and chitin hydrolysis. *Arch Biochem Biophys*. 424:171–180, 2009.

TANGHE A, PRIOR BB, THEVELEIN JM. Yeast responses to stresses. In: Rosa, C.A., Péter, G. (eds). *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 175-195, 2006.

TAVARES, G.M. Podridão do pé do mamoeiro: infestação em solos de cultivo, controle alternativo com indutores de resistência e *Trichoderma* e avaliação dos mecanismos de defesa envolvidos. 113p. 2009.

TSITSIGIANNIS DI. Keller NP. Oxylipins as developmental and host–fungal communication signals. *Trends in Microbiology*; 15:109–118, 2007.

ULBRECHT, U.; BOWMAN, K.D. Inducible proteins in citrus rootstocks with different tolerance towards the root rot pathogen *Phytophthora palmivora*. *Journal of Phytopathology*, Berlin, v.155, p. 6060-615, 2007.

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*, Orlando, v. 55, p. 85-97, 1999.

VARGAS, W. A., DJONOVIC', S., SUKNO, S. A. & KENERLEY, C. M. Dimerization controls the activity of fungal elicitors that trigger systemic resistance in plants. *J Biol Chem* 283, 19804–19815.2008.

VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; KUKAVICA, B.; STEVANOVIC, B.; NAVARI-IZZO, F. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms in leaves of *Ramonda serbica*. *Journal of Experimental Botany*, Lancaster, v. 57, n. 8, p. 1759-1768, 2006.

VERKMAN, A. S. Aquaporins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124, p. 2107-2112, 2011.

VIEIRA, A. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; JOSÉ, I. C.; PIOVESAN, N. D.; REZENDE, S. T.; MOREIRA, M. A.; BARROS, E. G. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plants submitted to wounding. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, v. 13, n. 1, p. 5-12, 2013.

VILHORDO, B. W.; MIKUSINSKI, O. M. F.; BURIN, M. E.; GANDOLFI, V. H. Morfologia. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. (Coord.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafos, p. 71-99, 1996.

VINALE F, GHISALBERTI EL, SIVASITHAMPARAM K, MARRA R, RITIENI A, FERRACANE R, WOO S, LORITO M. Factors affecting the production of *Trichoderma harzianum* secondary metabolites during the interaction with different plant pathogens. Letters in Applied Microbiology 48:705-711. 2009.

VRIES, R.P. and VISSER, J. Aspergillus Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. Microbiology and Molecular Biology reviews, p. 497–522, December 2001.

WALLING, L. L. Recycling or regulation. The role of amino-terminal oxidizing enzymes. Curr Opin Plant Biol 9(3): 227-33, 2006.

WALTERS D. R., RATSEP J., HAVIS N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. *J. Exp. Bot.* 64 1263–1280. 2013.

WOO, S. L.; SCALA, F.; RUOCCO, M.; LORITO, M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., pathogenic fungi, and plants. Phytopathology, v.96, p.181-185, 2006.

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

ZUPPINI, A., NAVAZIO, L., SELLA, L., CASTIGLIONI, C., FAVARON, F., and MARIANI, P. An Endopoly galacturonase from *Sclerotinia sclerotiorum* Induces Calcium-Mediated Signaling and Programmed Cell Death in Soybean Cells, MPMI, v. 18, n. 8, 2005, p. 849–855, 2005.