

JÉSSICA MORAIS DA SILVA

AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA E MECANISMOS BIOQUÍMICOS NO
CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp.)

GARANHUNS
PERNAMBUCO – BRASIL
JULHO - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA E MECANISMOS BIOQUÍMICOS NO
CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp.)

JÉSSICA MORAIS DA SILVA

ORIENTADORA:

Prof.^a Dr.^a KEILA APARECIDA MOREIRA

CO-ORIENTADORA:

Prof.^a Dr.^a ERIKA VALENTE DE MEDEIROS

Dissertação apresentada à
Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como parte das
exigências do programa de Pós-
Graduação em Produção Agrícola,
para obtenção do título de *Mestre*.

GARANHUNS
PERNAMBUCO – BRASIL

JULHO - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO AGRÍCOLA

AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA E MECANISMOS BIOQUÍMICOS NO
CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp.)

JÉSSICA MORAIS DA SILVA

GARANHUNS
PERNAMBUCO – BRASIL
JULHO – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns-PE, Brasil

S586a Silva, Jessica Morais da
Avaliação de indutores de resistência e mecanismos
bioquímicos no controle da antracnose do feijão caupi
(*Vigna unguiculata* L. Walp.) / Jessica Morais da Silva. – 2016.
58 f. : il.

Orientadora: Keila Aparecida Moreira.

Dissertação (Mestrado em Produção Agrícola) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em
Produção Agrícola, Garanhuns, BR-PE, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Trichoderma 2. Ácido salicílico 3. Enzimas 4. Feijão-caupi
I. Moreira, Keila Aparecida, orient. II. Medeiros, Erika Valente,
coorient. III. Título

CDD 635.652

AVALIAÇÃO DE INDUTORES DE RESISTÊNCIA E MECANISMOS BIOQUÍMICOS NO
CONTROLE DA ANTRACNOSE DO FEIJÃO CAUPI

(*Vigna unguiculata* L. Walp.)

JÉSSICA MORAIS DA SILVA

Prof.^a Dr.^a JOSABETE SALGUEIRO
BEZERRA DE CARVALHO
UAG/UFRPE

Dr.^a ROBERTA CRUZ
PNPD/PPGPA – UAG/UFRPE

Prof.^a Dr.^a KEILA APARECIDA
MOREIRA
UAG/UFRPE
ORIENTADORA

“Nunca se esquecerá de quem é, porque é certo que o mundo não se esquecerá. Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca sua fraqueza. Arme-se com esta lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo”

Tyrion Lannister - George R. R. M

Dedico este trabalho aos meus pais (Irenilda e Antônio), aos meus irmãos (Aniclécio, Aniclécia, José Antônio e Carla) pelo incentivo e apoio em todos os momentos, nessa longa caminhada. Sem vocês, eu nada seria...

AGRADECIMENTOS

A Deus, todo poderoso, por ter me dado à força, confiança e saúde para chegar até aqui.

A Professora Dra. Keila Aparecida Moreira, minha orientadora a quem devo eternamente, pois com sua ajuda conclui mais uma etapa importante da minha vida. Sempre disponível e solícita, acreditando e incentivando. Só me basta agradecer imensamente por esses dois anos de convívio.

A minha Co-orientadora Professora Dra. Erika Valente de Medeiros, que me acompanha desde a graduação é uma das responsáveis, por toda minha conquista acadêmica.

Ao meu namorado Edgar Gomes da Silva, pelos quase oito anos de namoro, você é muito mais que um namorado, será meu eterno amigo e companheiro! Obrigada pelos maus e bons momentos, você sempre esteve ao meu lado me apoiando mesmo quando eu estava equivocada. Espero retribuir a metade do que você já fez por mim!!

As minhas amigas de sempre Cely Franciely, Bruna Luana e Morgana Pedrosa, que apesar da distância sempre existirá carinho e apoio.

Aos meus familiares avós, tios, tias e primos, pelos momentos vividos e eterno apoio.

Aos meus amigos do laboratório, em especial Anna Carolina, Alana, Natalia, Osmar, Jonatas, Allan, Alexandre, Renann, Maiara, Camila, Gean, Aldo, obrigada por tornar os momentos no laboratório mais prazeroso e cheio de risos.

Á Melry que foi meu braço direito durante o período de trabalho no laboratório, apesar do pouco tempo você se tornou muito especial para minha vida, obrigada pelos momentos compartilhados.

Aos meus amigos da graduação, Jamilly Alves e Uemeson José, Albedson Palácio, Wendson de Moraes, Marcos Fernandes e Vanessa Mano que apesar de estarmos trilhando caminhos distintos, vocês ficarão para sempre em minha vida, espero que nossa amizade seja eterna.

Aos meus colegas da Turma de Graduação 2009.2 que tornaram os momentos Universidade muito mais felizes, apesar das dificuldades enfrentadas.

A Pós-Graduação em Produção Agrícola (PGPA) da Unidade Acadêmica de Garanhuns pelo apoio estrutural e educacional.

BIOGRAFIA

Jéssica Moraes da Silva, filha de Antônio José da Silva e Irenilda Moraes dos Santos, nasceu no município de Garanhuns – PE, em 31 de maio de 1991. Criada no Sítio Melancia, zona rural do município de Calçado – PE.

Em agosto de 2009 ingressou no curso de Bacharelado em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal Rural de Pernambuco / Unidade Acadêmica de Garanhuns, formou-se em julho de 2014.

Em agosto de 2014 ingressou no Mestrado em Produção Agrícola na Universidade Federal Rural de Pernambuco / Unidade Acadêmica de Garanhuns, finalizando em julho de 2016.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Importância econômica do feijão	15
2.2 Antracnose no feijoeiro	15
2.3 Indutores de resistência	16
2.4 Mecanismos bioquímicos de defesa.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Descrição da área de estudo.....	21
3.2 Micro-organismo	21
3.3 Fermentação	21
3.4 Determinação da quitinase.....	21
3.5 Avaliação antagonica.....	22
3.7 Cultivo em casa de vegetação	23
3.8 Avaliação da doença.....	23
3.8 Obtenção dos extratos vegetais.....	24
3.9 Determinação das atividades enzimáticas.....	24
3.9.1 Peroxidase	24
3.9.2 Catalase	24
3.9.3 Polifenoloxidase	25
3.9.4 β -1,3-glucanase.....	25
3.9.5 Protease	26
3.9.6 Proteína total	26
3.10 Estatística	26
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÕES	37
6. REFERÊNCIAS	38

RESUMO

O feijão caupi é uma das principais fontes de renda do Norte/Nordeste. Porém o mesmo pode ser afetado por uma diversidade de fitopatógenos podendo prejudicar na produção e produtividade. Atualmente, é comum o uso de indutores de resistência como meio de combater esse ataque de micro-organismos. Este trabalho teve como objetivo avaliar indutores de resistência, assim como os mecanismos bioquímicos no controle da antracnose do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Foi realizado um teste antagônico com diversas espécies de *Trichoderma* URM frente ao *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149. Em casa de vegetação foi aplicado quatro indutores abióticos (ácido salicílico, quitosana, ácido amino butírico, acibenzolar-S-metil) e um biótico (*Trichoderma*) em plantas de feijão caupi. Foi avaliado a severidade da doença, assim como também realizado atividades enzimáticas das folhas (catalase, peroxidase, polifenoloxidase, β -1,3-glucanase e protease). *Trichoderma aureorivide* URM5158 apresentou uma alta taxa de antagonismo assim como a atividade da quitinase foi elevada, sendo este selecionado para os testes *in vivo*. Entre os indutores avaliados apenas o acibenzolar-S-metil apresentou alta taxa de severidade não diferindo do controle. O ácido salicílico se destacou entre os indutores abióticos, assim como *T. aureorivide* URM5158. A espécie *Trichoderma aureoviride* URM5158 apresenta potencial antagônico ao *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149; os indutores mostram potencial contra a severidade da antracnose do feijão.

Palavras chave: *Trichoderma*, ácido salicílico, *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149, enzimas.

ABSTRACT

The cowpea is a major source of income in the North/Northeast of Brazil. But the same can be affected by a wide range of plant pathogens can damage production and productivity. Currently it is common to use resistance inducers as a means to combat the pathogens attack. This work aimed to evaluate resistance inducers, as well as the biochemical mechanisms in controlling anthracnose of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). We conducted an antagonistic test with various strains of *Trichoderma* URM front of *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149, the greenhouse was applied four abiotic inducers (salicylic acid, chitosan, amino butyric acid, acibenzolar-S-methyl) and biotic (*Trichoderma*) in cowpea plants. The severity of the disease, as well as enzymatic activities performed leaves was evaluated (catalase, peroxidase, polyphenol oxidase, β -1,3-glucanase and protease). *Trichoderma aureorivide* URM5158 showed a high rate of antagonism as well as the activity of chitinase was high. Among all the inductors in the end of the experiment only acibenzolar-S-methyl severity showed high rate and did not differ from control. Salicylic acid stood out among the abiotic inducers and *T. aureorivide* URM5158. The *Trichoderma aureoviride* URM5158 species has the potential antagonistic to *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149; show potential inducers against severity of bean anthracnose.

Keywords: *Trichoderma*, salicylic acid, *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149, enzymes.

1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), ganha cada vez mais espaço na produção nacional, como uma fonte de renda para os produtores, principalmente das regiões Norte e Nordeste do Brasil. Estima-se que a área cultivada com essa cultura esteja próxima de 1,2 milhão de hectares (CEPEA/CNA, 2016). Há vários fatores que podem acarretar numa queda de produção do feijoeiro, como os fatores abióticos: seca prolongada, uso excessivo de fertilizantes químicos, salinidade, fotoperíodo, radiação solar, entre outras. Entre os fatores bióticos diversos tipos de fitopatógenos que estão envolvidos na queda de produtividade, podendo ser patógenos do solo e da parte aérea da planta.

Espécies do gênero *Colletotrichum* spp são os principais agentes causadores da antracnose no feijão, responsável pelas principais perdas de produtividade do feijoeiro. A forma mais comum do combate aos fitopatógenos é através do uso de agroquímicos. Porém, nos últimos anos utiliza novas técnicas para diminuir a ação desses fitopatógenos, como o uso de indutores de resistência e micro-organismos capazes de combater o avanço de doenças.

A utilização de produtos que induzem mecanismos de resistência nas plantas, como acibenzolar-S-metil, ácido salicílico, quitosana e ácido amino butírico, constitui uma alternativa para o manejo integrado de doenças de plantas (ROMEIRO, 2008). A utilização destes produtos comerciais que induzem resistência vem ganhando relevância no controle de doenças de plantas (ANDRADE et al., 2013).

O gênero *Trichoderma* é o principal agente de controle biológico estudado atualmente, sua ação antagonista pode controlar uma grande variedade de fitopatógenos em diversos vegetais. Seu mecanismo de micro parasitismo é muito mais complexo, envolve a competição por nutrientes, hiper-parasitismo, antibiose, nas vias bioquímicas como o aumento de enzimas que degradam a parede celular. Em geral, o controle biológico que utiliza antagonistas microbianos mostra um potencial como uma alternativa para o controle natural de fitopatógenos em vez de utilizar fungicidas químicos sintéticos (SCHWAN-ESTRADA e STANGARLIN, 2005; STANGARLIN et al., 2011).

As plantas respondem por diversos mecanismos quando infectadas por patógenos, a produção de espécies reativas de oxigênios (EROs) é uma indicação da resposta fisiológica, resistência sistêmica induzida (RSI), em que há produção de diversas enzimas. Existem

mecanismos de defesas que podem ser exploradas para o controle de doenças através da aplicação de biocontroladores para induzir uma resposta de defesa nas plantas contra o ataque de fitopatógenos (SINGH et al., 2011).

Este trabalho tem como objetivo avaliar indutores de resistência, bem como os mecanismos bioquímicos no controle da antracnose do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), cultivado em casa de vegetação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica do feijão

O feijão-caupi é uma planta eudicotiledonea, da ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolineae*, gênero *Vigna*, secção *Catyang*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. e subespécie *unguiculata*, subdividida em quatro cultigrupos, mas apenas dois são cultivados no Brasil: *Unguiculata* para a produção de grãos secos e verdes, e *Sesquipedalis* para a produção de vagens (FREIRE FILHO et al., 2011).

O Brasil ocupa a terceira posição como produtor e consumidor mundial de feijão caupi, atrás apenas de Nigéria e Níger (FREITAS et al., 2009). Essa cultura é considerada uma das principais alternativas de subsistência alimentar do Norte e Nordeste brasileiro, constituindo grande relevância socioeconômico para as populações rurais (LIMA et al., 2007).

A área cultivada de feijão caupi no Brasil de 2011 a 2014 alcançou uma média de mais 1,2 milhões de hectares, com uma produtividade média superior a 400 kg ha⁻¹ no ano de 2014, dos quais a região Nordeste assume mais de 86% de área plantada.

2.2 Antracnose no feijoeiro

Assim como outras culturas agrícolas, o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) pode ser acometido por diversas doenças. A antracnose é uma das principais, causada pelo fungo do gênero *Colletotrichum*. As plantas afetadas apresentam manchas marrom-avermelhada nas folhas que na fase tardia da doença espalham-se para todos os órgãos da planta, o processo começa pela infecção e germinação de esporos em desenvolvimento, somando assim a estrutura de infecção (BARRETO et al., 2007).

As características morfológicas que identificam o gênero *Colletotrichum* são a conidioma acervular, frequentemente com setas, as quais apresentam hifas estéreis de coloração escura, e não ramificada com parede espessa (ALVES, 2008). A espécie *C. lindemuthianum* destaca-se por apresentar maior número de variantes representadas por 12 *formae speciales* e oito variedades pertencentes a espécie (INDEX FUNGORUM, 2013).

Os surtos de antracnose no feijoeiro ainda ocorrem, especialmente em áreas com uso extensivo e plantios sucessivos. É crescente a utilização de genótipos de feijoeiros resistentes, uma das medidas de controle mais eficiente para a diminuição das perdas causadas por *C. lindemuthianum* (KELLY e VALLEJO, 2004). Porém, autores demonstram a importância de utilizar indutores de resistência abióticos (DEMPSEY e KLESSIG, 1994; AGNELLI, 2011), assim como bióticos (NAWROCKA; MAŁOLEPSZA, 2013) para a diminuição dos sintomas causado por fitopatógenos do feijoeiro.

2.3 Indutores de resistência

Indutores podem ativar diretamente as vias de sinalização pela interação com receptores de plantas ou estimular indiretamente, liberando sua parede celular, fragmentos de membrana celular que atuam como eliciadores secundários (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010).

O agente indutor é aplicado na parte aérea da planta, enquanto que os mecanismos de defesa serão ativados em outras partes distantes, pressupondo que deva existir algum tipo de sinal químico, bioquímico, energético ou de natureza ainda desconhecida que deve ter sua origem no sítio de indução e seja enviado aos locais mais distantes formando uma espécie de reação em cadeia. Existe uma diversidade de substâncias ou compostos que atuam como candidatos a sinalizar intracelularmente, ácido jasmônico, ácido salicílico, ácido amino butírico, acibenzolar-S-metil e quitosana (KUĆ, 1995; ROMEIRO, 2008), são exemplos de indutores de resistência.

As plantas superiores tendem a produzir compostos defensivos em resposta aos ataques microbianos, fitopatógenos, insetos ou mesmo quando é aplicado produtos químicos que imitam o efeito da infecção patogénica (VAN LOON, 1999), o ácido salicílico está entre esses compostos mais comuns que produz resposta defensiva (VERNOOIJ et al., 1994).

O ácido salicílico (AS) tem emergido como uma molécula de sinalização crítica que regula a resposta das plantas à infecção. É relatado que após a instalação de um processo infeccioso, a biossíntese do ácido salicílico é aumentada, e um grupo de genes de proteínas será induzida, relacionadas à patogênese. Estes eventos moleculares estão relacionados com a resposta de hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida para evitar a propagação de patógenos em

plantas infectadas e são geralmente acompanhados com a produção de espécies reativas de oxigênio (O'DONNELL et al., 2001; GAYATRIDEVI et al., 2012).

O ácido amino butírico (BABA) é conhecido por induzir resistência contra agentes patogênicos em diversos vegetais, incluindo tomate, batata, vinha e ervilha (COHEN et al., 1999; JAKAB et al., 2001). Em experimentos de campo, Cohen (2002) constatou que o BABA fornecia controle significativo da requeima de batata, enquanto Liljeroth et al. (2010) mostraram que o BABA quando utilizado em conjunto com uma dose de fungicida reduzida apresentou o mesmo nível de controle da doença, ao invés de usar uma dose completa do tratamento fungicida padrão.

O acibenzolar S-metil (ASM) que atua em várias espécies vegetais contra uma ampla gama de patógenos, incluindo fungos, vírus e bactérias (GÖRLACH et al., 1996). O ASM é um indutor de resistência que não possui ação antimicrobiana direta, o mesmo interfere nos processos fisiológicos e/ou bioquímicos das plantas, como a produção de fenóis, ativando a resistência sistêmica (DEBONA et al., 2009; FURTADO et al., 2010).

A quitosana tem sido relatada como uma das principais alternativas mais segura para controlar fungos fitopatogênicos durante os processos de pré e pós-colheita em culturas agrícolas (BADAWY e RABEA, 2011). Considerado como um biopolímero antimicrobiana que atua na atividade contra fungos patogênicos e na capacidade de induzir mecanismos de defesa das plantas (ROMANAZZI et al., 2013). Este demonstra a capacidade para induzir alterações morfológicas acentuadas e alterações estruturais na desorganização molecular das células fúngicas. Apresenta atividade indireta quando induzem mecanismos de defesa nas plantas, estimula a produção de espécies reativas de oxigênio, inibe a ação de proteinases, altera o metabolismo de fitoalexinas, promove lignificação, induz a formação de compostos fenólicos, estimula o acúmulo de PR proteínas ligadas a patogênese, como a quitinase e β -1,3-glucanase (ALI et al., 2014; LI et al., 2015).

Em 1932, Weindling já demonstrava a natureza antagônica das espécies de fungos do gênero *Trichoderma* sp. São fungos filamentosos imperfeitos (Deutromycetes, Dematiaceae), saprófitas, e os mais comuns na rizosfera, pode ser encontrado em quase todo o solo. A capacidade microparasita de espécies de *Trichoderma* contra alguns patógenos de plantas e solo (PAPAVIZAS, 1985; ELAD et al., 1993; ELAD, 2000; FREEMAN et al., 2004, DUBEY et al., 2007) apresenta sua importância econômica para a agricultura, permitindo assim o desenvolvimento de estratégias de controle biológico.

Entre estes, várias espécies de *Trichoderma* são bem documentados como micoparasita e têm sido utilizados com sucesso contra fungos patogênicos (PAPAVIZAS e LUMSDEN, 1980). *Trichoderma harizanum*, *T. viridae*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. roseum* e *T. koningii* são as espécies mais frequentemente empregados no controle biológico de patógenos.

O controle biológico de doenças de plantas usando micro-organismos, especialmente contra fitopatógenos e nematoides vem se tornando uma forma ambientalmente aceitável tornando uma alternativa para os métodos de controle convencional (BARKER e PANLITZ, 1996; EZIASHI et al., 2007).

Existem evidências de uma grande variedade de micro-organismos, que compreendem bactérias, vírus e fungos rizosféricos, que desempenham um papel importante na supressão de doenças de plantas, por controle direto de raízes e organismos patogênicos foliares assim como por indução de resistência sistêmica em plantas. Essa capacidade de supressão de patologias de determinados micro-organismos, conhecidos também como agentes de controle biológico, facilita a imunidade das plantas, resultando na diminuição do uso de pesticidas (PERAZZOLLI et al., 2008; MASTOURI et al., 2010; SALAS-MARINA et al., 2011; CARRERAS-VILLASENOR et al., 2012; HARMAN et al., 2012; HERMOSA et al., 2012; RYDER et al., 2012).

As plantas possuem um sistema imunológico eficiente e multifacetado, capaz de lidar com a maioria dos invasores microbianos, bactérias, fungos, oomicetos, vírus e nematoides que estão presentes no ambiente. Além das barreiras físicas e químicas, como a cutícula, as paredes celulares e os compostos antimicrobianos (BOLLER e FELIX, 2009).

Estes são estruturas moleculares essenciais para a aptidão total dos micro-organismos como flagelina dos flagelos bacterianos ou quitina, ou ainda diferentes glucanos, presentes nas paredes celulares dos fungos. O reconhecimento precoce externo também é conseguido com sinais de "perigo" do hospedeiro ou padrões moleculares associados aos danos, como oligo-galacturonídeos derivados de pectina, produzidos como consequência de atividades enzimáticas e toxinas microbianas (DODDS e RATHJEN, 2010).

2.4 Mecanismos bioquímicos de defesa

As plantas desencadeiam uma complexa cascata de sinalização, incluindo íons que conduzem a despolarização da membrana plasmática, como a produção de espécies reativas de

oxigênio (ROS), óxido nítrico (ON) e a atividade de quinases (BOLLER e FELIX, 2009; BOUDSOCQ et al., 2010).

Estes eventos de sinalização molecular da atividade do fator de transcrição (TF) levando a enorme reprogramação transducional relacionada com genes de defesa resultando no acúmulo de diferentes enzimas e metabólitos específicos, como as proteínas (PR) relacionadas à patogênese, os compostos com atividade antimicrobiana como as fitoalexinas, a lignina e de calose depositada à parede celular assegurando o seu fortalecimento, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) com um papel de sinalização e efeito antimicrobiano direto, além do fechamento dos estômatos (MELOTTO et al., 2006; BOLLER e FELIX, 2009; DODDS e RATHJEN, 2010).

Estes compostos defensivos incluem muitos metabólitos secundários, como as fitoalexinas que são compostos fenólicos, e também estão relacionadas com a patogênese das proteínas (PRs). As PRs foram descritas pela primeira vez na década de 1970 em folhas de plantas de tabaco que reagem a hipersensibilidade à infecção, pelo vírus do mosaico do tabaco (GIANINAZZI et al., 1970; VAN LOON e VAN KAMMEN, 1970).

Com base nas semelhanças de sequência, sorológico ou relações imunológicas, e enzimática, as propriedades das proteínas PR foram classificadas em 17 famílias (CHRISTENSEN et al., 2002). Dentro desta classificação algumas proteínas como as ribonucleases, quitinases, endoproteases, β -1,3-glucanases e peroxidases, tem propriedades conhecidas, podendo ser, inibidoras ou defensivas (VERA e CONEJERO, 1988; VAN LOON, 1999).

Enzimas são basicamente catalisadores biológicos que agem reduzindo a ativação energia e aumentar a velocidade da reação química específica nos processos fisiológicos. Eles são proteínas com um elevado especificidade para cada reação e estão envolvidos diretamente sem ser modificado. As enzimas são caracterizadas por estruturas complexas e pode ser conjugado com metais, hidratos de carbono e/ou lípidios (KOSHLAND 1959; WHITAKER, 2003a, 2003b).

A enzima quitinase hidrolisa a quitina, um homopolímero abundante de β -1,4 N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). Quitina é um componente estrutural importante de muitos organismos, presente nas paredes celulares dos fungos (ADAMS, 2004), conchas de crustáceos (CAUCHIE, 2002), e cutículas de insetos (MERZENDORFER e ZIMOCH, 2003). Portanto, as quitinases são importantes pois estão envolvidas numa ampla variedade de processos biológicos e biotecnológicos, desde a exploração e limpeza ambiental de resíduos quitinosos (SYNOWIECKI

et al 2003), sistemas de defesa das plantas (KASPRZEWSKA, 2003) e controle biológico (LORITO et al., 1998; WOO et al., 1999).

A peroxidase, enzima de ação antioxidativa, é uma molécula chave na biossíntese da lignina, pois estão envolvidas na degradação dos níveis tóxicos de peróxido de hidrogênio que é formando nos tecidos vegetais, após ataque de patógenos em feijão, implicando assim na proteção celular e resistência às diversas doenças (THAKKER et al., 2013).

As peroxidases pertencem à família PR-9 e foram purificadas e caracterizadas a partir de plantas superiores, incluindo o tabaco (LAGRIMINI et al., 1987), batata (ESPELIE et al., 1986), cevada (KRISTENSEN et al., 1999) e várias outras.

A catalase é uma das principais enzimas de detoxificação do H_2O_2 em plantas e podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar os substratos, como metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (VALENTE, 2012).

Portanto este trabalho tem como objetivo avaliar indutores de resistência, assim como seus mecanismos bioquímicos no controle da antracnose do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.), cultivado em casa de vegetação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da área de estudo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG/UFRPE, no município de Garanhuns – PE, Brasil. O clima da região é do tipo mesotérmico Cs'a. A temperatura média anual é 20 °C e a precipitação média anual é de 1.300 mm.

3.2 Micro-organismo

O isolado *Colletotrichum lindemuthianum* URM 3149 foi obtido através da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, bem como os *Trichoderma* (*T. aureoviride* URM3734, *T. aureoviride* URM5158, *T. aureoviride* URM6668, *T. hamatum* URM6656, *T. harzianum* URM3086; *T. harzianum* URM3197, *T. longibrachiatum* URM6068 e *T. virens* URM5007).

3.3 Fermentação

Os oitos isolados de *Trichoderma* foram cultivados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura líquido constituído por 1,4g (NH₄)₂SO₄; 2g KH₂PO₄; 6,9g NaH₂PO₄; 0,3g MgSO₄.7H₂O; 1g quitina coloidal; 10 g peptona (ANJANI KUMARI e PANDA 1992). A mistura reacional foi composta de 1 mL de quitina coloidal 1% (p/v), 0,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,4 e 0,5 mL do extrato enzimático bruto foi produzido a 37 °C, durante 96h.

3.4 Determinação da quitinase

A quitina coloidal foi preparada por hidrólise ácida utilizando ácido fosfórico 85%, como descrito por Elad e Kapat (1999). A atividade de quitinase foi realizada conforme metodologia proposta por Monreal e Reese (1969). Os açúcares redutores foram detectados mediante a aplicação do método do ácido dinitrossalicílico a 570 nm (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 μmol de N-acetilglucosamina por minuto da reação, sob as condições padrão de ensaio.

3.5 Avaliação antagônica

Foi avaliada a capacidade antagônica dos oito isolados de *Trichoderma* utilizando o método de cultura dupla de acordo com metodologia de Li et al. (2003), em placas de Petri contendo cerca de 15 mL de meio de cultura com batata-dextrose-agar (BDA) com adição de cloranfenicol (100 mg L^{-1}).

Foram inoculadas com *C. lindemuthianum* URM 3149 com oito dias de idade e os diferentes isolados de *Trichoderma* com 5 mm de diâmetro, colocados em posição oposta na placa Petri, o controle continha apenas *C. lindemuthianum*. As observações foram registradas todos os dias até o crescimento do patógeno cobrir totalmente a superfície da placa no tratamento controle, realizou-se quatro repetições com todos os ensaios.

As observações foram registradas após 24h de inoculação dos micro-organismos até a cobertura completa da área demarcada para o patógeno no tratamento controle. A percentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição do crescimento} = [(C - T) / C] \times 100$$

Onde, C = o crescimento radial de *C. lindemuthianum* no controle, T = o crescimento radial de *C. lindemuthianum* em tratamento com *Trichoderma* (EDGINGTON et al., 1971):

3.6 Coleta e preparação do solo

O solo utilizado neste experimento foi proveniente de mata nativa do município de São João-PE. Os atributos químicos foram avaliados e apresentaram os seguintes resultados: pH (H_2O 1:2,5) = 4,5; P (16,6 mg Kg^{-1}); Mg (0,8 cmolc dm^{-3}); Ca (0,8 cmolc dm^{-3}); Al (0,15 cmolc Kg^{-1}) e

H + Al ($1,8 \text{ cmolc dm}^{-3}$) através de análise realizada de acordo com EMBRAPA (2009). Este solo apresentou 880 g Kg^{-1} de areia, 40 g Kg^{-1} de argila e 80 g Kg^{-1} de silte, sendo considerado solo arenoso. O solo foi esterilizado em autoclave, a uma temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$, por duas horas. Deixou-se o solo secar e em repouso durante 15 dias, após a autoclavagem, para estabilização dos teores de metais pesados.

3.7 Cultivo em casa de vegetação

Quatro sementes da cultivar “sempre-verde” foram plantadas em vasos com capacidade de 4 kg de solo em cada vaso com posterior desbastes permanecendo apenas uma planta por vaso. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis tratamentos com quatro períodos de coleta, assim, como quatro repetições. As plantas receberam os tratamentos da seguinte forma: acibenzolar-S-metil (Bion®); ácido amino butírico (BABA); ácido salicílico; quitosana; agente biológico, (*Trichoderma*); controle (água destilada). Quando as plantas apresentaram três pares de folhas formadas, foram pulverizados os indutores. Dois dias após o tratamento com os diferentes indutores, foi aplicado *C. lindemuthianum* URM3149, na concentração de 10^6 conídios por mL. As plantas foram mantidas cobertas com sacos plásticos por três dias, para favorecer o desenvolvimento do fungo. As plantas foram irrigadas uma vez ao dia, em todos os dias da condução do experimento, totalizando 60 dias. As coletas das folhas ocorreu no 36° , 41° , 45° e 52° dias após o plantio. Portanto, 4, 8, 12 e 20 dias após a aplicação do patógeno nas plantas.

3.8 Avaliação da doença

A severidade da antracnose foi avaliada nos dias 4, 8, 12 e 20 após a aplicação do patógeno nas plantas. Para tanto, foi utilizada a escala de notas de Rava et al. (1993) que varia de 1 a 9, sendo: 1 = ausência de sintomas; 2 = até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis somente na face inferior da folha; 3 = maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau 2, até 3% das nervuras afetadas; 4 = até 1% das nervuras apresentando manchas necróticas, perceptíveis em ambas as faces da folha; 5 = maior frequência dos sintomas foliares descritos no grau 4, até 3% das nervuras afetadas; 6 = manchas necróticas nas nervuras, perceptíveis em ambas as faces da folha, presença de algumas lesões nos talos, ramos e pecíolos; 7 = manchas necróticas

na maioria das nervuras, com grande parte do tecido do mesófilo adjacente rompendo-se e presença abundante de lesões nos talos, ramos e pecíolos; 8 = manchas necróticas quase a totalidade das nervuras, ocasionando rompimento, desfolha, e redução do crescimento das plantas, assim como lesões muito abundantes nos talos, ramos e pecíolos; 9 = maioria das plantas mortas; transformados em índice de doença.

3.9 Obtenção dos extratos vegetais

Para a obtenção dos extratos vegetais, amostras das folhas foram coletadas no 36°, 41°, 45° e 52° dias após o plantio, levadas para o laboratório, pesadas (0,1 g) e maceradas em nitrogênio líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino, em seguida foi homogeneizado em solução tampão com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 50 mg (p/v) e, posteriormente centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante obtido foi colocado em microtubos e armazenado à -20 °C, até a realização das atividades enzimáticas (ANDRADE et al., 2013).

3.10 Determinação das atividades enzimáticas

3.10.1 Peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada a 30 °C, por método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (URBANEK et al., 1991). A cubeta de referência continha 1,5 mL da solução com 1350 µL de guaiacol, 50 µL de peróxido de hidrogênio (0,1 M) e 100 µL do extrato proteico. A atividade de peroxidase foi expressa em µmol H₂O₂ decomposto mg⁻¹ proteína min⁻¹, e a absorbância lida no tempo 0, 30, 60, 90 e 120 segundos, e realizadas em 10 amostras de cada tratamento.

3.10.2 Catalase

A atividade de catalase foi determinada usando-se EDTA (1 mM), peróxido de hidrogênio (0,1 M) dissolvido em solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,0. A reação obtida através da mistura de 1390 μL de tampão, 50 μL do extrato enzimático, 60 μL de peróxido de hidrogênio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 240 nm, no tempo 0 e 60 segundos. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ decomposto mg^{-1} proteína min^{-1} e as leituras realizadas em cinco amostras de cada tratamento (HAVIR; MCHALE, 1987).

3.10.3 Polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada segundo a metodologia de Kar; Mishra (1976), com modificações. O substrato composto por pirogalol, na concentração de 50 mM, dissolvido em solução tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), e a mistura reacional por 1 mL de pirogalol, 25 μL do extrato enzimático, que após cinco minutos interrompeu-se a reação com a adição de 25 μL de ácido sulfúrico (5%). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 420 nm e os resultados expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ decomposto mg^{-1} proteína min^{-1} .

3.10.4 β -1,3-glucanase

A atividade da β -1,3-glucanase foi determinada conforme metodologia descrita por Lever (1972) com modificações de Honorato et al. (2015). O meio reacional constituiu de 230 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 250 μL da solução de laminarina (4 mg mL^{-1}) e 20 μL do extrato vegetal e incubado a 45 °C por 30 minutos. Após esse período, foi acrescentado 500 μL de DNS e, em seguida colocada em água fervente por 5 minutos, após o resfriamento em banho de gelo até a temperatura ambiente, as amostras foram determinadas em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados expressos em μmol de absorbância por mg de proteína por min.

3.10.5 Protease

O ensaio da atividade proteolítica foi descrito por Alencar et al. (2003). A mistura reacional de 100 μL de azocaseína (1,0% em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2,) e 60 μL de extrato enzimático foi incubada durante 1 h à temperatura ambiente; interrompida pela adição de 480 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v), seguida por centrifugação durante 10 minutos a 10000 rpm (4 °C). O sobrenadante (320 μL) foi adicionado a 560 μL de NaOH (1 M) para posterior leitura em espectrofotômetro 440 nm e os resultados expressos em unidades de absorvância por mg^{-1} proteína min^{-1} .

3.10.6 Proteína total

As dosagens das proteínas totais foram realizadas segundo o método de Bradford (1976) modificado, que utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* que detecta quantidades mínimas de proteínas em líquidos biológicos. A curva de calibração foi realizada a partir de soluções estoques de soro albumina bovina (BSA) numa gama de concentração de 0-600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração foi expressa em mg mL^{-1} de amostra.

3.11 Estatística

Foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados quantitativos foram submetidos a análise de regressão levando em consideração o R^2 , pelo Programa Sisvar versão 5.4 Build 80 (FERREIRA, 2007).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

O teste antagônico apresentado na Figura 1, realizado com *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149 frente a oito espécies de *Trichoderma* mostra que a espécie *Trichoderma aureoviride* URM5158 apresentou maior porcentagem de inibição do crescimento micelial frente ao *C. lindemuthianum* URM3149, nos cinco dias de avaliação, diferindo estatisticamente das demais espécies de *Trichoderma* avaliados. Porém, todas as estirpes de *Trichoderma* apresentaram inibição contra o crescimento de *C. lindemuthianum* URM3149. Esse potencial antagônico é possível devido a diversas formas, como os mecanismos de ação, com relevância a competição por nutrientes e/ou nicho, parasitismo, produção de enzimas, ou mesmo antagonismo mecânico (AL-SAEEDI et al., 2014).

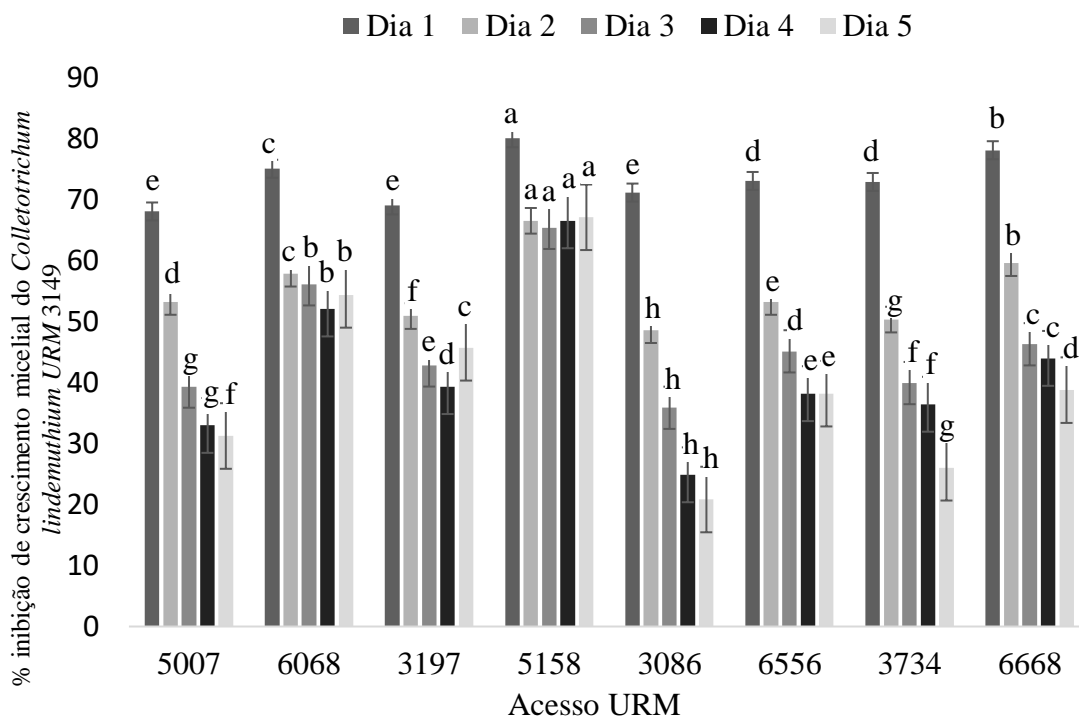


Figura 1. Avaliação do teste antagônico de diferentes isolados de *Trichoderma* URM contra o crescimento de *Colletotrichum lindemuthianum* URM 3149. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Algumas cepas de *Trichoderma* são conhecidas principalmente por suprimir as doenças causadas por patógenos ou até aliviar estresses abióticos, onde *Trichoderma* pode apresentar

propriedades micoparasíticas ou ser um antagonista patogênico (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2011; SALAS-MARINA et al., 2011; HARMAN, 2012; HERMOSA et al., 2012; CARRERAS-VILLASENOR et al., 2012).

Na Figura 2 é possível observar a atividade micoparasita dos *Trichoderma* URM diante de *C. lindemuthianum* URM3149. Estudos recentes demonstram que compostos de oxigênio heterocíclicos (CCE) sintetizados por poliketídeo sintase presente em espécies de *Trichoderma* são outra classe promissora de metabolitos secundários capaz de induzir resistência das plantas (BAKER et al., 2012). Esta avaliação é importante, porque possibilita selecionar um agente com potencial antagonico com efeito direto, interferindo no crescimento micelial dos patógenos (KHALILI et al., 2012).

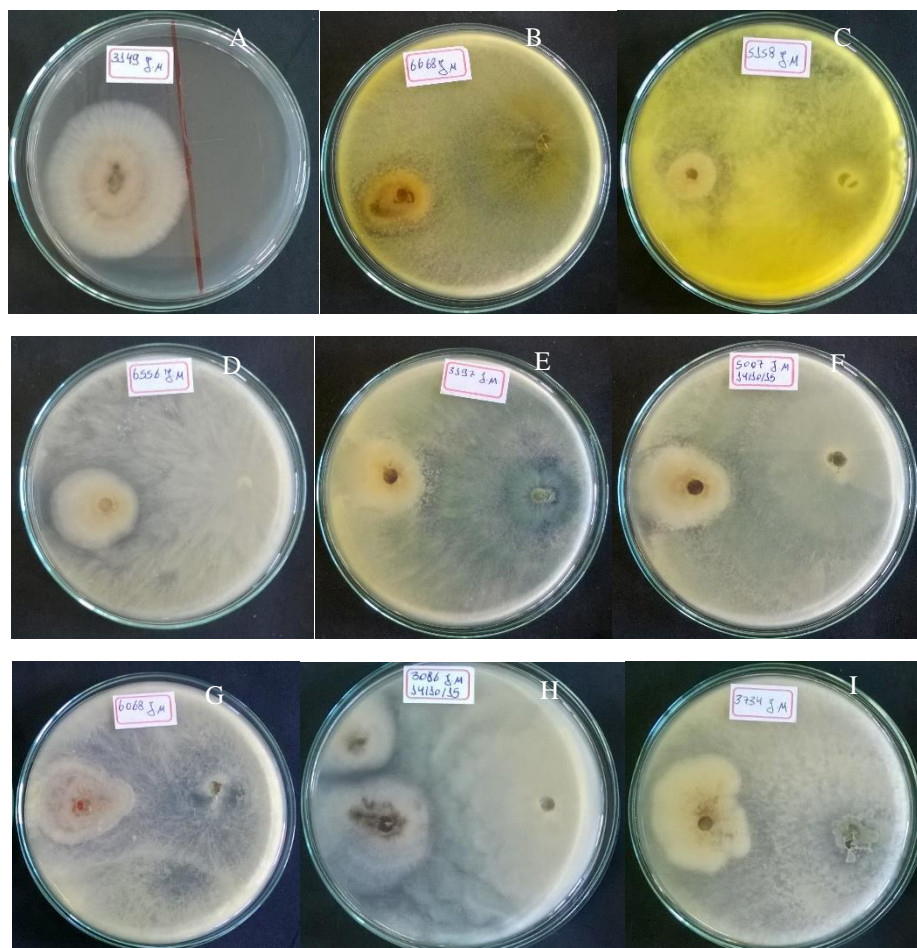


Figura 2. Atividade micoparasita do *Trichoderma* frente ao *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149. A – *C. lindemuthianum* URM3149; B = *Trichoderma aureoviride* URM6668; C = *T. aureoviride* URM5158; D = *T. hamatum* URM6556; E = *T. harzianum* URM3197; F = *T. virens*

URM5007; G = *T. longibrachiatum* URM6068; H = *T. longibrachiatum* URM3086; I = *T. aureoviride* URM3734.

Compostos orgânicos voláteis liberados por *Trichoderma* podem estar envolvidos na indução de resistência de plantas, porém sua real função é questionável (BRUCE et al., 2005; BAKER et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2012). A maioria destes compostos é relatada principalmente por ter ação antifúngica e promoção de crescimento de plantas, e atividades enzimáticas, entretanto sua capacidade de ativar resistência ainda é estudada (NAWROCKA e MAŁOLEPSZA, 2013).

Na Tabela 1 apresenta os valores da atividade da quitinase dos isolados de *Trichoderma*, é possível perceber que *T. aureoviride* URM 5158 apresentou a maior atividade de quitinase com $6,7 \text{ U mL}^{-1}$, diferindo estatisticamente das demais espécies de *Trichoderma* avaliadas. No estudo de Agrawal e Kotasthane (2012) é possível observar semelhanças, entre os resultados, pois as estirpes *T. aureoviride* apresentaram maiores atividades suplementadas com quitina coloidal, do que as demais espécies avaliadas. Os mesmos autores indicam que, maior resultado da produção de quitinase por essa espécie, *T. aureoviride*, se deu pela afinidade quanto ao pH da quitina coloidal, e assim, sendo um ótimo produtor da enzima contra a quitina da parede celular de patógenos.

Tabela 1. Atividade de quitinase por isolados de *Trichoderma* URM. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Espécie de <i>Trichoderma</i>	Acesso URM	Atividade de quitinase (U mL ⁻¹)
<i>Trichoderma aureoviride</i>	3734	$1,95 \pm 0,14^e$
<i>Trichoderma aureoviride</i>	5158	$6,70 \pm 0,43^a$
<i>Trichoderma aureoviride</i>	6668	$3,46 \pm 0,23^d$
<i>Trichoderma hamatum</i>	6656	$4,01 \pm 0,27^{cd}$
<i>Trichoderma harzianum</i>	3086	$2,70 \pm 0,19^{de}$
<i>Trichoderma harzianum</i>	3197	$4,40 \pm 0,29^c$
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	6068	$5,55 \pm 0,36^b$
<i>Trichoderma virens</i>	5007	$2,05 \pm 0,15^{de}$

O aumento nos níveis de quitinasas por agentes abióticos e bióticos também têm provado sua função na defesa de plantas (GRAHAM et al., 2003). Esses resultados mostram que houve atividade quitinolítica em todas as espécies de *Trichoderma* URM avaliadas, constatando que a quitina está presente em todas as paredes celulares dos fungos.

A severidade das plantas (Figura 3) foi avaliada num intervalo de até 20 dias após a aplicação do patógeno. Foi possível observar que no quarto e oitavo dia a severidade da doença não diferiu estatisticamente entre os tratamentos avaliados. Entretanto, no 12º dia observou-se que o controle (cont.) obteve uma maior taxa de severidade das plantas, porém não diferiu estatisticamente dos tratamentos aplicados com ácido amino butírico (BABA) e quitosana (Quito). A severidade no 20º dia do controle foi maior que os demais tratamentos avaliados, porém não diferiu significativamente do acibenzolar-S-metil.

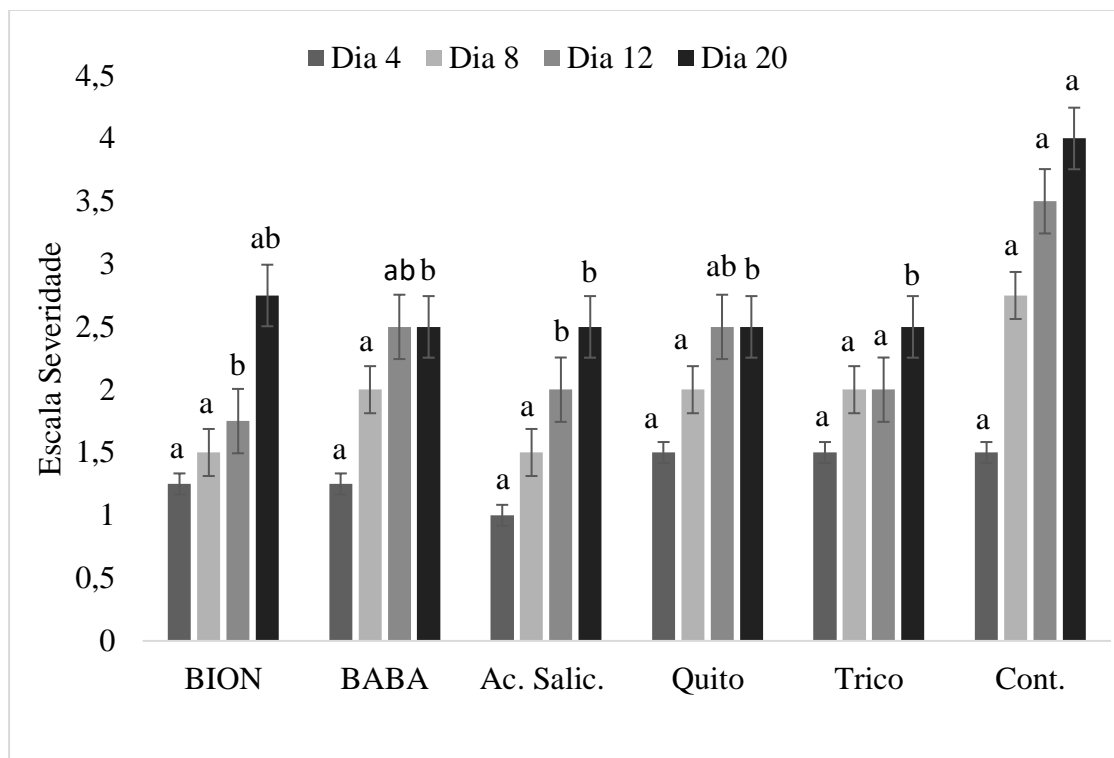


Figura 3. Avaliação da severidade de *Colletotrichum lindemuthianum* URM 4139 em plantas de feijão caupi após aplicação dos indutores. BION=acibenzolar-S-metil; BABA=ácido amino butírico; Ac. Salic.=ácido salicílico; Quito=quitosana; Tricho=*Trichoderma* URM 5158; Cont.=controle. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A indução de imunidade em plantas é a consequência das interações entre diferentes indutores, ligados pelos receptores de micro-organismos e de plantas, conduzindo à ativação de vias de sinalização, provocando mudanças fisiológica e bioquímicas nas plantas (MASTOURI et al., 2010; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2011; HARMAN et al., 2012).

O tratamento das plantas com micro-organismos não virulentos (indutores bióticos) ou compostos químicos (indutores abióticos) pode aumentar a resistência ao ataque de fitopatógenos, não apenas no local de tratamento, mas também em tecidos distantes dos locais de infecção inicial (EL-MOURY et al. 2003).

A indução de resistência pode ser obtida através do uso de produtos naturais, com origem vegetal ou fúngica, também tem a vantagem por permitir respostas ao ataque de diversos agentes patogênicos, principalmente por não possuir mecanismos de ação específicos (MADHUSUDHAN et al., 2008; GRAHAM e MYERS, 2011).

Diferentes mecanismos é sugerido como responsáveis pelas atividades enzimáticas e sua importância no controle biológico, podem ser divididos em efeitos diretos e indiretos sobre o patógeno das plantas. Efeitos diretos incluem a competição por nutrientes ou espaço, a produção de antibiótico e enzimas, a inativação das enzimas do patógeno e parasitismo. Os efeitos indiretos incluem todos os aspectos que produzem alterações morfológicas e bioquímicas na planta hospedeira para induzir resistência (VAN LOON et al., 1998; HARMAN 2000, 2006; CHAROENPORN et al., 2010).

Na Figura 4 pode ser observado os valores da atividade da catalase. O tratamento com o agente de controle biológico (*T. aureoviride* URM 5158) obteve maior atividade enzimática, porém não diferiu significativamente do tratamento com aplicação do BABA. No 12º dia os valores da atividade enzimática com *Trichoderma* chegaram a 130 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína por minuto. O aumento rápido dessa atividade é induzido pelo acúmulo de H_2O_2 gerando desta forma a elevação nos níveis de catalase (SENET al., 2003). Além de degradar o peróxido de hidrogênio presente nas plantas a catalase atua como sinalizador na resposta de defesa da planta e no reforço da parede celular, pela ligação cruzada de proteína estrutural ou fenólica, ao formar uma barreira mecânica efetiva (RESENDE et al., 2003).

O aumento na atividade de enzimas antioxidantes como a catalase pode demonstrar uma proteção da planta contra o ataque do patógeno. Este aumento da atividade pode ser relacionado à

adaptação, auxiliando na redução dos níveis tóxicos do peróxido de hidrogênio (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011).

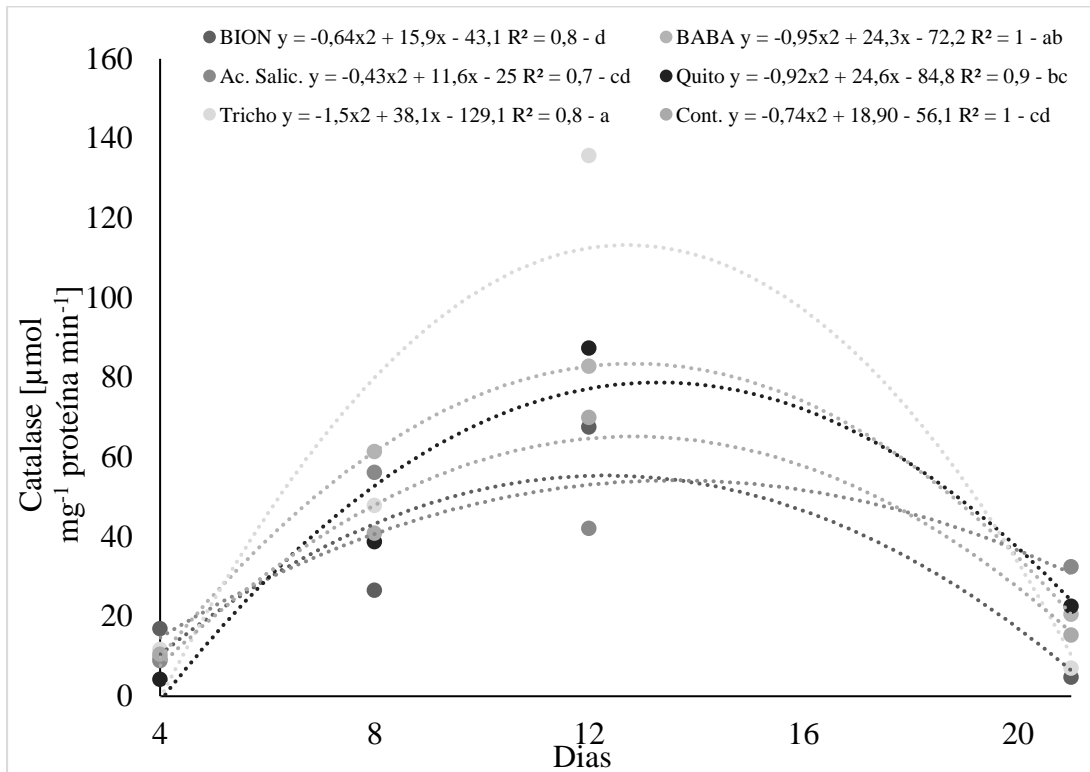


Figura 4. Atividade da catalase em folhas de feijão caupi, após aplicação do *Colletotrichum lindemuthianum* URM 3149 e pulverização dos indutores de resistência, no decorrer de 20 dias. BION=acibenzolar-S-metil; BABA=ácido amino butiríco; Ac. Salic.=ácido salicílico; Quito=quitosana; Tricho=*Trichoderma*; Cont.=controle. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Na Figura 5 estão apresentados os valores da atividade da polifenoloxidase, o tratamento com *T. aureoviride*, apresentou o maior valor, porém não diferiu significativamente dos tratamentos com aplicação de BION e BABA. A maior atividade foi obtida no 4º dia, com Cont. ($1,2 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína por minuto). O aumento e acúmulo dessa atividade enzima dependem principalmente do agente de indução, a condição fisiológica, e o agente patogênico (TUZUN, 2001). Muitos dos trabalhos publicados correlacionam os valores da atividade da polifenoloxidase a fatores ambientais e ataques por patógenos (MAYER et al., 2006).

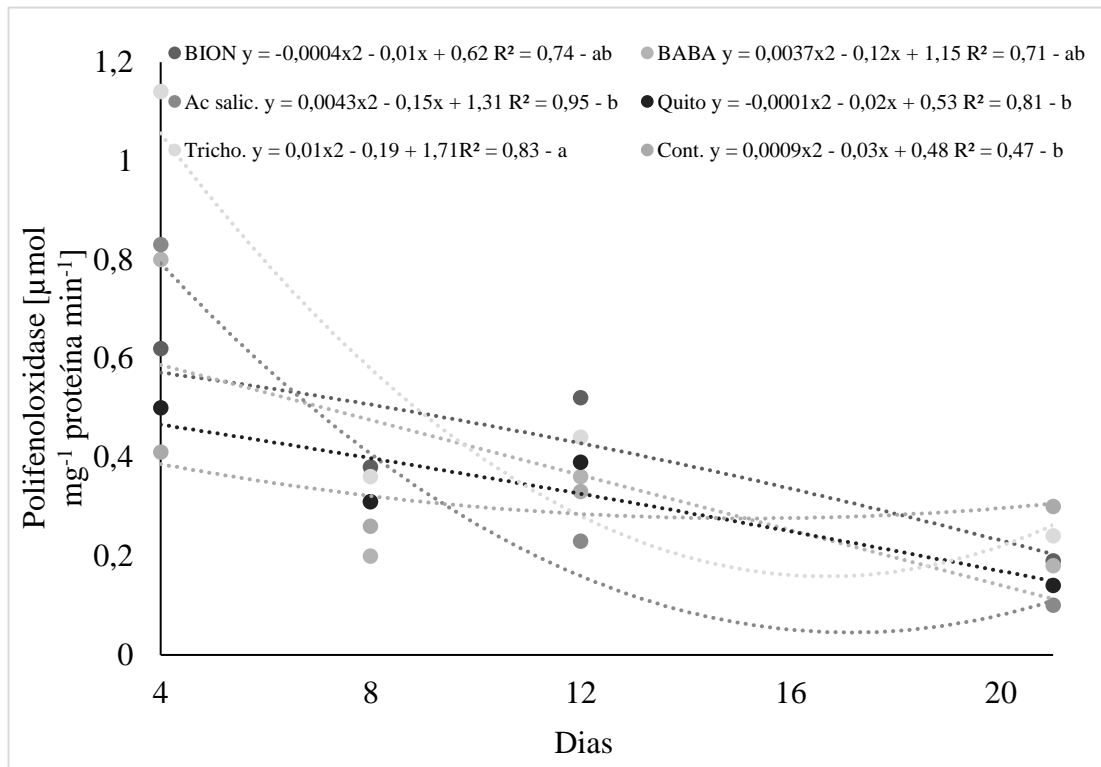


Figura 5. Atividade da polifenoloxidase em folhas de feijão caupi, após aplicação do *Colletotrichum lindemuthianum* URM 3149 e pulverização dos indutores de resistência, no decorrer de 20 dias. BION=acibenzolar-S-metil; BABA=ácido amino butírico; Ac. Salic.=ácido salicílico; Quito=quitosana; Tricho=*Trichoderma*; Cont.=controle. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A atividade da β -1,3-glucanase pode ser observada na Figura 6, mostrando que houve maior atividade com o indutor ácido salicílico, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos. No 4º dia essa enzima atingiu sua maior atividade com $6,0 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína por minuto, no 8º e 12º dia a atividade apresentou uma queda com valores de $3,0$ e $2,5 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína por minuto, respectivamente. Porém, no 20º dia a atividade enzimática voltou a subir com $3,5 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína por minuto. A super expressão de genes de β -1,3-glucanases em plantas tem aumentado a resistência das plantas a patógenos (VAN LOON et al., 2006).

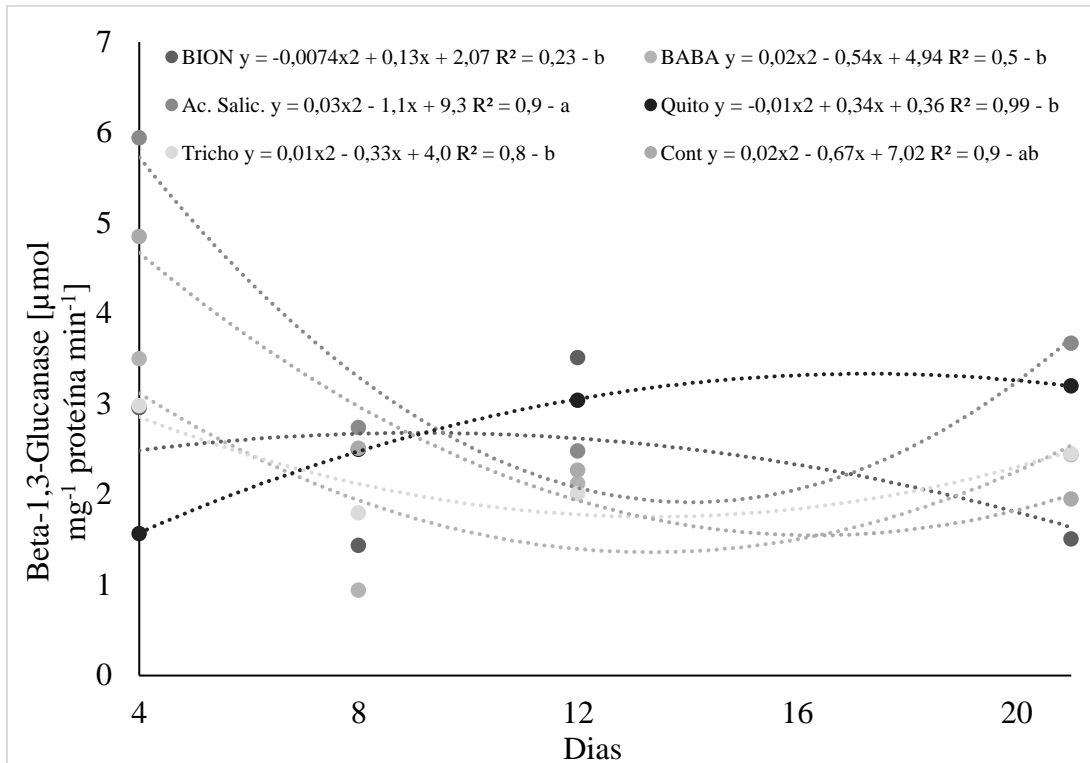


Figura 6. Atividade da beta-1,3-glucanase em folhas de feijão caupi, após aplicação do *Colletotrichum lindemuthianum* URM 3149 e pulverização dos indutores de resistência, no decorrer de 20 dias. BION=acibenzolar-S-metil; BABA=ácido amino butírico; Ac. Salic.=ácido salicílico; Quito=quitosana; Tricho=*Trichoderma*; Cont.=controle. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A atividade de peroxidase pode ser observada na Figura 7, os valores obtidos no tratamento usando apenas água (Cont.) apresentou o maior valor, porém não diferiu estatisticamente do tratamento com aplicação do ácido salicílico. Mori et al. (2001) realizaram estudos com plantas de *Vicia faba*, demonstraram que o fechamento dos estômatos foi induzido pela aplicação do ácido salicílico, e nestes tratamentos ocorreu aumento da atividade da peroxidase. As enzimas normalmente ocorrem em plantas como exoenzimas, seu aumento na atividade total é atribuído a expressão de exoenzimas específicas aparecendo depois do ataque dos patógenos (NANDAKUMAR et al., 2001).

No quarto dia a peroxidase apresentou os maiores valores, porém no oitavo dia, houve uma queda exponencial da sua atividade. Alguns papéis são sugeridos para peroxidase, esta enzima tem participação nas plantas no processo de lignificação e resposta de defesa contra o ataque de

patógenos (BLEE et al., 2001). Xue et al. (1998) apresentaram uma correlação positiva entre o aumento da atividade da peroxidase e proteção sistêmica contra *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Os demais tratamentos não diferiram significativamente entre si. Enquanto que o tratamento com o agente de controle biológico (*Trichoderma aureoviride* URM5158) mostrou-se estável após o 4º dia com valores em torno de 0,1 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína por minuto.

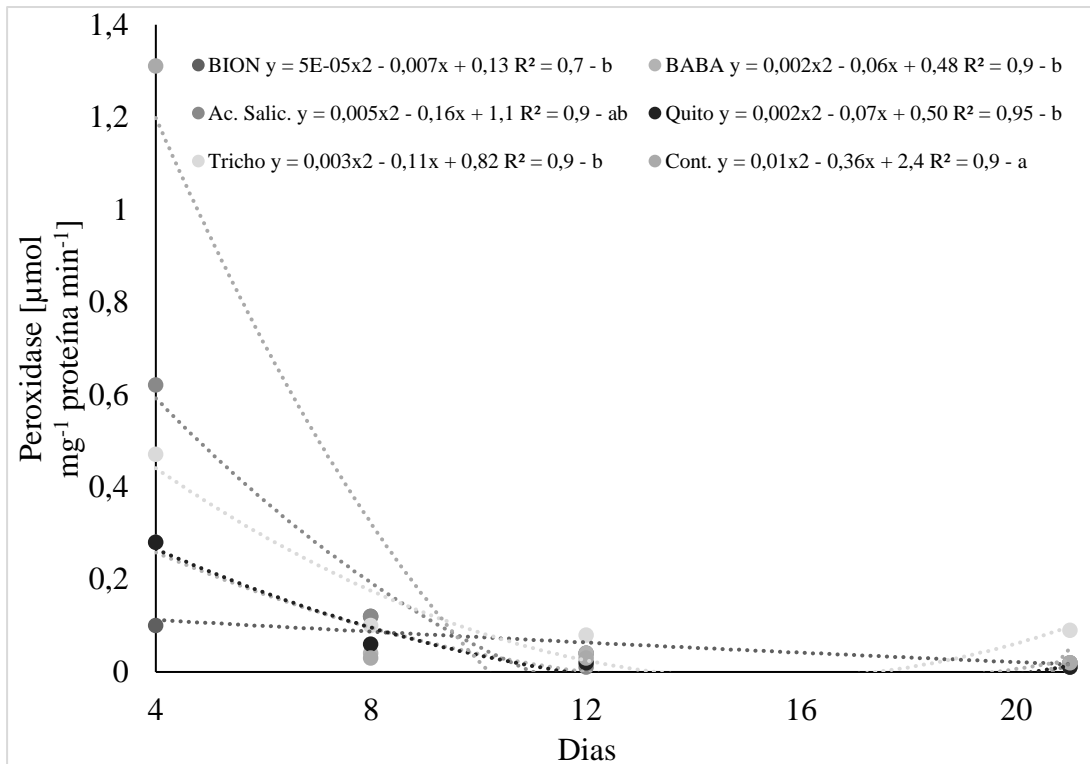


Figura 7. Atividade peroxidase em folhas de feijão caupi, após aplicação de *Colletotrichum lindemuthianum* URM 3149 e pulverização dos indutores de resistência, no decorrer de 20 dias. BION=acibenzolar-S-metil; BABA=ácido amino butírico; Ac. Salic.=ácido salicílico; Quito=quitosana; Tricho=*Trichoderma*; Cont.=controle. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A atividade da protease pode ser observada na Figura 8, após 20 dias de aplicação do patógeno, os indutores BABA e ácido salicílico apresentaram os maiores valores da atividade proteásica, cerca de, 1,0 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ de proteína por minuto. A protease é encontrada na colonização do *Trichoderma* nas plantas, a ativação das enzimas foi encontrada entre outras, na colonização das plantas com *Trichoderma* e na indução de seus metabólitos secundários das PR proteínas

ligadas a patogênicas e a síntese de fitoalexinas (DJONOVIC' et al., 2006; MORÁN-DIEZ et al., 2009).

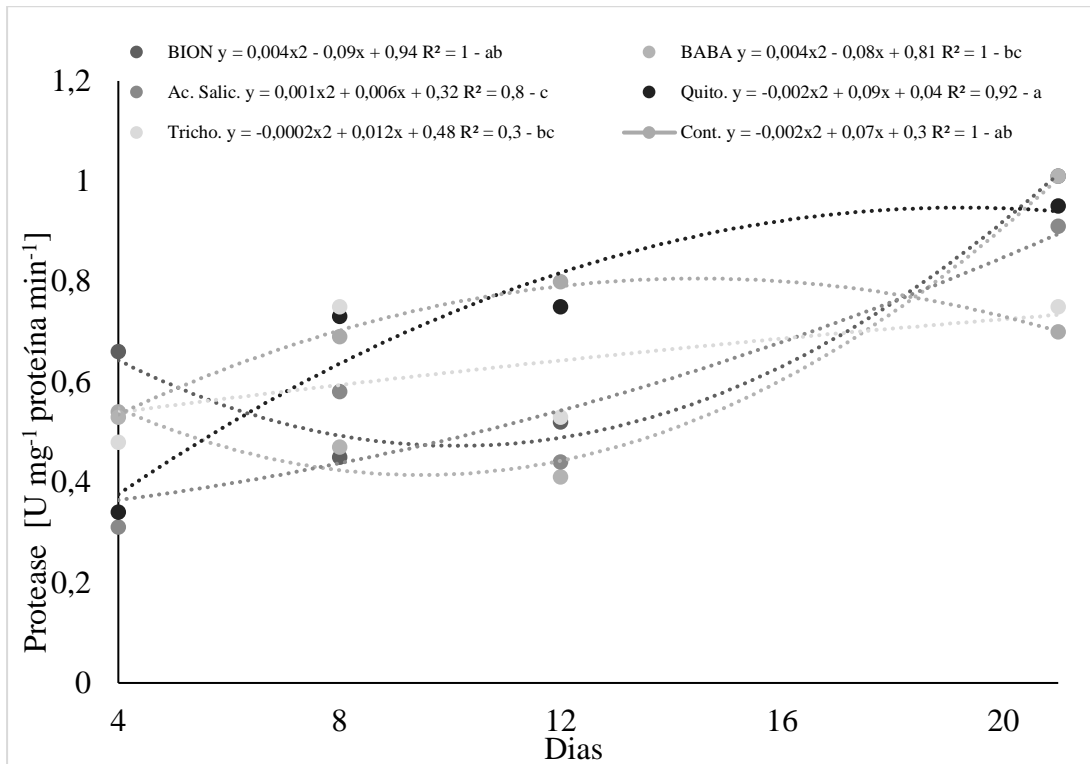


Figura 8. Atividade da protease em folhas de feijão caupi, após aplicação do *Colletotrichum lindemuthianum* URM 3149 e pulverização dos indutores de resistência, no decorrer de 20 dias. BION=acibenzolar-S-metil; BABA=ácido amino butírico; Ac. Salic.=ácido salicílico; Quito=quitosana; Tricho=*Trichoderma*; Cont.=controle. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

5. CONCLUSÕES

A espécie *Trichoderma aureoviride* URM5158 apresenta potencial antagônico ao *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149, assim como também teve maior produção de quitinase. Os indutores de resistência apresentaram resultados consistentes com relação severidade da antracnose, mostrando que o uso destes podem contribuir para uma diminuição da severidade da antracnose do feijoeiro. O ácido salicílico proporcionou maior atividade de β -1,3-glucanase, podendo ser um indicador de resistência ao *Colletotrichum lindemuthianum* URM3149.

6. REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. J. Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, v.150, p. 2029- 2035, 2004.
- AGNELLI, A. R. **Potencial de agentes indutores de resistência para o controle da bactéria *Candidatus Liberibacter asiaticus* em plantas cítricas**. Maio, p. 44. Dissertação - Fundo de Defesa da Citricultura, Araraquara, 2011.
- AGRAWAL, T.; KOTASTHANE, A. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. **SpringerPlus**, v. 1(73), p. 1-10, 2012.
- ALENCAR, R. B.; BIONDI, M. M.; PAIVA P. M. G.; VIEIRA, V. L. A.; CARVALHO JUNIOR, L. B.; BEZERRA, R. S. Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 6, p. 279-284, 2003.
- ALI, A.; ZAHID, N.; MANICKAM, S.; SIDDIQUI, Y.; ALDERSON, P. G.; AQBOOL, M. Induction of lignin and pathogenesis related proteins in dragon fruit plants in response to submicron chitosan dispersions. **Crop Protection**, v. 63, p. 83-88, 2014.
- ALVES, K. F. Controle alternativo da antracnose do pimentão com extratos vegetais. **Dissertação** (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE. p. 47, 2008.
- AL-SAEEDI, S. S.; AL-ANI, B. M. Study of antagonistic capability of *Trichoderma harzianum* isolates against some pathogenic soil borne fungi. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 5(1), p. 15-23, 2014.

- ANDRADE, C. C. L.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; MARIANO, R. L. R. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, p. 28-34, 2013.
- ANJANI KUMANI, J.; PANDA, T. Studies on critical analyses of factores influencing improved production from *Trichoderma reesei* mycelium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.14, p.214-248, 1992.
- ASHRAFIZADEH, A., ETEBARIAN, H. R., ZAMANIZADEH, H. R. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Fusarium* wilt of melon. **Iranian Journal Phytopathol**, v.41, p.39-57, 2005.
- BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v.2011, p.1-29, 2011.
- BAKER, S. E.; PERRONE, G.; RICHARDSON, N. M.; GALLO, A.; KUBICEK, C. P. Phylogenomic analysis of polyketide synthase – encoding genes in *Trichoderma*. **Microbiology**, v.158, p.147-154, 2012.
- BANDURSKA, H. M. Cieslak, The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. **Environmental and Experimental Botany**, v.94, p.9-18, 2013.
- BARKER, R., PAULITZ, T. C. Theoretical basis for microbial interactions leading to biological control of soil borne plant pathogens In: Hall R (Ed). Principals and practice of managing soilborne plant pathogens. Am. **Phytopathol. Soc. St. Paul**, Mn. pp. 50-79,1996.

- BARRETO, A. L. H., VASCONCELOS, I. M., GRANGEIRO, T. B., MELO, V. M. M., MATOS, T. E., ELOY, Y. R. G., FERNANDES, C. F., TORRES, D. C., FREIRE, FILHO, F. R., FREIRE, F. C. O., OLIVEIRA, J. T. A. Infection process and host defense responses in compatible and incompatible interactions between cowpea (*Vigna unguiculata*) and *Colletotrichum gloeosporioides*. **International Journal of Plant Sciences**, v.168, p.193-203, 2007.
- BERGER, L. R. R., STAMFORD, N. P., WILLADINO, L. G., LARANJEIRA, D., LIMA, M. A. B., MALHEIROS, S. M. M., OLIVEIRA, W. J., STAMFORD, T. S. M. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* by crustacean chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control**, v.92, p.45-54, 2016.
- BLEE, K. A.; JUPE, S. C.; RICHARD, G.; ZIMMERLIN, A.; DAVIES D. R.; BOLWELL G. P. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members of the gene family. **Plant Molecular Biology**, v.47, p.607-620, 2001.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **The Annual Review of Phytopathology**, v.60, p.379-406, 2009.
- BOUDSOCQ, M.; WILLMANN, M. R.; MCCORMACK, M.; LEE, H.; SHAN, L.; HE, P.; et al. Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. **Nature**, v.464, p.418-22, 2010.

- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BRUCE, A.; WHEATLEY, R. E.; HUMPHRIS, S. N.; HACKETT, C. A.; FLORENCE, M. E. J. Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. **Holzforschung**, v.54, p.481-486, 2005.
- CARRERAS-VILLASENOR, N., SANCHEZ-ARREGUIN, J. A., HERRERA-ESTRELLA, A. H. *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. **Microbiology**, v.158, p.3-16, 2012.
- CAUCHIE, H. M. Chitin production by arthropods in the hydrosphere. **Hydrobiology**, v.470, p.63-96, 2002.
- CEPEA/CNA. **Cereais, fibras e oleaginosas, Feijão perspectivas 2016.**
- CHANG, M.M.; HADWIGER, L. A.; HOROVITZ, D. Molecular characterization of a pea beta-1,3-glucanase induced by *Fusarium solani* and chitosan challenge. **Plant Molecular Biology**, v.20, p.609-618, 1992.
- CHAROENPORN, C.; KANOKMEDHAKUL, S.; LIN, F.; POEAIM, S.; SOYTONG K. Evaluation of bio-agent formulations to control *Fusarium* wilt of tomato. **African Journal Biotechnology**, v.9, p.5836-5844, 2010.

- CHRISTENSEN, A. B.; CHO, B. H.; NÆSBY, M.; GREGERSEN, P. L.; BRANDT, J.; MADRIZ-ORDENANA, K.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.135-44, 2002.
- COHEN, Y. β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens. **Plant Disease**, v.86, p. 448-457, 2002.
- COHEN, Y.; REUVENI, M.; BAIDER, A. Local and systemic activity of BABA (DL -3-aminobutyric acid) against *Plasmopara viticola* in grapevines. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p. 351-361, 1999.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACIAS-RODRIGUEZ, L.; BELTRAN-PENA, E.; HERRERA-ESTRELLA, A.; LOPEZ-BUCIO, J. Trichoderma-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-independent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p.1554-1563, 2011.
- DEMPSEY, M. A.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid, active oxygen species and systemic acquired resistance in plants. **Trends in Cell Biology**, v.4, p.334-338, (1994).
- DE TAPIA, M.; BERGMAN, P.; AWADE, A.; BURKARD, G. Analysis of acid extractable bean leaf proteins induced by mercuric chloride treatment and alfafa mosaic virus infection. Partial purification and characterization. **Plant Science**, v. 45, p.167-77, 1986.
- DEBONA, D.; FIGUEIROÓ, G. G.; CORTE, G. D.; NAVARINI, L.; DOMINGUES, L. D. S.; BALARDIN, R. S. Efeito do tratamento de sementes com fungicidas e acibenzolar-S-methyl no controle da ferrugem asiática e crescimento de plântulas em cultivares de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 1, p. 187-193, 2009.

- DJONOVIC, S.; POZO, M. J.; DANGOTT, L. J.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.19, p.838-853, 2006.
- DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, v.11, p.539-48, 2010.
- DUBEY, S. C.; SURESH, M.; SINGH, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* fsp. *Ciceris* for integrated management of chickpea wilt. **Biological Control**, v.40, p.118-127, 2007.
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, 1971.
- ELAD, T.; CHET, J.; KATAN, J. *Trichoderma harzianum* a biocontrol effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.70, p.119-121, 1980.
- ELAD, Y.; ZIMMAND, G.; ZAGS, Y.; ZURIEL, S.; CHET, I. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control Cucumber grey mold (*botrytis cinerea*) under commercial greenhouse condition. **Plant Pathology**, v.42, p.324-356, 1993.
- ELAD, Y.; KAPAT, A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, v.105, p.177-189, 1999.
- ELAD, Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. **Crop Protection**, v.19, p.709-714, 2000.

EMBRAPA. **Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes**. Brasília DF: Embrapa, p.627, 2º Ed, 2009.

ESPELIE, K. E.; FRANCESCHI, V. R.; KOLATTUKUDY, P. E. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue. **Plant Physiology**, v.81, p.487-492, 1986.

EZIASHI, E. I.; OMAMOR, I. B.; ODIGIE, E. E. Antagonism of *Trichoderma viridae* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. **African Journal Biotechnology**, v.6, p.388-392, 2007.

FANG, X.; CHEN, W.; XINA, Y.; ZHANG, H.; YAN, C.; YU, H.; LIU, H.; XIAO, W.; WANG, S.; ZHENG, G.; LIU, H.; JIN, L.; MA, H.; RUAN, S. Proteomic analysis of strawberry leaves infected with *Colletotrichum fragariae*. **Journal of Proteomics**. v.75, p.4074-4090, 2012.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; KOLESNIK, I.; BARBUL, O.; ZREIBIL, A.; MAYMON, M.; NITZANI, Y.; KIRSHNER, B.; RAV-DAVID, D.; BILU, A.; DAG, A.; SHAFIR, S.; ELAD, Y. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea*, and survival in strawberry. **Euro Journal Plant Pathology**, v.110, p.361-370, 2004.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. D. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, v. 1, p. 84, 2011.

FREITAS, F. C. L.; MEDEIROS, V. F. L. P.; GRANGEIRO, L. C.; SILVA, M. G. O.; NASCIMENTO, P. G. M. L.; NUNES, G. H. Interferência de plantas daninhas na cultura do feijão-caupi. **Planta Daninha**, v.27, n.2, p.241-247, 2009.

- FURTADO, L. M.; RODRIGUES, A. A. C.; ARAÚJO, V. S.; SILVA, L. L. S.; CATARINO, A. M. Utilização de Ecolife® e Acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da antracnose da banana em pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.3, p.237-239, 2010.
- GAYATRIDEVI, S.; JAYALAKSHMI, S. K.; SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.52, p.154-161, 2012.
- GIANINAZZI, S.; MARTIN, C.; VALLE'E, J. C. Hypersensibilite' aux virus, tempe'ature et prote'ines solubles chez le *Nicotiana xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolecules lors de la re'pression de la synthe`se virale. **C R Acad Science Paris**, v.6, p.270-2383, 1970.
- GO'RLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K. H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T.; WARD, E.; KESSMAN, H.; RYALS, J. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, v.8, p.629-643, 1996.
- GRAHAM, J. H.; MYERS, M. E. Soil application of SAR Inducers Imidacloprid, Thiamethoxam, and Acibenzolar-S-Methyl for citrus canker control in young grapefruit trees. **Plant Disease**, v.95, p.725-728, 2011.
- HADWIGER, L. A.; OGAWA, T.; KUYAMA, H. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.7, p.531-533, 1994.
- HAIJEGHRARI, B.; TORABI-GIGLOU, M.; MOHAMMADI, M. R.; DAVARI, M. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. **African Journal Biotechnology**, v.7, p.967-972, 2010.

- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease Journal**, v.84, p.377-393, 2000.
- HARMAN, G. E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v.96, p.190-194, 2006.
- HARMAN, G. E.; HERRERA-ESTRELLA, A. H.; HORWITZ, B. A.; LORITO, M. Special issue: *Trichoderma* – from basic biology to biotechnology. **Microbiology**, v.158, p.1-2, 2012.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and development characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiologic**, v.84, p.450-455, 1987.
- HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v.158, p.17-25, 2012.
- HONORATO JUNIOR, J.; ZAMBOLIM, L.; AUCIQUE-PEREZ, C. E.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.123, p.31-39, 2015.
- INDEX FUNGORUM disponível em:< <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=170999>> acessado em julho de 2016.
- JAGER, G.; VELVIS, H.; LAMERS, J. G.; MULDER, A.; ROOSJEN, J. Control of *Rhizoctonia solani* in potato by biological, chemical and integrated measures. **Potato-Research**, v.34, p.269-284, 1991.

- JAKAB, G.; COTTIER, V.; TOQUIN, V.; RIGOLI, G.; ZIMMERLI, L.; METRAUX, J.-P.; et al. β -aminobutyric acid-induced resistance in plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p.29-37, 2001.
- KHALILI, E. SADRAVI, M.; NAEIMI, S.; KHOSRAVI, V. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43(1), p. 297-305, 2012.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v.57, p.315-319, 1976.
- KAROLEV, N.; RAV DAVID, D.; ELAD, Y. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Biological control**, v.53, p.667-682, 2008.
- KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, v. 5, n. 6, p. 709-725, 2011.
- KASPRZEWSKA, A. Plant chitinases-Regulation and function. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.8, p.809-824, 2003.
- KELLY, J. D.; VALLEJO, V. A. A comprehensive review of the major genes conditioning resistance to anthracnose in common bean. **Horticulture Science**, v.39, p.1196-207, 2004.
- KRISTENSEN, A. K.; BRUNSTEDT, J.; NIELSEN, J. E.; MIKKELSEN, J. D.; ROEPSTORFF, P.; NIELSEN, K. K. Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.16, p.377-387, 1999.

- KOSHLAND, D. E., JR. Enzyme flexibility and enzyme action. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 54, p. 245, 1959.
- KUĆ, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v.33, p.275-297, 1995.
- LAGRIMINI L. M.; BURKHART, W.; MOYER, M.; ROTHSTEIN, S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.84, p.7542-7546, 1987.
- LEVER, M. A. New reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v.47, p.273-279, 1972.
- LI, H.; WANG, Y.; LIU, F.; YANG, Y.; WU, Z.; CAI, H.; ZHANG, Q.; WANG, Y.; LI, P. Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. **Scientia Horticulturae**, v.186, p.77-83, 2015.
- LI, G.; HUANG, H.; ACHARYA, S. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v.28, p.11-18, 2003.
- LILJEROTH, E.; BENGTTSSON, T.; WIJK, L.; ANDREASSON, E. Induced resistance in potato to *Phytophthora infestans* – effects of BABA in greenhouse and field tests with different potato varieties. **European Journal of Plant Pathology**, v.127, p.171-183, 2010.
- LIMA, C. J. G. S.; OLIVEIRA, F. D. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T.; ALMEIDA JÚNIOR, A. B. Resposta do feijão-caupi a salinidade da água de irrigação. **Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável**, Mossoró, RN, v. 2, n. 2, p.79-86, 2007.

- LORITO, M.; WOO, S. L.; FERNANDEZ, I. G.; COLUCCI, G.; HARMAN, G. E.; PINTOR-TORO, J. A.; FILIPPONE, E.; MUCCIFORA, S.; LAWRENCE, C. B.; ZOINA, A.; TUZUN, S.; SCALA, F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.95, p.7860-7865, 1998.
- MADHUSUDHAN, K. N.; DEEPAK, S. A.; PRAKASH, H. S.; AGRAWAL, G. K.; JWA, N. S.; RAKWAL, R. Acibenzolar-S-methyl (ASM)-induced resistance against tobamoviruses involves induction of RNA-Dependent RNA polymerase (RdRp) and alternative oxidase (AOX) genes. **Journal of crop science and biotechnology**, v.11, p.127-134, 2008.
- MANDELIC, S. I.; TIMPERMAN, S.; RADISEK, B.; DEVREESE, B.; SAMYN, B. Javornik, Comparative proteomic profiling in compatible and incompatible interactions between hop roots and *Verticillium albo-atrum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.68, p.23-31, 2013.
- MASTOURI, F.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Biological Control**, v.100, p.1213-1221, 2010.
- MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S.Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, v.126, p.969-980, 2006.
- MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases, **Journal of Experimental Biology**, v.206, p.4393-4412, 2003.

- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- MONREAL, L.; REESE, E. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Canadian Journal Microbiology**, v.5, p.689-696, 1969.
- MORAN-DIEZ, E.; HERMOSA, R.; AMBROSINO, P.; CARDOZA, R. E.; GUTIERREZ, S.; LORITO, M.; MONTE, E. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.22, p.1021-1031, 2009.
- MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned médium on activities of PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, v.160, p.355-360, 2001.
- MORRIS, S. W.; VERNOOIJ, B.; TITATARN, S.; STARRETT, M.; THOMAS, S.; WILTSE, C. C.; FREDERIKSEN, R. A.; BHANDHUFALCK, A.; HULBERT, S.; UKNES, S. Induced resistance responses in maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions journal**, v.11, p.643-58, 1998.
- MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in *Trichoderma* – a genomic perspective. **Microbiology**, v.158, p.35-45, 2012.
- NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.603-612, 2001.

- NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. **Biological Control**, v.67, p.149-156, 2013.
- O'DONNELL, P. J.; JONES, J. B.; ANTOINE, F. R.; CIARDI, J.; KLEE, H. J. Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. **Plant Journal**, v.25, p.315-323, 2001.
- PAPAVIZAS, G. C.; LUMSDEN, R. D. Biological control soil borne fungal propagules. **The Annual Review of Phytopathology**, v.18, p.389-413, 1980.
- PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and the potential for biocontrol. **The Annual Review of Phytopathology**, v.23, p.23-77, 1985.
- PERAZZOLLI, M.; DAGOSTIN, S.; FERRARI, A.; ELAD, Y.; PERTOT, I. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. **Biological Control**, v.47, p.228-234, 2008.
- RABEA, E.I.; STEURBAUT, W. Chemically modified chitosans as antimicrobial agents against some plant pathogenic bacteria and fungi. **Plant Production Science**, v.46, p.149-158, 2010.
- RAVA, C. A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Tropical Plant Pathology**, v.18, p.388-91, 1993.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 123-130, 2003.

- ROMANAZZI, G.; FELIZIANI, E.; SANTINI, M.; LANDI, L. Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. **Postharvest Biology and Technology**, v.75, p.24-27, 2013.
- ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas a patógenos. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; Cia, P. (Eds.). **Interação Planta-Patógeno: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba, SP. p. 411-429, 2008.
- RYDER, L. S.; HARRIS, B. D.; SOANES, D. M.; KERSHAW, M. J.; TALBOT, N. J.; THORNTON, C.R. Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. **Microbiology**, v.158, p.84-97, 2012.
- 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 Plant Pathology**, v.131, p.15-26, 2011.
- SCHUSTER, A.; SCHMOLL M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. invited review, **Applied Microbiology and Biotechnology**. Ed. 87, p. 787-99, 2010.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R. Extracts and Essential Oils of Medicinal Plants in the Resistance Induction against Plant Pathogens. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM, Cia P, Pascholati SF, Resende MLV, Romeiro RS (ed.) **Resistance induction in plants against pathogens and insects**. Piracicaba: FEALQ, pp.125-138. 2005.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extracts and Essential Oils of Medicinal Plants in the Resistance Induction against Plant Pathogens. In: Cavalcanti LS, Di Piero RM,

- Cia P, Pscholati SF, Resende MLV, Romeiro RS (ed.) **Resistance induction in plants against pathogens and insects**. Piracicaba: FEALQ, pp.125-138. 2005.
- SHARON, E.; BAR-ELAD, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of root knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.91, p.687-693, 2001.
- SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **The Annual Review of Phytopathology**, v.48, p.21-43, 2010.
- SILVA, O. F. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola - IBGE (1985- 2014), elaborado na Embrapa Arroz e Feijão Home Page, Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: julho de 2016.
- SINGH, B. N.; SINGH, A.; SINGH, S. P.; SINGH, H. B. *Trichoderma harzianum* - mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defense against *Rhizoctonia solani*. **European Journal of Plant Pathology**, v.131, p.121-134, 2011.
- STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. Plant Defense against Pathogens. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, p.18-46, 2011.
- SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p.145-171, 2003.

THAKKER, J. N.; PATEL, S.; DHANDHUKIA, P. C. Induction of defense-related enzymes in banana plants: effect of live and dead pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **ISRN Biotechnology**, v.13, p.1-6, 2013.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13, p. 43-50, 1991.

VALENTE, T. C. T. **Expressão gênica e atividade de catalase e fenilalanina e amônia liase atividades por indutores de resistência em cafeeiro**. 2012 68p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal). Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

VAN LOON, L. C. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In: DATTA, S. K., MUTHUKRISHNAN, S. editors. **Pathogenesis related proteins in plants**. Boca Raton, FL: CRC Press. p. 1–19, 1999.

VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. “Samsun” and “Samsun NN” II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. **Virology**, v.40, p.199-211, 1970

VERA, P.; CONEJERO, V. Pathogenesis-related proteins of tomato. P-69 as an alkaline endoproteinase. **Plant Physiology**, v.87, p.58-63, 1988.

VERNOOIJ, B.; UKNES, S.; WARD, E.; RYALS, J. Salicylic acid as a signal molecule in plant–pathogen interactions. **Curr Opin Cell Biology**, v.6, p.275–279, 1994.

- VIDIGAL FILHO, P. S.; GONÇALVES, V. M. C.; KELLY J. D.; KIRK, W. W. Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Paraná, **Brazilian Journal Phytopathology**, v.13, p.155-108, 2007.
- VITERBO, A.; LANDAU, U.; KIM, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. **Microbiology Letters**, v.305, p.42-48, 2010.
- WEINDLING R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, v.22, p.837, 1932.
- WHITAKER, J. R. Protein structure and kinetics of enzyme reactions: a historical perspective. In J. R. WHITAKER, A. G. J. VORAGEN; D. W. S. Wong (Eds.), **Handbook of food enzymology**, p. 1-10), 2003a.
- WHITAKER, J. R. What enzymes do why they are highly specific and eficiente catalysis'. In J. R. Whitaker, VORAGEN, A. G. J.; WONG, D. W. S. (Eds.), **Handbook of food enzymology**, p. 21-30. 2003b.
- WOO, S.L.; DONZELLI, B.; SCALA, F.; MACH, R.; HARMAN, G. E.; KUBICEK, C. P.; DEL SORBO, G.; LORITO, M. Disruption of the ech42 (endochitinase-encoding) gene affects biocontrol activity in *Trichoderma Harzianum* P1. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.12, p.419-429, 1999.
- XUE, L.; CHAREST P. M.; JABAJI-HARE, H. Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Biological Control**, v.88, p.359-365, 1998.

ZHAO, F. W.; FANG, D.; XIE, Y.; ZHAO, Z.; TANG, W.; LI, L.; NIE, S. Lv, Proteomic identification of differentially expressed proteins in *Gossypium thurberi* inoculated with cotton *Verticillium dahliae*. **Plant Science**, v.185-186, p.176-184, 2012.