

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO, INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E
CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS EM FEIJOEIRO COMUM
(*PHASEOLUS VULGARIS* L.) MEDIADOS POR *TRICHODERMA* SPP.

Priscila Pauly Ribas
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia (UERGS)
Mestre em Fitotecnia, ênfase em Fitopatologia (UFRGS)

Tese apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor
em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre - RS, Brasil
Março, 2014

“Tá tudo errado, compadre, tá tudo errado!”

Dedico ao meu avô Ervino Pauly,
que tinha tanto conhecimento sem nunca ter estudado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino de qualidade que recebi durante toda pós-graduação e a CAPES pelo apoio financeiro, que foi essencial ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores que me fizeram chegar até aqui, desde os professores do ensino fundamental aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pois todos foram inspiração para a busca dos meus objetivos. Agradeço em especial às professoras Dra. Sueli T. Van Der Sand e Dra. Aida T.S. Matsumura, minhas orientadoras, que dedicaram muito de suas vidas, de seu tempo no desenvolvimento do meu projeto. Agradeço também ao professor Dr. Enilson L.S. de Sá, pelo apoio durante a realização dos experimentos em casa de vegetação e a professora Dra. Rosane Rech pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos da Micro, dos Solos, da Biofábrica, obrigada pelo carinho e apoio. Agradeço especialmente ao “Seu Zé” e ao técnico de laboratório Márcio Silveira que me ajudaram muito na reta final deste trabalho.

Não tenho palavras para agradecer, mais uma vez e sempre a minha mãe, Maria Lúcia Pauly, que sempre prezou pela minha educação e esteve ao meu lado dando suporte, incentivo e amor, todos os dias da minha vida, muitas vezes abdicando dos seus sonhos para realizar os meus.

Ao Jonas O.M. Osório, que esteve ao lado durante toda esta caminhada, não sei por onde começar... obrigada pelo carinho, compreensão, pela calma na hora do meu estresse, pelo incentivo e mais uma vez, obrigada pelos conhecimentos em informática!! Agradeço também a tua família, por ser aqui, um pouquinho da minha.

Agradeço aos tios e primos, que perto ou longe sempre são a força que eu preciso para recuperar a certeza de que por mais longe que se vá sempre tem alguém esperando a gente voltar pra casa. Aos afilhados, Artur Muller, Gustavo Pauly e Pedro Henrique Muller que me fazem recuperar as energias toda vez que me abraçam. Aos amigos que me acompanham há anos, o “bando” da UERGS, vocês fazem parte dos melhores momentos da minha vida.

Théo, Joe e Luiggi, companheiros inseparáveis...

Ao Senhor por nunca me desamparar!

Promoção de crescimento, indução de resistência e controle biológico de fitopatógenos em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) mediados por *Trichoderma* spp.⁽¹⁾

Autor: Priscila Pauly Ribas
Orientador: Sueli T. Van Der Sand
Co-orientador: Aida T. Santos Matsumura

RESUMO: As espécies de *Trichoderma* incluem muitos isolados com importância agrônômica empregados principalmente como agentes de controle biológico. Pesquisas recentes vêm demonstrando a capacidade de alguns isolados atuarem na promoção de crescimento e na indução de resistência em diferentes culturas. Este trabalho teve como objetivo avaliar isolados de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento das plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Isolados de três espécies de *Trichoderma* (*T. asperellum*, *T. harzianum* e *T. viride*) foram testados verificando a atividade destes isolados no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e a capacidade destes em: produzir ácido indol acético (AIA), sideróforos e solubilizar fosfato *in vitro*, bem como interagir com um inoculante de rizóbio na promoção do crescimento em casa de vegetação e atuarem na imunização das plantas tratadas. Todos os isolados produziram metabólitos voláteis, enzimas hidrolíticas, AIA, sideróforos e solubilizaram fosfato *in vitro*. *Trichoderma* spp. aumentou a porcentagem de germinação e vigor das sementes tratadas, entretanto o efeito na promoção de crescimento não foi comprovado. A atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase foi maior em plantas tratadas com *Trichoderma* spp. Os resultados demonstram que a seleção pode direcionar aqueles isolados que podem ser empregados na agricultura de acordo com suas características e pode ser uma solução para garantir o sucesso da aplicação no campo.

⁽¹⁾Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia do Controle Biológico, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (129p.) Março, 2014

Growth promotion, resistance induction and biological control of common beans
(*Phaseolus vulgaris* L.) phytopathogens by *Trichoderma* spp. ⁽¹⁾

Author: Priscila Pauly Ribas
Adviser: Sueli T. Van Der Sand
Co-adviser: Aida T. Santos Matsumura

ABSTRACT: *Trichoderma* species includes many important agricultural isolates, mainly deployed as biological control agents. Recent researches has demonstrated the ability of some isolates to act in growth promotion and immunity induction in different crops. This work aimed to evaluate *Trichoderma* spp. isolates in common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) development. Strains of three *Trichoderma* species (*T. asperellum*, *T. harzianum* and *T. viride*) were tested by verifying the activity of these strains on *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* and *Sclerotinia sclerotiorum* control and their abilities on indol acetic acid (IAA) and siderophores production and phosphate *in vitro* solubilization. Their interacting with rhizobia inoculant in growth promotion in greenhouse condition and acting in treated plants immunization was also evaluated. All strains produced volatile metabolites, hydrolytic enzymes, IAA, siderophores and they solubilized phosphate *in vitro*. *Trichoderma* spp. increased the percentage of germination and vigor in treated seeds. However, the effect in growth promotion was not proven. The enzymatic activity of peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase was higher in plants treated with *Trichoderma* spp. The results demonstrated that selection can target those strains that can be deployed in agriculture in according to their characteristics and can be a solution to ensure the success on field application.

⁽¹⁾Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (129p.) March, 2014.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Microrganismos benéficos como agentes de controle biológico de fitopatógenos.....	6
2.2 Microrganismos benéficos como agentes de promoção de crescimento vegetal.....	8
2.2.1 Mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal.....	9
2.2.1.1 Produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal.....	10
2.2.1.2 Disponibilização de nutrientes para as plantas.....	12
2.3 Indução de resistência na planta.....	13
2.4 Características do gênero <i>Trichoderma</i> sp.....	14
2.4.1 <i>Trichoderma</i> spp. como agentes de controle biológico de fitopatógenos.....	16
2.4.2 <i>Trichoderma</i> spp. como agentes de promoção de crescimento.....	20
2.4.3 <i>Trichoderma</i> spp. como eliciador de indução de resistência na planta.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4. ARTIGOS	29
4.1 ARTIGO 1: Caracterização de isolados de <i>Trichoderma</i> e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro <i>in vitro</i>	30
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e métodos.....	34
Resultados e discussão.....	37
Conclusões.....	42
Referências.....	42
Tabelas e figuras.....	47
4.2 ARTIGO 2: Potencial <i>in vitro</i> para solubilização de fosfato por <i>Trichoderma</i> spp.....	50
Resumo.....	52
Abstract.....	53
Introdução.....	54
Material e métodos.....	55
Seleção de isolados de <i>Trichoderma</i> spp.....	55
Solubilização de fosfato.....	56
Determinação da concentração enzimática da fosfatase....	56
Determinação do tipo de fosfatase produzida.....	57
Análise estatística.	58

Resultados e discussão.....	58
Solubilização de fosfato.....	58
Determinação da concentração enzimática da fosfatase...	62
Conclusão.....	64
Referências bibliográficas.....	65
Lista de Tabelas e figuras.....	70
4.3 ARTIGO 3: Inoculação de <i>Trichoderma</i> spp. na promoção de crescimento e nutrição em feijoeiro.....	75
Resumo.....	76
Abstract.....	77
Introdução.....	78
Material e métodos.....	80
Resultados e discussão.....	83
Conclusões.....	86
Referências.....	86
Tabelas e figuras.....	91
4.4 ARTIGO 4: Detecção de enzimas relacionadas com a indução de resistência em feijoeiro comum após inoculação de <i>Trichoderma</i> spp.....	95
Resumo.....	96
Abstract.....	97
Introdução.....	98
Material e métodos.....	99
Resultados e Discussão.....	102
Conclusões.....	105
Referências bibliográficas.....	106
Lista de figuras.....	109
5. DISCUSSÃO.....	113
6. CONCLUSÕES.....	118
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

LISTA DE TABELAS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1. Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. utilizados nos experimentos de caracterização, potencial antagônico, solubilização de fosfato, promoção de crescimento e nutrição vegetal e indução de resistência.....	28
--	----

4. ARTIGOS

4.1 ARTIGO 1: Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro *in vitro*

Tabela 1. Produção de enzimas hidrolíticas por diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> spp. <i>in vitro</i>	48
Tabela 2. Antagonismo e inibição de crescimento de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>phaseoli</i> (<i>F. oxysporum</i>) e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (<i>S. sclerotiorum</i>) por <i>Trichoderma</i> spp. e sua capacidade de produção de sideróforos.....	49

4.2 ARTIGO 2: Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp.

Tabela 1. Solubilização de fosfato de cálcio (10 g.L ⁻¹) em meio PVK por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes intervalos de tempo (h).....	72
Tabela 2. pH do meio PVK, após a inoculação de isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes intervalos de tempo (h).....	73
Tabela 3. Produção de enzimas fosfatase em meio BDA e tipo de fosfatase pro por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes intervalos de tempo (h) ¹ e tipo de fosfatase produzida.....	74

4.3 ARTIGO 3: Inoculação de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento e nutrição em feijoeiro

Tabela 1. Relação de tratamentos aplicados nos experimentos de germinação e vigor de sementes e promoção de crescimento e nutrição vegetal em casa de vegetação.....	91
Tabela 2. Porcentagem de germinação e vigor de sementes de feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) após diferentes tratamentos com <i>Trichoderma</i> spp. e inoculante.....	92
Tabela 3. Avaliação nutricional das plantas de feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) submetidas à diferentes tratamentos com <i>Trichoderma</i> spp. e inoculante.....	93

LISTA DE FIGURAS

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Mecanismos envolvidos no controle biológico por *Trichoderma* spp. (a) Micoparasitismo (b) competição por espaço (c) produção de metabólitos e competição por nutrientes. Fonte: Verma et al., 2007..... 17
- Figura 2.** Penetração e formação do haustório de *Trichoderma virens* (hifa menor) em *Rhizoctonia solani* (Hifa maior). Fonte: Howell, 2003..... 19
- Figura 3.** Resposta de crescimento de *Arabidopsis* a *Trichoderma virens* e sua regulação..... 22
- Figura 4.** Esquema de absorção de Fe através de sideróforos micobianos pelas plantas, segundo teoria proposta por Loper & Buyer, 1991..... 24

4. ARTIGOS

4.1 ARTIGO 1: Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológico de patógenos do feijoeiro *in vitro*

- Figura 1.** Produção de ácido indol acético (AIA) por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. Barras seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente de acordo com o teste de Tukey 5 %..... 47

4.2 ARTIGO 2: Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp.

- Figura 1.** Relação entre a solubilização de fosfato com o pH do meio para os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21. Equação de regressão: $y = - 94,01x + 576,62$, $r = - 0,72^*$. *Correlação negativa significativa ($p < 0,05$) 70
- Figura 2.** Relação entre a solubilização de fosfato e concentração de fosfatases para os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21. Equações de regressão: (A): $y = 19,587x - 89,50$, $r = 0,63^*$. *Correlação negativa significativa ($p < 0,05$)..... 71

4.3 ARTIGO 3: Inoculação de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento e nutrição em feijoeiro

Figura 1. Comprimento médio (cm) da parte aérea e comprimento médio (cm) radicular de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas a diferentes tratamentos. Comprimento parte aérea: Barras seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Comprimento radicular: Não houve diferença significativa entre os tratamentos..... 94

...

4.4 ARTIGO 4: Detecção de enzimas relacionadas com a imunização de feijoeiro comum após inoculação de *Trichoderma* spp.

Figura 1. Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g g}^{-1}$) obtidas através da concentração de BSA (μg) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas 16 e 32 dias após a inoculação (DAI). Tratamentos com * sobre as barras não apresentaram diferença significativa em relação a concentração de proteínas totais em relação ao tempo de avaliação pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na concentração de proteínas totais na avaliação realizada em 16 DAI pelo teste de Tukey 5 %. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na concentração de proteínas totais na avaliação realizada em 32 DAI pelo teste de Tukey 5 %..... 109

Figura 2. Atividade de peroxidase ($\text{U mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas 16 e 32 dias após a inoculação (DAI). Tratamentos com * sobre as barras não apresentaram diferença significativa em relação a atividade de peroxidase em relação ao tempo de avaliação pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na atividade de peroxidases na avaliação realizada em 16 DAI pelo teste de Tukey 5 %. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na atividade de peroxidases na avaliação realizada em 32 DAI pelo teste de Tukey 5 %..... 110

- Figura 3.** Atividade de polifenol oxidase ($U\ mg^{-1}\ min^{-1}$) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas 16 e 32 dias após a inoculação (DAI). Tratamentos com * sobre as barras não apresentaram diferença significativa em relação a atividade de polifenol oxidase em relação ao tempo de avaliação pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na atividade de polifenol oxidase na avaliação realizada em 16 DAI pelo teste de Tukey 5 %. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na atividade de polifenol oxidase na avaliação realizada em 32 DAI pelo teste de Tukey 5 %..... 111
- Figura 4.** Atividade de fenilalanina amônia-liase ($U\ \mu moles\ mg^{-1}\ min^{-1}$) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas 16 e 32 dias após a inoculação (DAI). Tratamentos com * sobre as barras não apresentaram diferença significativa em relação a atividade de fenilalanina amônia-liase em relação ao tempo de avaliação pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na atividade de fenilalanina amônia-liase na avaliação realizada em 16 DAI pelo teste de Tukey 5 %. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na atividade de fenilalanina amônia-liase na avaliação realizada em 32 DAI pelo teste de Tukey 5 %..... 112

5. DISCUSSÃO

- Figura 5.** Antagonismo de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. (A) Isolado ICB12 sobrepondo a colônia de FOPEM (B) Isolado ICB14 inibindo o crescimento de FOPEM sem que haja contato direto entre os dois isolados..... 115
- Figura 6.** Plantas de feijoeiro comum tratadas com a inoculação de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. Em todas as fotos, a ordem da esquerda para a direita corresponde ao tratamento C1 (sem nenhum tratamento), C2 (testemunha nitrogenada), C3 (mix de isolados de *Trichoderma* spp.), C4 (mix de isolados de *Trichoderma* spp. e o inoculante) e a planta mais à direita corresponde ao tratamento. (A) ICB02; (B) ICB03; (C) ICB05; (D) ICB06; (E) ICB07; (F) ICB08; (G) ICB11; (H) ICB13; (I) ICB14; (J) ICB16; (L) ICB17; (M) ICB18; (N) ICB25..... 117

1. INTRODUÇÃO

A consciência de que o uso intensivo de agrotóxicos na agricultura tem promovido diversos problemas de ordem ambiental tem aumentado a necessidade de se investigar métodos alternativos de produção de insumos, como fertilizantes e agrotóxicos, adotando formas que sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivas à saúde humana e ao equilíbrio dos ecossistemas.

Durante o manejo da cultura no campo é possível desenvolver práticas a partir de conceitos biológicos, encontrando uma forma, a mais inócua possível, de ativar os mecanismos de controle biológico, promoção de crescimento e defesa da planta, deixando que ela própria, com a interação do meio, se desenvolva e se proteja contra patógenos, ao invés de saturá-la e intoxicá-la com produtos químicos.

O solo abriga, de uma forma geral, uma heterogênea e diversificada comunidade biológica, da qual microrganismos eucariotos e procariotos constituem a maioria, tanto em número quanto em multiplicidade. Entre eles, destaca-se o gênero de fungos *Trichoderma*, comumente encontrados na

microbiota da maioria dos tipos de solo, especialmente nos ricos em matéria orgânica, por ser um decompositor desse tipo de material. Esse fungo é conhecido como micoparásita necrotrófico eficaz no controle de inúmeros patógenos, principalmente fitopatógenos de solo, como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* sp., *Sclerotium rolfsii* e *Pythium* sp.

Os mecanismos envolvidos na ação antagonística de *Trichoderma* sp. são bem estudados e conhecidos. Por esse motivo, existem inúmeros produtos à base de *Trichoderma* spp. comercializados para aplicação em casa de vegetação e campo, tanto no Brasil como em diferentes países. A produção de biopesticidas à base de *Trichoderma* spp. representa 60% dos biopesticidas fúngicos produzidos no mundo. Somente no Brasil, são comercializadas aproximadamente 11 diferentes produtos desses biopesticidas. O estado do Rio Grande do Sul merece destaque no cenário nacional de biopesticidas a base de *Trichoderma* spp., já que contribui com quatro produtos, fabricados em diferentes cidades do estado (Venâncio Aires, Caxias do Sul, Santa Cruz do Sul e Porto Alegre).

Pesquisas recentes vêm demonstrando o potencial dessas espécies em aplicações biotecnológicas variadas, entre as quais muitas aplicadas à agricultura, como a biorremediação de solos contaminados com produtos químicos e a promoção de crescimento de plantas. A literatura disponível demonstra a ação de *Trichoderma* sp. na promoção do crescimento vegetal e, como eliciador dos mecanismos de defesa nas plantas, mostrando que o uso de produtos biológicos como uma alternativa aos produtos químicos pode ir além do efeito fungicida. Recentemente, foi registrado junto ao Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o primeiro produto (ICB NUTRISOLO TRICHODERMA) contendo uma associação de espécies de *Trichoderma* como inoculante agrícola, explorando uma nova perspectiva em pesquisa e comércio de produtos biológicos.

A ampla gama de ação, o elevado potencial de mercado e importância ambiental bem como social da aplicação de bioprodutos, tornam as pesquisas em conhecimentos biológicos do microrganismo benéfico, na otimização das formas de aplicação do produto e nos mecanismos envolvidos nos diferentes processos imprescindíveis para garantir a eficiência e o sucesso da utilização desses produtos.

Com a hipótese de que espécies de *Trichoderma* possam interferir no desenvolvimento das plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), auxiliando no controle biológico de fitopatógenos importantes na cultura, promovendo o crescimento vegetal e induzindo os mecanismos de defesa na planta, este trabalho teve como objetivos:

1. Verificar a eficiência de *Trichoderma* spp. no antagonismo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*;
2. Avaliar a produção de auxinas, como o ácido indol acético por *Trichoderma* spp. *in vitro*;
3. Avaliar a capacidade de *Trichoderma* spp. na captação de nutrientes do solo, pela produção de sideróforos e solubilização de fosfatos *in vitro*;
4. Avaliar a eficiência de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento e nutrição do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em casa de vegetação;

5. Avaliar a eficiência de *Trichoderma* spp. atuar como eliciador dos mecanismos de defesa contra fitopatógenos em feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em casa de vegetação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O crescimento populacional ao longo dos tempos teve como consequência o aumento da demanda por alimentos. Esta demanda estimulou os agricultores a produzirem alimentos em grande quantidade com o monocultivo intenso e em grandes áreas (SOUZA & DUTRA, 2003).

Dentre as principais monoculturas implantadas, a cultura do feijão tem grande importância social e econômica, já que é um dos alimentos básicos de vários povos, principalmente o brasileiro, constituindo uma das principais fontes de proteína vegetal, presente em 94% dos pratos consumidos no país (BARBOSA, 2007). O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, com a produtividade na safra 2012/2013 avaliada em 2.829,1 mil t, em 3.061,2 mil ha com um rendimento médio de 924 kg/ha (CONAB, 2013).

Para manter ou aumentar a produtividade das culturas, já que os nutrientes do solo passam a ser limitados e com o surgimento de epidemias, a agricultura passou a depender de insumos químicos, como fertilizantes e agrotóxicos (FRIGUETTO, 1997; BERG, 2009). Entretanto, a utilização dos

produtos químicos sem amparo técnico aos produtores rurais, que até hoje realizam aplicações desnecessárias, em volumes maiores do que o recomendado e sem indicação de um agrônomo, têm provocado diversos impactos ambientais e na saúde do homem (GUNNEL, et al., 2007; LEACH & MUMFORD, 2008; BERG, 2009).

A divulgação desses problemas vem despertando a atenção da sociedade para o uso abusivo na agricultura dos produtos que provocam contaminação do ambiente e da cadeia alimentar, incentivando a busca por alimentos produzidos sem o uso de produtos químicos, principalmente os agrotóxicos, levando ao desenvolvimento de sistemas de cultivo sustentáveis, que envolvam o manejo adequado dos recursos naturais, evitando a degradação do ambiente de forma a garantir a satisfação das necessidades humanas das gerações atuais e futuras (BIRD et al., 1990).

Os sistemas de proteção de plantas que visam reduzir a quantidade de produtos químicos aplicados em campo buscam obter vantagens nas interações de ocorrência natural, dando ênfase ao manejo das relações biológicas, como aquelas entre pragas e predadores, e em processos naturais, como a fixação biológica do nitrogênio e uso de inoculantes no campo ao invés do uso de métodos químicos (BETTIOL & GHINI, 2003).

2.1 Microrganismos benéficos como agentes de controle biológico de fitopatógenos

Interações entre microrganismos que compartilham um nicho ecológico revestem-se de características fundamentalmente competitivas. Entre

a microbiota circundante, a relação entre os microrganismos é quase sempre hostil, por produzir e liberar no meio substâncias antibióticas, por competir por água e nutrientes, por sequestrar íons importantes e, eventualmente, até mesmo por predação e hiperparasitar outros microrganismos (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004; ROMEIRO, 2007 a). O potencial antagônico de um microrganismo pode ser definido como a sua capacidade de atuar negativamente sobre os fitopatógenos. O controle é realizado através da ação antagonística expressa pela antibiose, micoparasitismo e competição (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004).

A antibiose ocorre durante interações envolvendo compostos de baixo peso molecular difusíveis ou antibióticos produzidos pelos microrganismos, que inibem o crescimento de outros microrganismos. O micoparasitismo é o ataque direto de um fungo a outro, e é um processo complexo que envolve uma série de eventos sequenciais, incluindo reconhecimento, ataque, penetração e morte do hospedeiro. A competição pode envolver a agilidade em um microrganismo se desenvolver e colonizar a rizosfera de uma planta, inibindo a colonização de outro microrganismo, bem como pela habilidade de competir pelos nutrientes presentes no ambiente, principalmente pela captação de nutrientes indisponíveis para o consumo sem que exista uma intervenção química do microrganismo (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004).

2.2 Microrganismos benéficos como agentes de promoção de crescimento vegetal

O crescimento das plantas é influenciado por incontáveis fatores, bióticos ou abióticos, e, tradicionalmente os agricultores lançam mão de procedimentos físicos e químicos para alterar benéficamente as propriedades e as características do solo, com intuito de aumentar a produtividade (BERG, 2009). A biotecnologia vegetal tem contribuído para o desenvolvimento de novas variedades com elevado índice de resistência a patógenos, seca e tolerância a sal (BOHNERT et al., 1996; DE SOUZA et al., 2006; ASHRAF, 2010; KAJALA et al., 2011).

Ao longo dos últimos 150 anos, as pesquisas vêm demonstrando repetidamente que bactérias e fungos são capazes de manter uma interação íntima com suas plantas hospedeiras e também são capazes de promover o crescimento da planta bem como suprimir fitopatógenos (WHIPPS, 2001; THAKORE, 2006; AMBARDAR & VAKHLU, 2013). Entretanto, a dispensa no solo de microrganismos benéficos com esta finalidade ainda é pouco comum (ROMEIRO, 2007 a). Uma das poucas exceções é o uso de espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* como inoculantes fixadores de nitrogênio, prática mundialmente conhecida e utilizada nos Estados Unidos há mais de cem anos (BASHAN, 1998).

A aplicação de microrganismos no campo requer um estudo da compatibilidade microrganismo-hospedeiro, já que a sua morfologia e a produção de metabólitos secundários específicos podem conferir e eles certa especificidade por espécie(s) de planta(s) (BERG & SMALLA, 2009). Esse fato

não reduz a possibilidade de encontrarmos microrganismos compatíveis, já que todos os microambientes associados às plantas, especialmente na rizosfera são colonizados por uma ampla gama de microrganismos (BERG, et al., 2005) e destes entre 1 e 35 % demonstraram capacidade de inibir fitopatógenos *in vitro* (BERG, et al., 2002, BERG, et al., 2006) e mais de dois terços da população microbiana cultivável demonstra capacidade de atuar como promotor de crescimento vegetal (CATTELAN, et al., 1999; FÜRNKRANZ, et al., 2009).

Dentre os microrganismos com ação conhecida na promoção de crescimento vegetal estão as bactérias promotoras do crescimento vegetal, também conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (PBPRs), e se destacam os gêneros *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. (POWELL, et al., 1994). Entretanto, outros microrganismos, como diferentes gêneros de fungos e actinomicetes podem atuar na promoção de crescimento vegetal (WHITELAW, et al., 1999; NIMNOI, et al., 2010).

2.2.1 Mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal

Diversos mecanismos estão envolvidos nas interações planta-microrganismos (WHIPPS, 2001; COMPANT, et al., 2005). Estas interações dependem diretamente da competência dos microrganismos em colonizar o habitat, como a rizosfera, por exemplo (LUGTENBERG, et al., 2002; HOWELL, 2003; KAMILOVA, et al., 2005).

A rizosfera é um nicho ecológico que suporta uma ampla gama de microrganismos já que a região em volta da raiz é relativamente rica em nutrientes, pois, mais de 40% dos produtos fotossintéticos das plantas são

perdidos pelas raízes (BAIS, et al., 2006). Conforme Bowen & Rovira (1999), a importância da microbiota da rizosfera para a planta é indiscutível para a saúde do sistema radicular, absorção de nutrientes e para a tolerância a adversidades do ambiente. Os passos para a colonização e as diversas estratégias para estabelecer as interações entre planta-microrganismo incluem reconhecimento, aderência, invasão (apenas para endófitos e patógenos), colonização e crescimento. As raízes das plantas iniciam a interação com os microrganismos do solo pela produção de sinais que são reconhecidos pelos microrganismos, que, em troca produzem os sinais para iniciar a colonização (BAIS, et al., 2006; HARMAN et al., 2004). Os microrganismos móveis são preferidos para participar e reagir nessa interação. (LUGTENBERG, et al., 2002).

Quando tratamos das interações entre microrganismos e o ambiente, estudos indicam que essas interações microbianas podem apresentar caráter neutro, benéfico ou detrimental (BETTIOL, 1991), e são elas que determinam o equilíbrio ecológico entre determinados microrganismos em um habitat (HENIS & CHET, 1975). A ação de diversos microrganismos como promotores de crescimento já é descrita por diversos autores (ROMEIRO, 2007a; CONTRERAS-CORNEJO, et al., 2009; BERG, 2009).

2.2.1.1 Produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal

Microrganismos são capazes de atuar na produção de metabólitos reguladores de crescimento (BERG, 2009). Entre as substâncias reguladoras do crescimento conhecidas destacam-se o grupo das auxinas, que são substâncias que têm em comum a capacidade de atuar na expansão e no alongamento

celular, ajudando também na divisão celular em culturas de tecidos, principalmente no enraizamento (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Ácido indol-acético (AIA), etileno, citoquininas e giberelinas são exemplos de auxinas, hormônios que desempenham um importante papel como reguladores do crescimento (BENÍTEZ et al., 2004; BERG, 2009). Esses hormônios podem ser sintetizados pelas próprias plantas e também através de sua associação com microrganismos (BERG, 2009).

A auxina com maior relevância fisiológica é o AIA, uma auxina natural comumente encontrada nas plantas que apresenta efeito positivo no crescimento das raízes que possibilita que a planta tenha acesso a uma maior quantidade de nutrientes no solo (VESSEY, 2003). Segundo Gravel et al. (2007), o envolvimento do AIA na complexa interação entre a microflora rizosférica e a planta hospedeira requer uma constante troca de materiais e sinais e tem sido alvo de inúmeros trabalhos (COSTACURTA & VANDERLEYDEN, 1995; PATTERN & GLICK, 1996; PERSELLO-CARTIEAUX et al., 2003).

Os tecidos radiculares são essencialmente sensíveis a diferentes concentrações do AIA e podem ser bastante afetados por fontes externas deste regulador de crescimento, incluindo fontes microbianas (TANIMOTO, 2005). As concentrações exógenas de AIA na rizosfera das plantas podem causar efeito negativo quando em excesso, inibindo o crescimento das raízes (XIE et al., 1996). Esse efeito negativo pode ser minimizado por microrganismos que degradem auxina e proporcionem melhores condições para o desenvolvimento foliar (GRAVEL et al., 2007).

2.2.1.2 Disponibilização de nutrientes para as plantas

Nutrientes minerais são elementos obtidos do solo principalmente na forma de íons inorgânicos. O suprimento inadequado de um elemento essencial provoca um distúrbio nutricional que se manifesta por sintomas característicos na planta. A eficiência de alguns isolados microbianos na disponibilização de nutrientes inacessíveis para a planta contribui na redução dos danos provocados pela deficiência dos mesmos (TAIZ & ZEIGER, 2009). O ferro e o fósforo são nutrientes essenciais para a nutrição e desenvolvimento das plantas, entretanto, na maior parte das vezes estão indisponíveis no solo (ROMEIRO, 2007a).

O ferro tem um importante papel como componente de enzimas envolvidas na transferência de elétrons, como os citocromos. A deficiência desse nutriente é responsável pela clorose entre as nervuras de folhas jovens, tornando as folhas brancas, pela ineficiência na síntese de alguns complexos constituídos por clorofila e proteína no cloroplasto (TAIZ & ZEIGER, 2009). O Fe^{++} é mais facilmente absorvido, embora exista no solo predominantemente na forma oxidada (Fe^{+++}). Muitos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, produzem sideróforos, que são pigmentos extracelulares que seqüestram Fe^{+++} , indisponibilizando o micronutriente no meio, transportando o ferro para o interior das células, onde o ferro é sintetizado (HERNÁNDEZ et al., 2004; ROMEIRO, 2007b). Os trabalhos de Bar-Ness, et al. (1992) e Wang, et al. (1993) evidenciam a capacidade das plantas de absorver o complexo sideróforo- Fe^{+++} dos microrganismos.

O fósforo é um componente integral de compostos importantes na célula vegetal, incluindo fosfato-açúcares, intermediários da respiração e

fotossíntese, bem como os fosfolipídeos que compõem as membranas vegetais. Ele também é um componente de nucleotídeos utilizados no metabolismo energético das plantas (como ATP) e no DNA e RNA. Sintomas característicos da deficiência de fósforo incluem crescimento reduzido em plantas jovens e uma coloração verde-escura das folhas, que podem ser malformadas e conter pequenas manchas necróticas (TAIZ & ZEIGER, 2009).

Alguns microrganismos, principalmente fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* são capazes de liberar P de compostos inorgânicos insolúveis. Os mecanismos envolvidos na solubilização variam não apenas de acordo com o microrganismo testado, mas também é dependente da fonte de carbono utilizada (MENDES et al., 2004), podendo acontecer através da acidificação do meio, da produção de ácidos orgânicos que agem solubilizando o mineral, ou através da produção de fosfatases, enzimas que liberam o radical fosfato da matéria orgânica (PAL, et al., 2004; ASERI et al., 2009; KAPRI & TEWARI, 2010; MENDES et al., 2014). Segundo Richardson (2001), a solubilização de fosfatos na rizosfera é o modo mais comum de ação dos microrganismos promotores de crescimento vegetal que atuam disponibilizando nutrientes para as plantas.

2.3 Indução de resistência na planta

De forma indireta, a presença dos microrganismos no rizoplane atua como eliciador na indução de resistência da planta, desencadeando a síntese de substâncias que agem como sinais bioquímicos, que se difundem por toda a planta, ativando genes de resistência que estavam inativos que se expressam para a síntese de componentes de resistência (ROMEIRO, 2007a).

Em qualquer circunstância, plantas expostas a eliciadores de resistência apresentam um aumento nas atividades enzimáticas envolvidas em rotas de percepção da presença de patógenos em potencial, rotas de sinalização bioquímica a pontos distantes do sítio onde o sinal foi originado e, por consequência, aumentos nas atividades de enzimas envolvidas na síntese de componentes da resistência que se expressa (HERNÁNDEZ et al., 2004; ROMEIRO, 2007b).

Estão envolvidos nesse processo as enzimas conhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (PR ou PRP). São exemplos quitinases, glucanases, peroxidases, polifenol-oxidases, fenilalanina-amônia-liases e lipoxigenases. Essas enzimas já foram detectadas em tecidos de diversas plantas, como nos tecidos de cacaueteiro (MACAGNAN et al., 2008), tomateiro (SILVA, et al., 2004; CHOWDAPPA et al., 2013) e pepineiro (YEDIDIA et al., 1999).

2.4 Características do gênero *Trichoderma* sp.

O fungo *Trichoderma* sp. corresponde a fase anamórfica do gênero *Hypocrea* que pertence ao filo Ascomycota (AGRIOS, 1997). As espécies de *Trichoderma* geralmente são encontradas como componentes da microbiota de quase todos os tipos de solos, especialmente os orgânicos, incluindo a camada de húmus das florestas, solos agrícolas no campo e em pomares, contendo cerca de 10^1 - 10^3 propágulos cultiváveis por grama. Podem viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (ROIGER et al., 1991; HARMAN et al., 2004).

Esse fungo tem como característica morfológica micélio inicialmente de coloração branca e de crescimento rápido. Com o desenvolvimento, o mesmo torna-se cotonoso e compacto com tufos verdes escuro (devido à coloração e a quantidade de conídios). Os conídios são unicelulares, de forma subglobosa, ovóide, elipsóide ou elíptico-cilíndrica, com textura lisa ou rugosa e coloração hialina para verde-amarelado até verde-escuro, sendo a última mais comum. Tem uma forma de esfera, no ápice das fiálides. As fiálides têm forma de cantil com o centro dilatado e o ápice afilado, solitárias ou em grupos, hialinas, formando um ângulo com os conidióforos. Os conidióforos são muito ramificados, solitários ou em tufos compactos, geralmente em formato cônico ou piramidal. Normalmente mostram-se eretos, formando um ângulo reto com a hifa vegetativa. As áreas conidiais apresentam-se em forma de faixas concêntricas de coloração verde (KUBICEK & HARMAN, 1998).

As espécies de *Trichoderma* possuem a capacidade de colonizar as raízes das plantas, mas os conídios também podem ser aplicados em frutos, flores e folhas e as doenças de plantas podem ser controladas pela aplicação do fungo em qualquer um destes locais (HARMAN, 2000; VERMA et al., 2007). Quando ocorre penetração no tecido das raízes, normalmente é limitada as primeira e segunda camadas de células (YEDIDIA et al., 2000), mas também podem ser encontrados como endofíticos em diferentes plantas, como no caso de *Trichoderma stromaticum* endofítico em sistema vascular de cacau (EVANS et al., 2003). Normalmente, a colonização dos tecidos das plantas e a infecção das raízes não provoca reações patogênicas nas plantas hospedeiras entretanto, existem casos particulares que relatam isolados de *Trichoderma* spp.

como patógenos em plantas, causando doenças em maçã, milho e alfafa (HARMAN et al., 2004).

O uso de *Trichoderma* sp. na agricultura está relacionado principalmente com sua capacidade de atuar de forma antagonista contra fitopatógenos, mas alguns dos mecanismos de ação de *Trichoderma* sp. vêm sendo relacionados com a promoção de crescimento vegetal (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004; BAE et al., 2009; CARVALHO et al., 2011). O avanço nas pesquisas com *Trichoderma* também geraram dados referentes às interações diretas entre este fungo e outros microrganismos e estudos moleculares do papel de genes específicos (GRUBER et al., 2011; REITHNER et al., 2011; MEHRABI-KOUSHKI, et al., 2012).

2.4.1 *Trichoderma* spp. como agentes de controle biológico de fitopatógenos

Considerado um fungo de rápida colonização e particularmente invasivo, diferentes espécies de *Trichoderma* podem agir contra fungos fitopatogênicos (REINO et al., 2008). Os principais mecanismos envolvidos no processo de controle biológico são antibiose, micoparasitismo e competição por espaço ou nutrientes (Figura 1) (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004; VERMA et al., 2007).

A antibiose é o processo de secreção de compostos anti-microbianos por fungos antagonistas que suprimem e/ou matam fungos patogênicos que estão na vizinhança de sua área de crescimento (SCHIRMBÖCK et al., 1994). Muitas espécies de *Trichoderma* produzem metabólitos tóxicos voláteis e não

voláteis, como o ácido harzianico, alameticinas, tricolinas, peptaboils, antibióticos, 6-fenil- α -pirona, massoilactona, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelídico e outras que impedem a colonização dos demais microrganismos (BENÍTEZ et al., 2004; REINO et al., 2008).

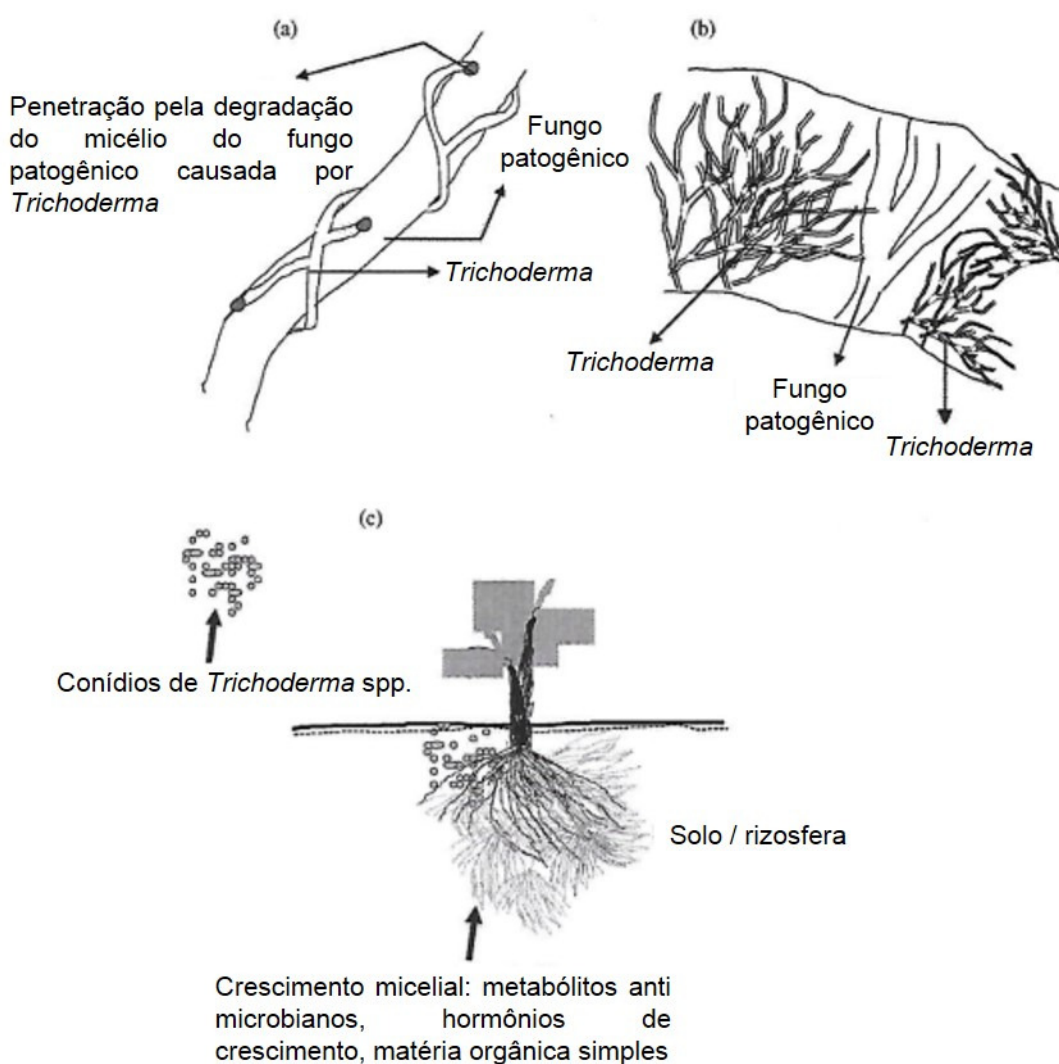


Figura 1. Mecanismos envolvidos no controle biológico por *Trichoderma* spp. (a) Micoparasitismo (b) competição por espaço (c) produção de metabólitos e competição por nutrientes. Fonte: Verma et al., 2007.

Trichoderma spp. é o fungo micoparasita mais amplamente estudado (PUNJA & UTKHEDE, 2003). A atuação de *Trichoderma* spp. no micoparasitismo de patógenos é parcialmente devido a expressão sequencial de enzimas degradadoras de parede celular, mais comumente quitinases, glucanases e proteases (HARMAN et al., 2004). O padrão de indução difere de um isolado de *Trichoderma* para outro, mas acredita-se que o fungo secrete exoquitinases constitucionalmente em níveis baixos (BENÍTEZ et al., 2004).

O micoparasitismo envolve modificações morfológicas como o enrolamento das hifas e a formação de estruturas tipo apressórios, que servem para penetrar no hospedeiro e contém altas concentrações de solutos osmóticos como o glicerol (Figura 2) (BENÍTEZ et al, 2004). *Trichoderma* reconhece o patógeno com carboidratos da parede celular que se ligam as lectinas do patógeno. Uma vez iniciado o ataque, *Trichoderma* enrola suas hifas em torno do patógeno e forma o apressório. O passo seguinte é a produção de enzimas degradadoras da parede celular e peptaboils, que facilitam a entrada da hifa do micoparasita no lúmen do fungo parasitado e a assimilação do conteúdo da parede celular (HOWELL, 2003).



Figura 2. Penetração e formação do haustório de *Trichoderma virens* (hifa menor) em *Rhizoctonia solani* (Hifa maior). Fonte: Howell, 2003.

As espécies de *Trichoderma* crescem rapidamente quando inoculadas no solo por serem naturalmente resistentes a muitos compostos tóxicos, incluindo herbicidas, fungicidas, DDT e compostos fenólicos, predominando sobre outras espécies mais sensíveis a estes compostos, evitando que estes microrganismos consigam colonizar a rizosfera e, no caso de fitopatógenos, iniciar o processo de infecção e doença nas plantas (HOWELL, 2003; BENÍTEZ, 2004; VERMA et al. 2007). *Trichoderma* também possui como características a excreção de compostos quelantes, como os sideróforos que mobilizam o ferro do ambiente e formando um complexo ferro-sideróforo que é então recuperado via mecanismo específico de captação e a maior capacidade de mobilizar outros nutrientes do solo em relação aos demais microrganismos.

2.4.2 *Trichoderma* spp. como agentes de promoção de crescimento

Os isolados de *Trichoderma* estão associados com as raízes das plantas e com a rizosfera, sendo capazes de colonizar raízes, produzindo compostos que estimulam o crescimento das plantas (BENÍTEZ et al., 2004). Semelhante ao que ocorre com fungos micorrízicos, a alta concentração de polissacarídeos hidratados na camada mucilaginosa e mono e dissacarídeos excretados pelas raízes das plantas na rizosfera proporcionam o crescimento do fungo (HERMOSA et al., 2012). A sacarose derivada das plantas é um importante recurso para as células de *Trichoderma*, facilitando a colonização rizosférica, a coordenação dos mecanismos de defesa e o aumento na taxa da fotossíntese foliar (VARGAS et al., 2009; DRUZHININA et al., 2011).

As atividades de promoção de crescimento estão diretamente relacionadas com a capacidade dos isolados colonizarem as raízes das plantas. Estes isolados são capazes de aderir e reconhecer as raízes das plantas, onde penetram e resistem aos metabólitos tóxicos produzidos pelas plantas em resposta a invasão de um organismo exógeno, patógeno ou não (HOWELL, 2003; HERMOSA et al., 2012). Em *Trichoderma*, a aderência a superfície das raízes pode ser mediada pelas hidrofobinas, que são pequenas proteínas hidrofóbicas das células externas da parede celular que revestem a superfície celular do fungo, e proteínas tipo expansina relacionadas com o desenvolvimento da parede celular (DRUZHININA et al., 2011; HERMOSA et al., 2012) já a capacidade de resistir aos metabólitos tóxicos produzidos pelas plantas está associado com a presença dos sistemas de transporte ABC, que são fatores chave em múltiplas interações estabelecidas por isolados de

Trichoderma usados em biocontrole com outros microrganismos em um ambiente potencialmente antagonístico ou tóxico (RUOCCO et al., 2009), com rápida degradação dos compostos fenólicos exsudados pelas plantas (CHEN et al., 2011), e com a supressão da produção de fitoalexinas, como as detectadas em *Lotus japonicus* durante a colonização de *Trichoderma koningii* (MASUNAKA et al., 2011).

A colonização rizosférica por *Trichoderma* spp. frequentemente provoca melhor desenvolvimento e maior crescimento das raízes, melhor produtividade da cultura, maior resistência a estresses abióticos e melhor captação e aproveitamento dos nutrientes do solo (HARMAM et al., 2004). Chet et al. (1997) indicam a possibilidade de 300% de aumento na produtividade quando *Trichoderma koningii* e *Trichoderma hamatum* são aplicados em campo. O mesmo aumento foi observado na germinação de sementes (BENÍTEZ et al., 2004).

Trichoderma spp. produzem auxinas que são estimulantes do crescimento das plantas e desenvolvimento das raízes (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009). Os mesmos autores propuseram um modelo de rota envolvida na promoção de crescimento de *Arabidopsis* pela inoculação de *Trichoderma virens*, que pode ser observado na Figura 3, onde *T. virens* induz a proliferação lateral das raízes e o aumento da acumulação de biomassa pela produção de ácido indol acético e indol acetaldéido. O indol acetaldéido pode se converter a ácido indol acético pelas enzimas da planta ou pode regular diretamente a expressão de genes auxina-induzíveis, possivelmente pela interação com os receptores de auxinas. O indol etanol não demonstrou atividade de auxina-like

clara, mas pode atuar como uma forma de estoque para outros compostos indólicos como ácido indol acético e indol acetaldéido.

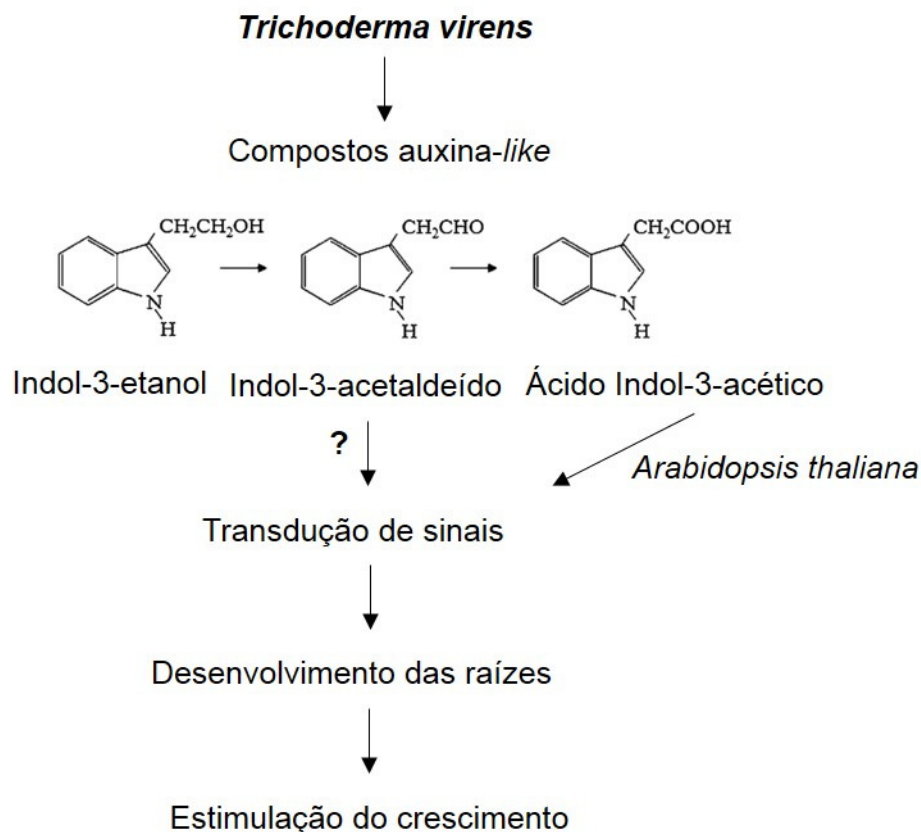


Figura 3. Resposta de crescimento de *Arabidopsis* a *Trichoderma virens* e sua regulação. Fonte: Contreras-Cornejo et al., 2009.

O efeito de *Trichoderma atroviride* na promoção de crescimento em sementes de tomate tem sido associado com a produção reduzida de etileno, resultado de um decréscimo no seu precursor, o ácido 1-carboxílico-1-aminocilopropano (ACC) pela degradação microbiana do ácido indol acético produzido pelas plantas na rizosfera, e/ou pela ação da enzima ACC desaminase (ACCD) presente no microrganismo (GRAVEL et al., 2007).

Trichoderma spp. pode aumentar a captação de diversos nutrientes nas raízes. A produção de ácidos orgânicos por *Trichoderma* spp. e o lançamento destes na rizosfera pode tanto sequestrar cátions como acidificar o microambiente próximo das raízes, solubilizando P, Mn, Fe, e Zn, tornando-os disponíveis para a nutrição das plantas (ALTOMORE et al., 1999).

Além da modificação rizosférica, a captação de ferro do solo pode ocorrer através da produção de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma* spp. (HERNÁNDEZ et al., 2004). Nas plantas, a estratégia III de captação de ferro, que não possui prevalência conhecida, envolve a captação de Fe^{3+} através do complexo sideróforo- Fe^{3+} produzido por microrganismos (LOPER & BUYER, 1991). Estes autores acreditam que as plantas podem transportar o Fe do complexo sideróforo- Fe^{3+} pela redução à Fe^{2+} e uma troca de ligante com o fitossideróforo, respectivamente, ou pela absorção direta do complexo sideróforo- Fe^{3+} . Como os sideróforos microbianos geralmente apresentam estabilidade melhor e constante do complexo Fe-quelante (e, presumidamente equilíbrio constante) do que os fitossideróforos como o ácido mugineico, a troca de ligante requer excesso de fitossideróforos e cinética favorável. A concentração estimada de ácido mugineico e sideróforos microbianos na rizosfera é de 1 mg/kg e 300 µg/kg, respectivamente. Um esquema demonstrando a forma de absorção de Fe através da troca de ligantes pode ser observado na Figura 4. Devido à cinética favorável, a troca de ligantes entre sideróforos microbianos e fitossideróforos parece provável, mas pode não ser o único mecanismo de utilização de sideróforos microbianos pelas plantas.

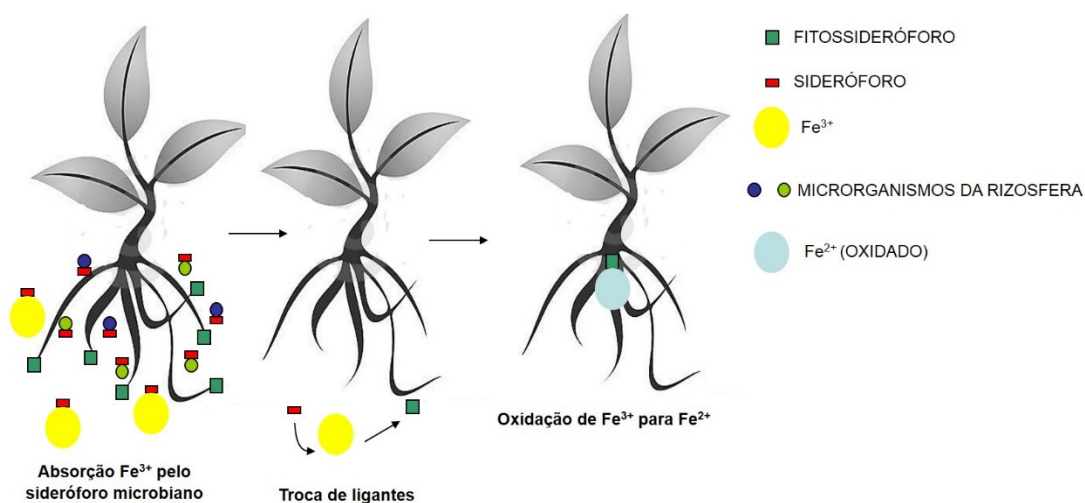


Figura 4. Esquema de absorção de Fe através de sideróforos micobianos pelas plantas, segundo teoria proposta por Loper & Buyer, 1991.

2.4.3 *Trichoderma* spp. como eliciador de indução de resistência na planta

A associação entre isolados de *Trichoderma* e as raízes pode estimular os mecanismos do sistema defensivo das plantas contra uma diversa classe de patógenos (BENÍTEZ et al., 2004). Além das barreiras físicas e químicas pré-formadas pelas plantas, elas podem detectar motifs ou domínios com características estruturais conservadas típicas de algumas categorias de microrganismos para os quais ainda não serve como hospedeira, ou seja, padrões moleculares associados a patógenos e microrganismos (PAMPs e MAMPs, respectivamente) (HERMOSA et al, 2012). Exemplos de MAMPs detectados por plantas incluem flagelinas bacterianas, lipopolissacarídeos, quitinas fúngicas e heptaglicosídeos de oomicetos (JONES & TAKEMOTO, 2004; BENT & MACKEY, 2007). Hermosa et al. (2012) descrevem uma série de MAMPs produzidas por isolados de *Trichoderma* efetivos, como xilanases (*T. viride*), celulases (*T. longibrachiatum*), endopoligalacturonases (*T. harzianum*),

alameticinas (*T. viride*), trichocolininas (*T. pseudokoningii*), 6-pentil- α -pironas (vários), harzianolidas (vários) e harzianopiridonas (vários) entre outras.

A resistência induzida (ISR) ativada por *Trichoderma* ocorre devido a vias de sinalização de ácido jasmônico e etileno de forma similar ao que ocorre com as bactérias promotoras de crescimento (SHORESH et al., 2005), culminando no acúmulo de proteínas relacionadas com a patogênese, fitoalexinas e outros compostos (SHORESH et al., 2010). Entretanto, a resistência sistêmica adquirida (SAR), que normalmente é associada com o segundo estágio das respostas imunes nas plantas já foi detectada como um fenômeno dependente da concentração e do tempo, após a inoculação de *Trichoderma asperellum* em pepino, resultando em um aumento de ácido salicílico e maior atividade da peroxidase (SEGARRA et al., 2007). O mesmo foi observado em outras plantas, e um relato destes casos pode ser encontrado no trabalho de Hermosa et al. (2012).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os 25 isolados testados nos experimentos realizados fazem parte da coleção da empresa ICB BIOAGRITEC LTDA, Porto Alegre, RS e permanecem armazenados na Micoteca da empresa (Tabela 1). O sequenciamento das amostras foi realizado previamente a pedido da empresa e realizada no Instituto Biológico de São Paulo. As espécies foram identificadas pela análise de similaridade entre as sequencias obtidas e as depositadas no banco de dados *on line* da *International Subcomission on Trichoderma and Hypocrea taxonomy*.

O isolado SS de *Sclerotinia sclerotiorum* foi isolado no Laboratório de Microbiologia Fitopatológica da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a partir de um escleródio de *Sclerotinia sclerotiorum*, proveniente de uma lavoura de feijão comum com alta incidência de mofo branco. O isolado FOPEM de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi cedido pelo pesquisador Dr. Murillo Lobo Júnior, da EMBRAPA Arroz e feijão ao Laboratório de Microbiologia Fitopatológica da Faculdade de Agronomia da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Ambos os isolados estão armazenados na Micoteca do Laboratório de Micologia Ambiental da UFRGS.

Para a manutenção da patogenicidade dos fitopatógenos os mesmos foram constantemente submetidos à inoculação em plantas de feijão comum e testados de acordo com os Postulados de Koch.

Tabela 1. Isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos experimentos de caracterização, potencial antagônico, solubilização de fosfato, promoção de crescimento e nutrição vegetal e indução de resistência ⁽¹⁾

Isolados	Identificação molecular	Substrato	Local de origem
ICB01	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo	RS
ICB02	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo	RS
ICB03	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo	RS
ICB04	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo	RS
ICB05	<i>Trichoderma harzianum</i>	Escleródio de <i>Sclerotium cepivorum</i>	Ribeirão Preto - SP
ICB06	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	RS
ICB07	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Brasília – DF
ICB08	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Brasília – DF
ICB09	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Goiás
ICB10	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Goiás
ICB11	<i>Trichoderma asperellum</i>	Casca de pinus	Porto Alegre – RS
ICB12	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Jacuba – SP
ICB13	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Barretos – SP
ICB14	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Goiás
ICB15	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Goiás
ICB16	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo- feijão	Goiás
ICB17	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo- feijão	Goiás
ICB18	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo- feijão	Goiás
ICB19	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo- feijão	Goiás
ICB20	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Goiás
ICB21	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo	Goiás
ICB22	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo	Cristalina - GO
ICB23	<i>Trichoderma asperellum</i>	Não informado	Goiás
ICB24	<i>Trichoderma asperellum</i>	Solo	Venâncio Aires – RS
ICB25	<i>Trichoderma virens</i>	Fêmea de pérola da terra	Bento Gonçalves - RS

⁽¹⁾ Isolados armazenados na Micoteca da Empresa ICB BIOAGRITEC Ltda.

4. ARTIGOS

Todas as metodologias empregadas e resultados obtidos no desenvolvimento deste trabalho estão descritos em forma de artigos nos subitens que seguem.

4.1 ARTIGO 1: Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o antagonismo de patógenos do feijoeiro *in vitro*¹

¹Artigo submetido ao Comitê Editorial do Periódico Científico Revista Pesquisa Agropecuária Gaúcha

Caracterização de isolados de *Trichoderma* e seu potencial para o controle biológicos de patógenos do feijoeiro *in vitro*¹

Priscila Pauly Ribas², Aida Terezinha dos Santos Matsumura³, Sueli Teresinha Van Der Sand⁴

Resumo - A ocorrência de doenças é o principal fator de redução na produção do feijoeiro no Brasil. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum* são agentes causais de importantes doenças dessa cultura. Para que haja sucesso do controle biológico destas e outras doenças, o conhecimento dos metabólitos produzidos pelos agentes de controle biológico, como *Trichoderma* spp. é essencial. Sob este ponto de vista, este trabalho visou caracterizar diferentes isolados de *Trichoderma* spp. de acordo com os metabólitos produzidos pelos mesmos e verificar a capacidade antagonista destes isolados contra os patógenos citados. Foram testados 25 isolados, de três diferentes espécies de *Trichoderma* quanto a produção de enzimas hidrolíticas, ácido indol acético (AIA) e sideróforos bem como a capacidade de inibição do desenvolvimento dos patógenos por produção de metabólitos voláteis e antagonismo em teste de cultura pareada. Todos os isolados produziram quitinases, glucanases, proteases, AIA e sideróforos. A produção de metabólitos voláteis *in vitro* contra *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi eficiente em 24% dos isolados testados e 20% deles inibiram o crescimento de *S. sclerotiorum*. Em cultura pareada, a redução no crescimento de *S. sclerotium* variou entre 67,5 e 100%, enquanto para *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* a redução foi de 29 a 50%.

Palavras-chave: murcha de fusarium, mofo-branco, *Trichoderma* spp.

¹Parte da tese de doutorado do primeiro autor no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

²Doutoranda do PPGMAA, bolsista Capes. Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, sala 150, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: pripauly@gmail.com – Telefone: (51) 3308.3539.

³Doutora em Genética e Biologia Molecular, responsável técnica da empresa ICB BIOAGRITEC LTDA, Rua Arabutã, 386, CEP: 90240-470, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail:aida@ufrgs.br – Telefone: (51) 3022.2985.

⁴PhD em Bioquímica e Microbiologia Molecular, professor associado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, sala 150, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: svans@ufrgs.br – Telefone: (51) 3308.4505.

***Trichoderma* characterization and its potential to biological control of bean
phytopathogens *in vitro*¹**

Abstract - The occurrence of diseases is the main reason for bean production reducing in Brazil. *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* and *Sclerotinia sclerotiorum* are the causal agents of important diseases of this crop. For the biological control to be successful for these and other diseases, it is essential the knowledge of the metabolites produced by the biocontrol agents such as *Trichoderma* spp. From this point of view, this study aimed to characterize different isolates of *Trichoderma* spp. in according to their metabolites production and to verify the antagonistic ability of these isolates against the pathogens above mentioned. Twenty five isolates were tested, from three different species of *Trichoderma*. Their ability to produce hydrolytic enzymes, indole acetic acid (IAA) and siderophores as well as their capacity to inhibit the development of pathogens by the production of volatile metabolites and antagonism in paired culture tests were analyzed. All isolates produced chitinase, glucanases, proteases, IAA and siderophores. The production of volatile metabolites *in vitro* against *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* was effective with 24% of the isolates tested and 20% of them inhibited the growth of *S. sclerotiorum*. In paired cultures, the reduction in growth for *S. sclerotioum* ranged from 67.5 and 100%, while for *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* the reduction was from 29 to 50 %.

Key words: Fusarium wilt, White mold, *Trichoderma* spp.

Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores e consumidores de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), tendo ocupado o primeiro lugar em sete dos últimos dez anos. O feijoeiro é cultivado no Brasil durante todo o ano por pequenos, médios e grandes produtores, em ecossistemas subtropical e tropical. Na safra 2012/2013 o país produziu 2,83 milhões de toneladas, com um rendimento médio de 924 kg ha⁻¹ (CONAB, 2013). Segundo Pereira et al. (2011), a ocorrência de doenças é uma das principais causas de redução na produtividade do feijoeiro, as quais podem ser causadas por bactérias, fungos vírus e nematóides e, entre elas, se destacam o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e a murcha de fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*). O método químico tem sido usado para o controle destas doenças, mas o uso intensivo de agrotóxicos, tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação dos agricultores; a resistência de patógenos a princípios ativos dos produtos aplicados; o surgimento de doenças iatrogênicas; o desequilíbrio ecológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade entre outros (MORANDI e BETTIOL, 2009).

Antagonistas de fungos fitopatogênicos tem sido usados em controle biológico de doenças de plantas reduzindo os efeitos dos impactos provocados pelo controle químico e quando usados em combinação com agrotóxicos em estratégias de manejo integrado reduzem os resíduos pós colheita e o volume final de fungicidas aplicados, mantendo os níveis de supressão dos patógenos semelhante ao esperado com o tratamento químico (LIMA et al., 2011). Grande parte das aplicações de agentes de controle biológico tem sido realizada com diferentes isolados de fungos do gênero *Trichoderma* (BENÍTEZ et al., 2004). As espécies de *Trichoderma* geralmente são encontradas como componentes da microbiota da grande maioria dos tipos de solos, especialmente os orgânicos, incluindo a camada de húmus das florestas, solos agrícolas no campo e em pomares, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (DRUZHININA et al., 2011).

O sucesso de *Trichoderma* no controle biológico está associado a sua alta capacidade reprodutiva, habilidade de se desenvolver em condições desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, capacidade de modificação da rizosfera, alta agressividade contra fungos fitopatogênicos e eficiência na promoção de crescimento e indução de mecanismos de defesa nas plantas (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004).

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar diferentes isolados de *Trichoderma* spp. de acordo com os metabólitos produzidos pelos mesmos e verificar a capacidade antagônica destes contra patógenos do feijoeiro.

Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia Ambiental (LMA) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foram testados 25 isolados de *Trichoderma* spp. representados por três diferentes espécies, e identificados como ICB01, ICB02, ICB03, ICB04, ICB06, ICB07, ICB08, ICB09, ICB10, ICB11, ICB12, ICB13, ICB14, ICB15, ICB16, ICB17, ICB18, ICB19, ICB20, ICB21, ICB22, ICB23, ICB 24 (*Trichoderma asperellum*), ICB05 (*Trichoderma harzianum*) e ICB25 (*Trichoderma virens*). Todos os isolados são pertencentes à Micoteca da empresa ICB BIOAGRITEC LTDA., Porto Alegre, Brasil. O isolado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* foi cedido pela EMBRAPA Arroz e Feijão ao LMA, enquanto o isolado de *Sclerotinia sclerotiorum* foi isolado de um escleródio do fungo coletado em uma área com histórico de mofo-branco. Ambos os isolados de fitopatógenos passam constantemente por testes *in vivo* para verificar a manutenção da patogenicidade.

Para a avaliação da produção de enzimas hidrolíticas os isolados de *Trichoderma* foram crescidos em meio de cultura Mandel e Reese (1960) modificado (peptona bacteriológica 0,1 %; KH_2PO_4 0,2 %; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,14 %; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,03 %; ureia 0,03 %; glicose 3 %; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,03 %; micélio seco de *Bipolaris sorokiniana* 0,5 %; 100 μL de solução de elemento traço, pH

6,0) durante cinco dias, sob agitação orbital de 150 rpm em câmara de crescimento a 25 ± 2 °C. O micélio seco de um patógeno foi adicionado ao meio para estimular a produção de enzimas pelo antagonista. A análise da atividade quitinásica e glucanásica foi baseada no método de Miller (1959), medindo a liberação de açúcares redutores a partir da hidrólise de quitina coloidal e da laminarina, respetivamente, pelo uso de ácido dinitrosalicílico (DNS). A absorbância foi medida em espectrofotômetro em $\lambda = 545$ nm. Para determinação da atividade enzimática foi preparada uma curva de calibração com glicose nas concentrações de 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; e 0,3 mg.mL⁻¹. Uma atividade enzimática (U) corresponde a liberação de 1 μ mol de glicose (mL min⁻¹). A determinação da atividade proteásica foi baseada no método de Sarath et al. (1989) utilizando azocaseína 2 % como substrato. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em $\lambda = 440$ nm. Uma atividade enzimática (U) corresponde a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade em 30 minutos a 25 °C, em um $\lambda = 440$ nm.

Para a avaliação da produção de ácido indol acético (AIA), os isolados de *Trichoderma* spp. foram inicialmente cultivados em meio de cultura BDA e mantidos durante três dias em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h de luz. A partir destas colônias foram retirados discos de 8,0 mm contendo micélio e esporos do fungo e, em seguida foram repicados em frascos cônicos de 250 mL contendo 50 mL de meio BD suplementado com 500 μ g mL⁻¹ de triptofano. Os frascos foram mantidos sob agitação de 150 rpm agitador climatizado com temperatura de 25 ± 2 °C, por cinco dias. Após esse período, o meio foi filtrado com auxílio de algodão hidrófilo branco em um funil. Do filtrado da cultura foi retirado uma alíquota de 1,5 mL das amostras e adicionado 1,5 mL de reagente de Salkowsky (150 mL H₂SO₄, 7,5 mL de FeCl₃.6H₂O, 250 mL de água destilada). A reação foi realizada durante 20 min no escuro e posteriormente as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro em $\lambda = 530$ nm. Para a determinação da concentração de AIA na amostra foi preparada uma curva de calibração preparada com ácido indol acético nas concentrações de 0, 1, 2, 4, 6, 10 e 16 μ g mL⁻¹.

A produção de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma* spp. foi detectada através da técnica universal para detecção de sideróforos proposta por Schwyn e Neilands (1987).

Inicialmente, todos o material utilizado para o desenvolvimento dos ensaios foi lavado com HCl 6M e, após, imerso em água deionizada por um período de 8 h e novamente enxaguado em água deionizada. Os isolados foram cultivados em meio de cultura BD, e incubados sob agitação de 150 rpm e temperatura de 25 ± 2 °C durante cinco dias. A mudança de cor da mistura do sobrenadante de azul para amarelo-avermelhado em um período de 15 minutos indica a produção de sideróforos pelo antagonista.

A avaliação da produção de metabólitos voláteis foi realizada de acordo com a metodologia de Dick e Hutchinson (1966) através da inoculação de um disco de 0,8 cm de diâmetro contendo micélio dos isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA e no centro de outra placa, com o mesmo meio, foi inoculado um disco do mesmo tamanho contendo micélio de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* ou de *S. sclerotiorum*. A placa contendo os fitopatógenos foi invertida sobre a placa contendo o antagonista e seladas com filme plástico. A inoculação do antagonista ocorreu 24 h após a inoculação dos fitopatógenos. As placas foram mantidas em uma temperatura de 25 ± 2 °C em câmara de crescimento durante cinco dias. Após o período de incubação o diâmetro das colônias do patógeno foram medidas com o auxílio de um paquímetro. A testemunha consistiu da inoculação do fitopatógeno na ausência de *Trichoderma* spp.

Para verificar o potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico de fitopatógenos do feijoeiro, utilizou-se a metodologia de cultura pareada proposta por Dennis e Webster (1971). Os diferentes isolados do antagonista e os fitopatógenos foram cultivados em meio de cultura BDA, durante cinco dias em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C. Um disco de micélio, de 0,8 cm de diâmetro de cada fitopatógeno foi inoculado em meio BDA e 24 h após, foi também inoculado um disco de cada isolado de *Trichoderma* spp. no lado oposto da placas de Petri. As placas foram mantidas nas mesmas condições descritas acima até que ocorresse um ponto de contato entre as duas colônias. Após cinco dias, o diâmetro da colônia do fitopatógeno foi medida com o auxílio de um paquímetro. A testemunha consistiu da inoculação do fitopatógeno na ausência do antagonista.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como a média entre elas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5 % e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os softwares utilizados para todas as análises estatísticas foram o Statistica 7.0 (Statsoft) e SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

Resultados e Discussão

Todos os isolados produziram enzimas hidrolíticas. A concentração de quitinase produzida variou entre 7,86 e 13,54 U mL⁻¹ (Tabela 1). As maiores produções da enzima foram obtidas pelos isolados ICB04 (13,54 U mL⁻¹) e ICB21 (12,67 U mL⁻¹), enquanto os isolados ICB16 (7,86 U), ICB23 (7,92 U), ICB 25 (8,16 U) e ICB13 (8,34 U) apresentaram as menores concentrações de quitinase neste experimento ($p < 0.05$). A concentração máxima obtida neste experimento foi cerca de duas vezes maior do que a concentração encontrada por Sandhya et al. (2004), que obteve 6,2 U mL⁻¹ em *T. harzianum* após 96 h de cultivo. A maior produção pode ser explicada pela presença de micélio de um fitopatógeno no meio, que induziu a maior produção de enzimas. Segundo Rana et al. (2012) a enzima quitinase é produzida em níveis constitutivos pelos microrganismos. Gajera e Vakharia (2012) concluíram que a atividade de quitinase é elevada durante o antagonismo, pois quando avaliada a seu potencial de inibição em *Aspergillus niger*, observaram uma elevação na atividade enzimática, variando entre 0,11 e 1,31 U mL⁻¹.

A concentração de glucanase variou entre 4,08 e 25,62 U mL⁻¹ (Tabela 1). A maior concentração foi obtida pelo isolado ICB19 (25,62 U mL⁻¹), enquanto os isolados ICB14 (5,41 U mL⁻¹), ICB06 (5,37 U mL⁻¹), ICB18 (5,34 U mL⁻¹), ICB12 (5,10 U mL⁻¹), ICB13 (4,76 U mL⁻¹), ICB16 (4,59 U mL⁻¹), ICB20 (4,48 U mL⁻¹), ICB24 (4,46 U mL⁻¹) e ICB15 (4,08 U mL⁻¹) apresentaram as menores concentrações de glucanase ($p < 0,05$). A concentração de glucanases entre os isolados de *Trichoderma* spp. testados foi superior a detectada para quitinases. Segundo De La Cruz et al. (1995), a produtividade de β -1,3-glucanases (BGN13.1) corresponde a maior

atividade extracelular em *T. harzianum*. Monteiro (2008) encontrou valores elevados para a produção de glucanases em *Trichoderma*, com concentrações variando entre 27 e 45 U mL⁻¹ dependendo do fitopatógeno utilizado como indutor no meio.

A concentração de protease que foi produzida variou entre 0,77 e 3,41 U mL⁻¹ (Tabela 1). As maiores concentrações foram produzidas pelo isolado ICB06 (3,41 U), enquanto que as menores concentrações de protease ($p < 0,05$) foram observadas para os isolados ICB15 (0,99 U mL⁻¹), ICB17 (0,98 U mL⁻¹), ICB23 (0,98 U mL⁻¹), ICB12 (0,95 U mL⁻¹), ICB11 (0,95 U mL⁻¹), ICB02 (0,91 U mL⁻¹), ICB20 (0,87 U mL⁻¹), ICB04 (0,85 U mL⁻¹), ICB19 (0,83 U mL⁻¹) e ICB16 (0,77 U mL⁻¹). No trabalho desenvolvido por De Marco et al (2003), os valores para a produção de proteases por isolados de *Trichoderma* spp. foram próximos aos obtidos neste trabalho, com melhores resultados em torno de 1,41 U mL⁻¹ após 72 h de inoculação.

As espécies de *Trichoderma* possuem um alto nível de diversidade genética e podem ser empregadas para a produção de uma ampla gama de produtos de interesse comercial e ecológico (SCHUSTER e SCHMOLL, 2010). São prolíferas produtoras de proteínas extracelulares, enzimas degradadoras e metabólitos com atividades antibióticas; podem atuar como agentes de controle biológico de doenças e promover o crescimento e desenvolvimento das plantas (HARMAN et al., 2004). Esta diversidade torna importante o estudo de cada isolado de *Trichoderma* spp. para se determinar a atividade de interesse à qual pode ser melhor aplicado.

A produção de enzimas hidrolíticas, como quitinases, glucanases e proteases, que são enzimas degradadoras da parede celular está diretamente relacionada com a capacidade de um fungo atacar diretamente a outro, em um processo chamado de micoparasitismo, que envolve uma sucessão de eventos, incluindo reconhecimento, ataque e subsequente penetração e morte do hospedeiro (HARMAN et al., 2004). Qualhato et al. (2013) estudaram o micoparasitismo em espécies de *Trichoderma* contra fungos fitopatogênicos e concluíram que *T. harzianum* e *T. asperellum* possuem alta eficiência no controle *S. sclerotiorum* e *F. solani*, demonstrando potencial para serem utilizados em controle biológico das doenças provocadas por tais patógenos.

O ácido indol acético é uma auxina natural encontrada em plantas, que atua como regulador de crescimento, causando efeito positivo no desenvolvimento e morfologia das raízes, além de aumentar o acesso aos nutrientes do solo (ZHAO, 2012). Os tecidos das raízes são especialmente sensíveis a flutuações nas concentrações de AIA e o desenvolvimento do sistema radicular pode ser afetado por fontes exógenas desse regulador, incluindo os provenientes de fontes microbianas (DUCA et al., 2014).

Neste ensaio, todos os isolados de *Trichoderma* spp. produziram AIA, variando entre 11,35 e 52,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os isolados ICB05 (*T. harzianum*) e ICB06 (*T. asperellum*) produziram as maiores concentrações de AIA em relação aos demais isolados ($p < 0,05$). Os demais isolados apresentaram concentrações semelhantes, não apresentando diferença significativa entre eles ($p < 0,05$) (Figura 1). A capacidade de um microrganismo produzir AIA está associada com o seu potencial em estimular o crescimento vegetal (BENÍTEZ et al., 2004) e diferentes estudos têm demonstrado a capacidade de *Trichoderma* produzir auxinas, como o AIA (GRAVEL et al., 2007; HERMOSA et al., 2012). Contreras-Cornejo et al. (2009) concluíram que a produção de auxinas por *T. virens* é capaz de estimular o crescimento e o desenvolvimento das raízes em *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Comparando a atividade de um isolado de *T. harzianum* mutante com um isolado selvagem da mesma espécie, foi possível observar que o isolado mutante, que produzia maiores concentrações de AIA não foi apenas mais estável na promoção de crescimento em pepino, mas também mais eficiente do que o isolado selvagem (ZHANG et al., 2013).

Além de ter um efeito estimulante no crescimento das plantas, o AIA exógeno na rizosfera também pode ter efeito prejudicial sobre o alongamento das raízes em diferentes concentrações, fato que vem sendo associado ao aumento no nível de etileno na planta (HERMOSA et al; 2012). O AIA pode aumentar a atividade da enzima ACC sintase que catalisa a conversão de S-adenosil metionina ao composto 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC), o precursor do etileno nas plantas (HERMOSA et al., 2012; ZÚÑIGA et al., 2013).

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados neste experimento demonstraram capacidade de produzir sideróforos em baixas concentrações de ferro. Lehner et al. (2013)

sugerem uma alta diversidade na produção de sideróforos por *Trichoderma* spp., tendo a ferricrocina um importante papel no armazenamento intracelular do ferro.

Outro mecanismo observado em *Trichoderma* spp. é a habilidade para competição por nutrientes limitados, resultando na morte dos fitopatógenos por desnutrição. Em condições de baixa disponibilidade de ferro (Fe), muitos fungos são capazes de excretar um quelante de baixo peso molecular específico para o Fe (BENÍTEZ, et al., 2004). Os microrganismos da rizosfera também podem afetar fortemente a captação de Fe pelas plantas através da produção de sideróforos, que aumentam a mobilidade de Fe no solo, particularmente na rizosfera, e fornecem Fe solúvel para as plantas (BAR-NESS, et al., 1992). Segundo Delgado-Jarana et al. (2003), *Trichoderma* tem capacidade superior de mobilizar e captar nutrientes do solo comparado a outros microrganismos, o uso eficiente de nutrientes disponíveis é baseado na sua habilidade de obter ATP para seu metabolismo de diferentes açúcares, como aqueles derivados de polímeros amplamente disseminados no ambiente, como celulose, glucanos e quitinas entre outros, todos eles se transformando em glicose.

Trichoderma spp. pode produzir mais de 40 diferentes metabólitos secundários que podem contribuir na sua ação antagonística, como etileno, cianeto de hidrogênio, aldeídos e cetonas e desempenham um importante papel no controle de fitopatógenos e metabólitos como ácido harzianico, alamecina e tricolina, que dificultam o crescimento de microrganismos (PADMAJA et al., 2013).

A produção de metabólitos voláteis capazes de inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum* variou em relação ao isolado e patógeno testado (Tabela 2). Os isolados ICB07, ICB11, ICB12, ICB16, ICB20 e ICB21 reduziram significativamente ($p < 0,05$) o crescimento de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, em relação à testemunha. O isolado ICB20 apresentou maior eficiência na inibição do crescimento, reduzindo aproximadamente 33 % o diâmetro da colônia do patógeno. Os demais isolados não apresentaram diferença estatística significativa em relação à testemunha ($p < 0,05$). Carvalho et al. (2011) avaliaram o efeito de metabólitos voláteis produzidos por *T. harzianum* na inibição de

crescimento de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e observaram que todos os isolados testados inibiram o crescimento do patógeno, reduzindo o diâmetro da colônia em aproximadamente 50 %, enquanto a redução da incidência do patógeno em sementes de feijão ficou entre 35 e 51 % e proporcionando entre 73 e 81 % de plântulas normais.

Quando avaliamos a ação dos metabólitos voláteis produzidos pelos isolados de *Trichoderma* na inibição de crescimento de *S. sclerotiorum*, os isolados ICB05, ICB06, ICB11, ICB12 e ICB25 reduziram significativamente ($p < 0,05$) o crescimento das colônias do patógeno em relação ao crescimento apresentado pela testemunha (Tabela 2). A maior eficiência foi observada para o isolado ICB06, que reduziu 90 % o diâmetro da colônia de *S. sclerotiorum*. Lobo-Junior e Abreu (2000) observaram a inibição de *S. sclerotiorum* *in vitro* por metabólitos voláteis produzidos por *T. viride*, *T. aureoviride*, *T. koningii*, *T. pseudokoningii* e *Penicillium* sp. Os mesmos autores ressaltam a importância de se testar antagonistas em temperaturas próximas à temperatura ótima de desenvolvimento do patógeno, o que no caso de *S. sclerotiorum* está entre 15 e 20 °C.

No teste de pareamento de culturas, 80 % dos isolados testados reduziram significativamente ($p < 0,05$) o crescimento de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* (Tabela 2). Para estes isolados, a redução variou entre 29 e 50 % em relação ao diâmetro da colônia da testemunha. Apenas 24 % dos isolados reduziram significativamente ($p < 0,05$) o crescimento de *S. sclerotiorum* *in vitro* (Tabela 2), entretanto a eficiência destes isolados foi superior à encontrada para *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli*, uma vez que a redução provocada no crescimento do fitopatógeno variou entre 67,5 e 100 % em relação à testemunha. O antagonismo de *T. stromaticum* foi observado em cultura pareada com *Phytophthora citrophthora*, reduzindo em 52,21% o crescimento do fitopatógeno de acordo com Silva et al., 2008. Ethur et al. (2005) avaliaram a eficiência de *Trichoderma* spp. no controle de *S. sclerotiorum* no cultivo de pepineiro e observaram redução entre 94 e 100 % no desenvolvimento do patógeno *in vitro*, e o controle do tombamento de mudas em estufa foi comprovado.

O potencial de espécies de *Trichoderma* atuarem com eficiência no biocontrole depende das condições físico-químicas do ambiente e não está fielmente associado a apenas um mecanismo, mas sim ao sinergismo que ocorre entre sua capacidade de produção de metabólitos voláteis e não voláteis tóxicos, competência rizosférica, competição por espaço e nutrientes e produção de enzimas líticas, podendo acarretar não apenas a redução na incidência do patógeno, como provocar efeitos benéficos nas plantas, como promoção de crescimento (biofertilização) e estímulo dos mecanismos de defesa da planta (HOWELL, 2003; BENÍTEZ et al., 2004).

Conclusões

1. Todos os isolados produziram enzimas hidrolíticas, ácido indol acético e sideróforos.
2. Um número maior de isolados foi capaz de inibir o crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli in vitro*, entretanto os isolados capazes de inibir o crescimento de *Sclerotinia Sclerotiorum* foram mais eficientes.

Referências

- BAR-NESS, E.; HADAR, Y.; CHEN, Y.; RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. **Plant Physiology**, v.100, p.451-456, 1992.
- BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.
- CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos de Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

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 do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.028-034, 2011.

CONAB, **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos, décimo levantamento**. Brasília, Companhia Nacional de Abastecimento, 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.149, p.1579-1592, 2009.

DE LA CRUZ, J.; PINTOR-TORO, J.A.; BENÍTEZ, T.; LLOBELL, A.; ROMERO, L.C. A novel endo beta-1,3-glucanase, BGN13.1, involved in the mycoparasitism of *Trichoderma harzianum*. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.23, p.6937-6945, 1995.

DE MARCO, J.L.; VALADARES-INGLIS, M.C.; FELIX, C. Production of hydrolytic enzymes by *Trichoderma* isolates with antagonistic activity against *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom of cocoa. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p. 33-38, 2003.

DELGADO-JARANA, J.; MORENO-MATEOS, M.A.; BENÍTEZ, T. Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: role of *glt1*. **Eukaryotic Cell**, v.2, n.4, p.708-717, 2003.

DENNIS C, WEBSTER J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*, III Hyphal interactions. **Transactions British Mycological Society**, v.57, p.363-369, 1971.

DICK, C. M.; HUTCHINSON, S. A. Biological activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, v. 211, n.51, p. 868, 1966.

DRUZHININA, I.S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELA, A.; HORWITZ, B.A.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P.K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I.V.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews**, v.9, p.749-759, 2011.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTERN, C.L.; ROSE, D.; GLICK, B.R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie von Leeuwenhoek**, 2014.

ETHUR, L.Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A.C.F.; STEFANELO, D.R.; ROCHA, E.K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.2, p.127-133, 2005.

GAJERA, H.P.; VAKHARIA, D.N. Production of litic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.43-52, 2012.

GRAVEL, V., ANTOUN, H., TWEDDELL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). **Soil Biology and Biochemistry**, v.39, p.1968–1977, 2007.

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

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v.158, p.17-25, 2012.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Diseases**, v.87, n.1, p.4-10, 2003.

LEHNER, S.M.; ATANASOVA, L.; NEUMANN, K.N.; KRŠKA, R.; LEMMENS, M.; DRUZHININA, I.R.; SCHUHMACHER, R. Isotope-assisted screening for iron-containing metabolites reveals a high degree of diversity among known and unknown siderophores produced by *Trichoderma* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, n.1, p.18-31, 2013.

LIMA, G.; CASTORIA, R.; DE CURTIS, F.; RAIOLA, A.; RITIENI, A.; DE CICCO, V. Integrated control of blue mold using new fungicides and biocontrol yeasts lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, p.164-172, 2011.

- LOBO JÚNIOR, M.; ABREU, M.S. Inibição de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* por metabólitos voláteis produzidos por alguns antagonistas em diferentes temperaturas e pH's. **Ciência e Agrotecnologia**, v.24, n.2, p.521-526, 2000.
- MANDEL, M.; REESE, E. T. Induction of cellulase in fungi by cellobiose. **Journal of Bacteriological, Natick**, v.79, p.816, 1960.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 3, p.426 - 429, 1959.
- MONTEIRO, V. N. **Avaliação do perfil de proteínas secretadas pelo isolado de *Trichoderma harzianum* (ALL42) obtido de solo do Cerrado induzido por fitopatógenos**. Goiania: UFG, 2008. 86 p. Tese (Doutorado em Biologia, área de concentração de Biologia Celular e Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Biologia. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás.
- MORANDI, M.A.B.; BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.7-15.
- PADMAJA, M.; NARENDRA, K.; SWATHI, J.; SOWJANYA, K.M.; JAWAHAR BADU, P.; KRISHNA SATYA, A. *In vitro* antagonism of native isolates from *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii*. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v.4, n.3, p.886-891, 2013.
- PEREIRA, M.J.Z.; RAMALHO, M.A.P.; ABREU, A.F.B. Reação de linhagens de feijoeiro ao fungo *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em condições controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.5, p.940-947, 2011.
- QUALHATO, T.F.; LOPES, F.A.C.; STEINDORFF, A.S.; BRANDÃO, R.S.; JESUÍNO, R.S.A.; ULHOA, C.J. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolitic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 35, p.1461-1468, 2013.

RANA, I.A.; LOERZ, H.; SCHAEFFER, W.; BECKER, D. Over expression of chitinase and chitosane genes from *Trichoderma harzianum* under constitutive and inducible promoters in order to increase disease resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Molecular Plant Breeding**, v.3, n.4, p.37-44, 2012.

SANDHYA, C.; ADAPA, L. K.; NAMPOOTHIRI, M.; BINOD, P.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v.44, n.1, p.49-58, 2004.

SARATH, G.; DE LA MOTTE, R.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, I. S. **Proteolytic assay: a practical approach**, Oxford: IRC Press, 1989.

SCHUSTER, A.; SCHMOLL, M. Biology and Biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p.787-799, 2010.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p.47-56, 1987.

SILVA, K.S.; REBOUÇAS, T.N.H.; BOMFIM, M.P.; SILVA, D.S.; SÃO JOSÉ, D.R.; BENETT, C.G.S. Atividade antagonica in vitro de isolados de *Trichoderma* spp. ao fungo *Phytophthora citrophthora*. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.4, p.749-754, 2008.

ZANG, F.; YUAN, J.; YANG, X.; CUI, Y.; CHEN, L.; RAN, W.; SHEN, Q. Putative *Trichoderma harzianum* mutante promotes cucumber growth by enhanced production of índole acetic acid and plant colonization. **Plant Soil**, v.368, p.433-444, 2013.

ZHAO, Y. Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to índole-3-acetic-acid in plants. **Molecular Plant**, v.5, n.2, p.334-338, 2012.

ZÚÑIGA, A.; POUPIN, M.J.; DONOSO, R.; LEDGER, T.; GUILIANI, N.; GUTIÉRREZ, R.A.; GONZÁLES, B. Quorum sensing and índole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.26, n.5, p.546-553, 2013.

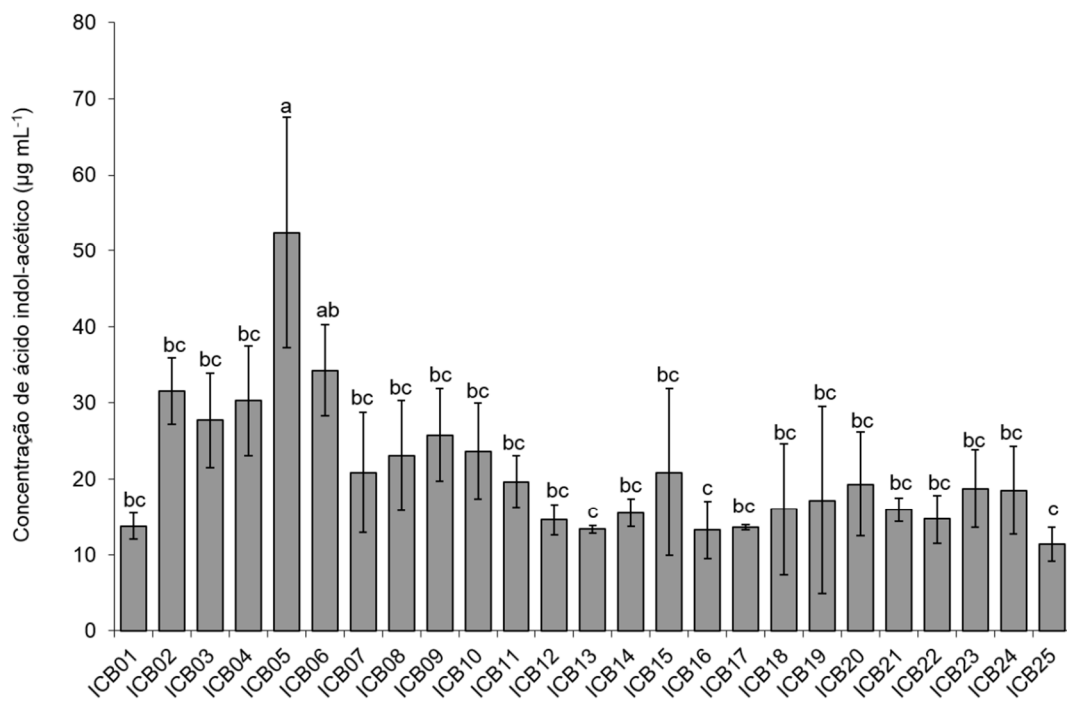
Relação de tabelas e figuras

Figura 1. Produção de ácido indol acético (AIA) por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. Barras seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente de acordo com o teste de Tukey 5 %

Tabela 1. Produção de enzimas hidrolíticas por diferentes isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro*

Isolados	Enzimas hidrolíticas ⁽¹⁾		
	Quitinase (U) ⁽²⁾	Glucanase (U) ⁽²⁾	Protease (U) ⁽³⁾
ICB01	9,58 ^e	7,06 ^{ef}	1,22 ^{fgh}
ICB02	10,93 ^{cd}	18,05 ^b	0,91 ^{ijk}
ICB03	11,51 ^c	6,80 ^{efg}	1,30 ^{fg}
ICB04	13,54 ^a	7,71 ^e	0,85 ^{jk}
ICB05	11,84 ^{bc}	12,93 ^{cd}	1,92 ^d
ICB06	10,51 ^{de}	5,37 ^{fghi}	3,41 ^a
ICB07	9,21 ^f	6,87 ^{ef}	1,30 ^{fg}
ICB08	11,57 ^c	14,48 ^c	2,50 ^b
ICB09	11,47 ^c	12,45 ^d	1,03 ^{hij}
ICB10	9,69 ^e	6,36 ^{efgh}	1,12 ^{ghi}
ICB11	9,61 ^e	13,05 ^{cd}	0,95 ^{ijk}
ICB12	8,69 ^g	5,10 ^{ghi}	0,95 ^{ijk}
ICB13	8,34 ^g	4,76 ^{hi}	1,67 ^e
ICB14	9,52 ^e	5,41 ^{fghi}	2,24 ^c
ICB15	9,94 ^e	4,08 ⁱ	0,99 ^{hijk}
ICB16	7,86 ^h	4,59 ⁱ	0,77 ^k
ICB17	9,88 ^e	6,64 ^{efg}	0,98 ^{ijk}
ICB18	9,69 ^e	5,34 ^{fghi}	1,01 ^{hij}
ICB19	8,57 ^g	25,62 ^a	0,83 ^{jk}
ICB20	9,08 ^f	4,48 ⁱ	0,87 ^{jk}
ICB21	12,67 ^{ab}	7,20 ^e	1,99 ^d
ICB22	9,80 ^e	6,96 ^{ef}	1,03 ^{hij}
ICB23	7,92 ^h	7,05 ^{ef}	0,98 ^{ijk}
ICB24	10,50 ^{de}	4,46 ⁱ	1,63 ^e
ICB25	8,16 ^h	12,98 ^{cd}	1,36 ^f
CV (%)	2,95	6,40	5,56

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente de acordo com o teste de Tukey 5 %

⁽²⁾ Uma unidade enzimática corresponde a liberação de 1 μmol glicose. $(\text{mL} \cdot \text{min})^{-1}$

⁽³⁾ Uma unidade enzimática corresponde a quantidade de enzima requerida para produzir uma absorbância de 1 unidade. 30 min^{-1} em $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $\lambda = 440 \text{ nm}$

Tabela 2. Antagonismo e inibição de crescimento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* (*F. oxysporum*) e *Sclerotinia sclerotiorum* (*S. sclerotiorum*) por *Trichoderma* spp.

Isolados	Antagonismo		Inibição do crescimento por metabólitos voláteis	
	Média de crescimento da cultura do patógeno (cm)*			
	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>S.</i> <i>sclerotiorum</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>S.</i> <i>sclerotiorum</i>
ICB01	2,7 ^b	4,2 ^{abcdef}	3,7 ^{abc}	3,7 ^{abcd}
ICB02	1,9 ^b	1,9 ^{cdef}	4,0 ^{ab}	4,7 ^{abcd}
ICB03	2,7 ^b	6,1 ^{abcd}	3,4 ^{abc}	3,6 ^{abcd}
ICB04	2,6 ^b	0 ^f	3,5 ^{abc}	3,4 ^{abcd}
ICB05	2,7 ^b	3,4 ^{abcdef}	3,5 ^{abc}	2,2 ^{bcd}
ICB06	2,3 ^b	6,3 ^{abc}	3,5 ^{abc}	0,8 ^d
ICB07	2,0 ^b	3,9 ^{abcdef}	3,2 ^{bc}	4,8 ^{abcd}
ICB08	2,7a ^b	6,4 ^{abc}	3,4 ^{abc}	2,5 ^{abcd}
ICB09	2,8a ^b	7,2 ^{ab}	3,3 ^{abc}	3,4 ^{abcd}
ICB10	2,6 ^b	3,4 ^{abcdef}	3,4 ^{abc}	1,9 ^{cd}
ICB11	2,4 ^b	3,7 ^{abcdef}	3,2 ^{bc}	1,8 ^{cd}
ICB12	2,9 ^{ab}	8,0 ^a	3,2 ^{bc}	7,3 ^{ab}
ICB13	2,4 ^b	1,2 ^{def}	3,5 ^{abc}	5,0 ^{abcd}
ICB14	2,7 ^b	4,6 ^{abcdef}	3,9 ^{abc}	3,4 ^{abcd}
ICB15	2,3 ^b	4,7 ^{abcdef}	3,6 ^{abc}	5,9 ^{abcd}
ICB16	2,5 ^b	3,5 ^{abcdef}	3,2 ^{bc}	2,2 ^{abcd}
ICB17	2,5 ^b	5,9 ^{abcde}	3,5 ^{abc}	4,3 ^{abcd}
ICB18	2,4 ^b	1,0 ^{ef}	3,5 ^{abc}	3,3 ^{abcd}
ICB19	2,2 ^b	4,4 ^{abcdef}	3,7 ^{abc}	5,2 ^{abcd}
ICB20	2,6 ^b	6,3 ^{abc}	2,9 ^c	5,7 ^{abcd}
ICB21	2,8 ^{ab}	4,8 ^{abcdef}	3,2 ^{bc}	6,3 ^{abc}
ICB22	2,5 ^b	4,8 ^{abcdef}	3,7 ^{abc}	3,8 ^{abcd}
ICB23	2,8 ^{ab}	2,6 ^{bcdef}	3,5 ^{abc}	2,5 ^{abcd}
ICB24	2,6 ^b	3,3 ^{abcdef}	3,6 ^{abc}	3,4 ^{abcd}
ICB25	2,4 ^b	2,4 ^{bcdef}	3,4 ^{abc}	2,1 ^{bcd}
Testemunha	3,8 ^a	8,0 ^a	4,3 ^a	7,7 ^a
CV (%)	12,96	37,30	9,19	44,25

* Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferiram estatisticamente de acordo com o teste de Tukey 5 %

**4.2 ARTIGO 2: Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por
Trichoderma spp.²**

²Artigo submetido ao Comitê Editorial do Periódico Científico Revista Brasileira de Biociências

Potencial *in vitro* para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp.

**Priscila Pauly Ribas^{1*}, Rosane Rech², Aida Terezinha dos Santos Matsumura³,
Sueli Teresinha Van Der Sand¹**

¹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, sala 150, CEP: 900500-170, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Prédio 43.212, CEP: 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

³ICB BIOAGRITEC LTDA, Rua Arabutan, 386, CEP: 90240-470, Porto Alegre, RS, Brasil.

* Autor correspondente: ripauly@gmail.com

Resumo

O fósforo é um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, entretanto, a maior parte deste nutriente presente no solo se encontra na forma de fosfatos inorgânicos. Alguns microrganismos presentes na rizosfera são capazes de atuar solubilizando o fosfato inorgânico, auxiliando no desenvolvimento vegetal. *Trichoderma* sp. é um fungo amplamente utilizado como agente de controle biológico de doenças de plantas e encontra-se associado às suas raízes. Este trabalho visou avaliar o potencial *in vitro* de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. para a solubilização de fosfato de cálcio em meio PVK, e sua capacidade de acidificação do meio e produção de enzimas fosfatases. Todos os isolados foram capazes de solubilizar fosfato no meio e demonstraram correlação entre a solubilização de fosfato de cálcio e a acidificação do meio de cultura. O isolado ICB08 (*T. asperellum*) solubilizou maior concentração de fosfato no meio em relação aos demais isolados, quando considerado o intervalo de tempo analisado. Todos os isolados apresentaram atividade enzimática, variando em concentração e tipo de fosfatase produzida. Também foi possível estabelecer correlação entre a solubilização de fosfato e a produção de enzimas fosfatases. O isolado ICB18 (*T. asperellum*) obteve a maior atividade enzimática no período de tempo avaliado e produziu fosfatase ácida e fosfatase alcalina. Foi possível concluir que os diferentes isolados possuem potencial de solubilização, tanto através da acidificação do meio quanto pela produção de fosfatase ácida e fosfatase alcalina.

Palavras-chave: fosfato de cálcio, meio PVK, fosfatase ácida, fosfatase alcalina

***In vitro* potencial of phosphate solubilization of *Trichoderma* spp.**

Abstract

Phosphorus is an essential nutrient element for plant growth. However, most of this nutrient present in soil is in the form of inorganic phosphates. Some rhizosphere microorganisms are able to solubilize inorganic phosphate, helping in plant development. *Trichoderma* sp. is a fungus widely used as biological control agent of plant diseases and is found associated to its roots. This study aimed to evaluate the potential of different *Trichoderma* spp isolates for calcium phosphate solubilization in PVK medium, and its ability of medium acidification and phosphatase enzymes production *in vitro* conditions. All isolates were able to solubilize phosphate in the medium and demonstrated a correlation between the solubilization of calcium phosphate and culture medium acidification. The isolate ICB08 (*T. asperellum*) solubilized higher concentration of phosphate in the medium compared to the other isolates tested, when considering the assay period. All isolates demonstrated enzymatic activity, varying in concentration and type of phosphatase produced. It was also possible to establish correlation between phosphate solubilization and phosphatase enzymes production. The isolate ICB18 (*T. asperellum*) obtained the highest enzyme activity during the time of the assay and produced acid phosphatase and alkaline phosphatase. It was possible to conclude that the different isolates has solubilization potential, both through the acidification of the culture medium and through the acid phosphatase and alkaline phosphatase production.

Key-words: Calcium phosphate, PVK medium, acid phosphatase, alkaline phosphatase

INTRODUÇÃO

O fósforo é um componente de diversas moléculas, como ácidos nucléicos, fosfolipídios e ATP e, conseqüentemente, as plantas não podem crescer sem a suplementação desse nutriente, que representa cerca de 0,2 % do peso seco das mesmas (Kapri & Tewari 2010). O fósforo inorgânico também está envolvido no controle de reações enzimáticas e na regulação de vias metabólicas (Schachtman *et al* 1998). Depois do nitrogênio, o fósforo é o mais frequente macronutriente limitador do crescimento das plantas, uma vez que 95-99 % do fósforo presente no solo se encontra na forma de fosfatos insolúveis, que não podem ser utilizados pelas plantas (Pradhan & Sukla 2005).

Diversos microrganismos do solo, principalmente da rizosfera podem atuar solubilizando formas indisponíveis de fosfato (Maheswar & Sathiyavani 2012). Os fungos tem sido relatados por possuir maior habilidade de solubilização do que bactérias (Nahas 2002). A capacidade de solubilização de fosfatos é correlacionada com a habilidade de produção de ácidos orgânicos e/ou polissacarídeos extracelulares pelos microrganismos (Kim *et al* 1997, Omar 1998, Souchie *et al* 2007) bem como pela produção de enzimas fosfatases, que promovem a hidrólise do fosfato, transformando o fosfato orgânico em uma forma solúvel de fosfato inorgânico (Leitão *et al* 2010).

A inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos ou o manejo de suas populações têm sido sugeridos como uma forma de substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo (Goldstein 1986, Kim *et al* 1997). Um exemplo de prática semelhante ocorreu com a implementação do controle biológico de doenças de plantas utilizando os fungos do gênero *Trichoderma* spp.. Morandi & Bettioli (2009)

relatam o uso deste microrganismo com sucesso no Brasil, para o controle de patógenos como *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Botrytis*, *Crynipellis*, *Sclerotium* e *Sclerotinia*, reduzindo o volume de agrotóxico aplicados em diversas culturas, como feijão, soja, algodão, fumo, morango, tomate, cebola, alho, plantas ornamentais e cacau.

As diferentes espécies de *Trichoderma* podem estar associadas com as raízes e ecossistema radicular das plantas, por isso, além do controle biológico podem atuar de forma semelhante aos fungos micorrízicos produzindo compostos que podem estimular o crescimento e o mecanismo de defesa das plantas (Benítez *et al* 2004). Um dos mecanismos de ação biofertilizante deste fungo pode ser a suplementação das necessidades nutricionais das plantas pela solubilização de fosfatos (Gravel *et al* 2007, Machado *et al* 2011).

Para uma maior compreensão do potencial de aplicação de *Trichoderma* spp. também como biofertilizante, este estudo avaliou a capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*, através da produção das enzimas fosfatases (ácidas/alcalinas) e alteração de pH provocada no meio.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de isolados de *Trichoderma* spp.

Foram avaliados 23 isolados de *Trichoderma asperellum* (ICB01, ICB02, ICB03, ICB04, ICB06, ICB07, ICB08, ICB09, ICB10, ICB11, ICB12, ICB13, ICB14, ICB15, ICB16, ICB17, ICB18, ICB19, ICB20, ICB21, ICB22, ICB23 e ICB24), 1 isolado de

Trichoderma harzianum (ICB05) e 1 isolado de *Trichoderma virens* (ICB25). Os isolados pertencem a Micoteca da empresa ICB BIOAGRITEC Ltda. e foram cedidos pela mesma para o presente estudo.

Solubilização de fosfato

O cultivo prévio dos isolados foi realizado em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) a 28 °C durante 5 dias. Discos de 8,0 mm de diâmetro foram retirados das bordas destas colônias e então transferidos para o meio de cultura caldo PVK (10 g glicose, 5 g Ca₃(PO₄)₂, 0,2 g NaCl, 0,1 g MgSO₄, 0,2 g KCl, 0,5 g extrato de levedura, 0,002 g MnSO₄, 0,002 g FeSO₄ e 1000 mL água destilada) selecionado para o teste de solubilização de fosfato (Pikovskaya 1948), em frascos de Erlenmeyer com 250 mL de meio. Os frascos foram mantidos em temperatura de 28 °C sob agitação de 140 rpm durante cinco dias. As avaliações foram realizadas em intervalos de 24 h, 72 h e 120 h após o cultivo.

Para a determinação da concentração de fósforo solúvel utilizou-se o protocolo de Fiske & Subbarow (1925) e os resultados foram expressos como concentração de fosfato solúvel em µg.mL⁻¹.

Determinação da concentração enzimática da fosfatase

O cultivo prévio foi realizado em meio de cultura BDA a 28 °C durante 5 dias. Discos de 8,0 mm de diâmetro foram retirados das bordas destas colônias e então transferidos para o meio de cultura BD, mantidos em temperatura de 28 °C, sob agitação

de 140 rpm. Foram feitas avaliações 24 h, 72 h e 120 h após o cultivo. Uma alíquota de cada amostra foi retirada e centrifugada a 1200 rpm durante 20 min. O processo foi repetido por duas vezes sempre descartando o precipitado. A concentração enzimática ($\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi avaliada de acordo com a metodologia de Kersters & DeLey (1971).

A produtividade enzimática máxima foi calculada utilizando a Equação 1.

$$P_E = \frac{C_E}{t_p}$$

P_E = produtividade enzimática máxima;

C_E = concentração enzimática máxima;

t_p = tempo de produção

Determinação do tipo de fosfatase produzida

Para determinação do tipo de fosfatase produzida (ácida ou alcalina), os isolados foram inoculados em meio de cultura salino (Nahas *et al* 1994) contendo 1 g citrato de sódio, 1 g NH_4Cl , 0,2 g KCl , 1,2 g MgSO_4 , 0,1 g CaCl_2 , 10 g glicose, 0,5 g extrato de levedura, 1,5 % (p/v) ágar, 1000 mL água destilada. O pH do meio foi ajustado para 5,6. As placas foram incubadas a 28 °C pelo período de 72 h. A diferenciação entre o tipo de fosfatase produzida foi determinada pelo método de Nahas (2002).

Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como a média entre elas. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5 % e as médias comparadas pelo teste de Tukey. As análises de correlação foram efetuadas, calculando-se a equação de regressão e o coeficiente de correlação linear (r). O software utilizado para todas as análises estatísticas foi o Statistica 7.0 (Statsoft).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Solubilização de fosfato

Este trabalho demonstrou a capacidade de isolados de 3 diferentes espécies de *Trichoderma* na solubilização de fosfato de cálcio em meio PVK. Diferentes meios de cultura para solubilização de fosfato vêm sendo testados por diversos autores (Nautiyal 1999, Silva-Filho & Vidor 2000, Pradhan & Sukla 2005, Rawat & Tewari 2011). Todos os isolados de *Trichoderma* testados mostraram crescimento micelial em meio PVK. A eficiência do meio PVK em comparação com outros meios de cultura líquidos, incluindo os meios AYG, NBRIP e NBRIY, foi comprovada por Pradhan & Sukla (2005). Um dos fatores que pode facilitar o isolamento e seleção de microrganismos solubilizadores de fosfato neste meio é a presença do extrato de levedura e glicose no meio, o primeiro deles é utilizado pelos fungos como fonte de nitrogênio, o que seria um diferencial em relação aos demais meios testados (Pradhan & Sukla 2005, Souchie *et al* 2006, Souchie *et al* 2007).

O uso de fungos solubilizadores de fosfato é uma estratégia biotecnológica promissora para o manejo de fósforo no solo, uma vez que permite a utilização de fosfatos insolúveis, como o fosfato de rocha ou a recuperação de fósforo indisponível, fixo em partículas do solo (Mendes *et al* 2014).

A concentração de fosfato solubilizado aumentou gradualmente no período avaliado para todos os isolados, com exceção do isolado ICB21 que diminuiu após 120 h de cultivo, entretanto, essa diferença não foi considerada significativa ($p < 0,05$) (Tab. 1). O aumento inicial na concentração de fosfato solúvel no meio seguido por uma diminuição gradual com o decorrer do experimento é um fato recorrente e observado por diversos autores (Nautyial 1999, Kapri & Tewari 2010, Oliveira *et al*, 2012). A redução na concentração de fosfato solúvel no meio, pode ser correlacionada com o sequestro do nutriente pelo micélio do fungo para ser liberado de uma forma facilmente disponível quando próximo das raízes das plantas, após a lise do micélio com a senescência do fungo (Kapri & Tewari 2010).

A concentração de fosfato solúvel no meio não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tempos analisados para os isolados ICB02, ICB09, ICB20, ICB21 e ICB25 (Tab.1), para os demais isolados o período de 72 h de cultivo foi suficiente para alcançar resultados significativos ($p < 0,05$) na concentração de fosfato solúvel em meio PVK. Kapri & Tewari (2010) também observaram o aumento na concentração de fosfato solúvel após 72 h de cultivo de *Trichoderma* spp. em meio NBRIP, mostrando o elevado potencial deste fungo em solubilizar fosfato inorgânico, que poderia ser posteriormente utilizado pelo fungo em processos celulares.

Após 24 h de cultivo, a concentração de fosfato solúvel presente no meio PVK variou de 0,78 a 6,52 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ entre os tratamentos com inoculação (Tab.1), sendo que os isolados ICB01, ICB02, ICB03, ICB05, ICB13, ICB14, ICB18, ICB23 e ICB25 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Os demais isolados apresentaram solubilização superior ($p < 0,05$) ao controle testado. Os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21 apresentaram as maiores concentrações ($p < 0,05$) de fosfato solúvel neste período.

A concentração de fosfato solúvel presente no meio PVK variou de 1,16 a 7,75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ após 72 h de cultivo (Tab. 1). Nesse momento, os isolados ICB02 e ICB25 não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. Os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21 também solubilizaram as maiores concentrações ($p < 0,05$) de fosfato neste período.

Na avaliação realizada após 120 h de cultivo, a concentração de fosfato de cálcio solúvel no meio testado variou de 2,0 a 9,07 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tab. 1). Os isolados ICB06, ICB07, ICB08, ICB09 e ICB12 solubilizaram as maiores concentrações ($p < 0,05$) de fosfato no meio de cultura PVK neste período, enquanto os isolados ICB02 e ICB25 não diferiram do controle.

O isolado ICB08 apresentou a melhor atividade de solubilização, uma vez que apresentou a maior concentração de fosfato solúvel no meio de cultura desde a primeira avaliação, em 24 h após o cultivo, mantendo esse padrão em 72 h e 120 h de cultivo (Tab. 1).

A capacidade de *Trichoderma* spp. atuar como agente de biocontrole é um fato comprovado por uma ampla gama de autores (Howell 2003, Benítez *et al* 2004, Bae *et al*

2009, Carvalho *et al* 2011). Assim, além de atuar na disponibilização de nutrientes para as plantas, promovendo o seu crescimento, a capacidade de solubilizar nutrientes do ambiente está correlacionada com os mecanismos que atuam no controle biológico, como a competição (Howell 2003, Benítez *et al* 2004, Berg 2009). Altomare *et al* (1999) relatam a possibilidade de um isolado com elevado potencial de solubilização de fosfato atuar na supressão de patógenos de solo, como *Pythium* e *Rhizoctonia*, que são incapazes de solubilizar este nutriente do solo, devido à alta eficiência e competitividade.

Muitos microrganismos podem mobilizar fósforo a partir de fosfatos inorgânicos simplesmente pela redução do pH que ocorre como resultado da atividade metabólica (Wakelin *et al* 2004). Segundo Mendes *et al* (2014) a acidificação do meio é um dos mecanismos efetivos na solubilização, especialmente para $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. A exsudação celular de H^+ para o balanço da absorção de NH_4^+ pode reduzir o pH das soluções e propicia o aumento de algumas formas de fosfato de cálcio (Asea *et al* 1988). Além disso, a produção de ácidos orgânicos pelos fungos também pode ser um mecanismo responsável por acidificar o meio (Rudresh *et al* 2005). Todos os isolados testados neste experimento reduziram o valor do pH em relação ao pH inicial do meio após 120 h ($p < 0,05$) (Tab. 2). O pH variou entre 6,0 a 4,1 no intervalo de tempo de 0 até 120 h de cultivo. Estes valores de pH estão em acordo com os resultados encontrados por Illmer & Schinner (1995), Kapri & Tewari (2010) e Oliveira *et al* (2012).

Em análise de correlação entre os melhores resultados de solubilização de fosfato e o pH do meio, demonstrou-se que existe correlação negativa entre as variáveis (Fig. 1). Kpoblekou & Tabatabai (1994) sugerem que microrganismos que tendem a reduzir o pH do meio durante o seu crescimento são eficientes na solubilização de fosfato. Rawat & Tewari (2011) demonstraram que *Trichoderma* spp. podem crescer e solubilizar fosfato

de forma eficiente tanto em meio ácido quanto alcalino. Este fato demonstra que a acidificação do meio por *Trichoderma* spp. pode não ser o único mecanismo envolvido na solubilização de fosfatos para este fungo.

Determinação da concentração enzimática da fosfatase

O teor de fosfato solúvel encontrado em ensaios de inoculação com microrganismos solubilizadores também pode decorrer da atividade das fosfatases em liberar fosfato de origem orgânica (Nahas 1991). Inúmeras fosfatases são reconhecidas por sua habilidade em hidrolisar mono ou diésteres fosfóricos (Feder 1973). As fosfatases compreendem um amplo grupo de enzimas fitases, nucleases e fosfolipases, podendo formar no final do processo de hidrólise, fosfomonoesterases (Pang & Kolenko 1986). Em média 10 % dos fungos, além de solubilizadores, possuem também atividade das fosfatases ácida e alcalina (Nahas *et al* 1994).

Todos os isolados testados neste experimento apresentaram crescimento micelial em meio BD. As maiores concentrações enzimáticas são obtidas a partir de 72 h após o cultivo para a maioria dos isolados, com exceção dos isolados ICB17 e ICB25, que não demonstraram variação significativa na concentração enzimática no intervalo de tempo testado ($p < 0,05$) (Tab. 3). A maior produção de fosfatase ácida e alcalina em meio PVK foi obtida por Kapri & Tewari (2010) no intervalo de 72 h. Segundo estes autores, o declínio na atividade das fosfatases após esse período é devido a inibição das enzimas pela completa dissolução de fosfato de cálcio no meio de cultura.

Após 24 h todos os isolados produziram concentrações semelhantes das enzimas fosfatases ($p < 0,05$), variando de 3,45 a 25,60 mmol.L⁻¹ (Tab. 3). As concentrações

variaram entre 4,09 e 179,69 mmol.L⁻¹ quando considerado o tempo de 72 h (Tab. 3). O isolado ICB18 obteve a maior concentração enzimática (179,69 mmol.L⁻¹), diferindo significativamente dos demais isolados testados ($p < 0,05$), enquanto os isolados ICB01, ICB02, ICB03, ICB04, ICB06, ICB 07, ICB08, ICB09 e ICB24 produziram as menores concentrações enzimáticas.

No intervalo de 120 h após a inoculação, as concentrações enzimáticas variaram de 51,12 a 239,88 mmol.L⁻¹ (Tab. 3). O isolado ICB03 produziu a maior concentração enzimática, enquanto os isolados ICB01, ICB06, ICB08, ICB09, ICB10, ICB11, ICB12, ICB13, ICB14, ICB15, ICB16, ICB17, ICB19, ICB20, ICB21, e I CB25 foram os que produziram as menores concentrações.

Para a determinação da produtividade enzimática máxima, foram utilizados na Equação 1 os valores das concentrações referentes aos isolados ICB18 em 72 h e do isolado ICB03 em 120 h, que apresentaram as maiores concentrações enzimáticas entre os isolados testados. Com o quociente de 2,49 mmol.L⁻¹.h⁻¹, o isolado ICB18 em 72 h foi considerado a maior produtividade enzimática neste experimento.

Os resultados obtidos neste experimento indicam o potencial de isolados de *Trichoderma* spp. produzirem enzimas que possam atuar na solubilização de fosfatos. Aseri *et al* (2009) compararam a atividade enzimática de *Trichoderma* sp. com *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Pseudeurotium* sp. e comprovaram produtividade superior de fosfatase ácida e fosfatase alcalina por este fungo. Os mesmos autores ainda indicaram que a atividade média da fosfatase ácida intracelular foi duas vezes maior do que a secreção de fosfatase ácida extracelular por unidade de peso seco.

Quando considerados os melhores resultados para a solubilização de fosfato (ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21) em correlação com os valores da concentração de fosfatases produzida por estes isolados, foi possível verificar uma correlação moderada entre as variáveis (Fig. 2).

Foi possível identificar o tipo de fosfatase produzida por todos os isolados testados. Entre os isolados testados, 76 % produzem tanto fosfatase ácida quanto fosfatase alcalina, 12 % produzem apenas fosfatase alcalina (ICB06, ICB20 e ICB23) e 12 % dos isolados (ICB09, ICB13 e ICB25) produzem apenas fosfatase ácida (Tab. 3). Embora as concentrações de fosfatases ácida e alcalina não tenham sido mensuradas neste trabalho, Nahas *et al* (1994) constataram que fungos produzem maiores concentrações de fosfatases ácidas, enquanto bactérias produzem maiores concentrações de fosfatases alcalinas.

CONCLUSÃO

1. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. testados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio em meio de cultura PVK.
2. A acidificação do meio e a produção de fosfatases são mecanismos envolvidos na solubilização de fosfato de cálcio por isolados de *Trichoderma* spp.
3. O isolado ICB18 (*T. asperellum*) apresentou a maior atividade enzimática e foi capaz de produzir fosfatases ácidas e alcalinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMORE, C., NORVELL, W.A., BJÖRKMAN, T. & HARMAN, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental microbiology*, 65 (5): 2926-2933.

ASEA, P.E.A., KUCEY, R.M.N. & STEWART, J.W.B. 1988. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 459–464.

ASERI, G.K., JAIN, N. & TARAFDAR, J.C. 2009. Hydrolysis of organic phosphate forms by phosphatases and phytase producing fungi of arid and semi arid soils of India. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 5 (4): 564-570.

BAE, H., SICHER, R.C., KIM, M.S., STREM, M.D., ELNICK, R.L. & BAILEY, B.A. 2009.

The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany*, 60 (11): 3279-3295.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C. & CODÓN, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7: 249-260.

BERG, G. 2009. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 11-18.

CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO-JÚNIOR, M. & SILVA, M.C. 2011. 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*, 36 (1): 28-34.

FEDER, J. The phosphatases. In: GRIFITH, E.J.; BECTEN, A.; SPENCER, J.M.; MITCHEL, D.T. *Environmental phosphorus handbook*. New York: John Wiley, 1973. p.475-507.

FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 66: 375-400.

GOLDSTEIN, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. *American Journal of Alternative Agriculture*, 1 (2): 51-57.

GRAVEL, V., ANTOUN, H. & TWEDDELL, R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of índole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*, 39 (8): 1968-1977.

HOWELL, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological controlo f plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*, 87 (1): 4-10.

ILLMER, P., BARBATO, A. & SCHINNER, F. 1995. Solubilization of hardly- soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27 (3): 265-270.

KAPRI, A. & TEWARI, L. 2010. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*.

KERSTERS, K. & DELEY, J. Enzymic tests with resting cells and cell-free extracts. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D.W. (Ed.). *Methods in Microbiology*. New York: Academic Press. 1971. p.33-52.

KIM, K.Y., JORDAN, D. & MCDONALD, G.A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular- arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. 1997. *Biology and Fertility of Soils*, 26 (2): 79-87.

KPOMBLEKOU, A.K. & TABATABAI, M.A. 1994. Effect of organic acids on the release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*, 158: 112-118.

LEITÃO, V.O., LIMA, R.C.M., VAINSTEIN, M.H. & ULHOA, C.J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. 2010. *Biotechnology Letters*, 32: 1083-1088.

MACHADO, R.G., SÁ, E.L.S., DAMASCENO, R.G., HAHN, L., ALMEIDA, D., MORAES, T., CAMARGO, F.A.O. & REARTES, D.S. 2011. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. *Ciência e Natura*, 33 (2):111-126.

MAHESWAR, N.U. & SATHIYAVANI, G. 2012. Solubilization of phosphate by *Bacillus* Sps, from groundnut rhizosphere (*Arachishypogaea* L). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 4 (8): 4007-4011.

- MENDES, G.O., FREITAS, A.L.M., PEREIRA, O.L., SILVA, I.R., VASSILEV, N.B. & COSTA, M.D. 2014. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, 64: 239-249.
- MORANDI, M.A.B & BETTIOL, W. 2009. 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. 7-15.
- NAHAS, E. 1991. Ciclo do fósforo: transformações microbianas. Jaboticabal: FUNEP; 1991. 67p.
- NAHAS, E., CENTURION, J.F. & ASSIS, L.C. 1994. Microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases de vários solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 18: 43-48.
- NAHAS, E. 2002. Microrganismos de solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. 2002. *Bragantia*, 61 (3): 267-275.
- NAUTIYAL, C.S. 1999. Na eficiente microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170 (1): 265-270.
- OLIVEIRA, A.G., CHAGAS-JUNIOR, A.F., SANTOS, G.R., MILLER, L.O. & CHAGAS, L.F.B. 2012. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp.. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 7 (3): 149-155.
- OMAR S.A. 1998. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14 (2): 211-218.

PANG, P.C.K. & KOLENKO, H. 1986. Phosphomonoesterase activity in forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 18 (1): 35-40.

PIKOVSKAYA, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*, 17: 362-370.

PRADHAN, N. & SUKLA, L.B. 2005. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *African Journal of Biotechnology*, 5 (10): 850-854.

RAWAT, R. & TEWARI, L. 2011. Effects of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. *Current Microbiology*, 62: 1521-1526.

RUDRESH, D.L., SHIVAPRAKASH, M.K & PRASAD, R.D. 2005. Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 217-222.

SCHACHTMAN, D.P., REID, R.J. & AYLING, S.M. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology*, 116:447-453.

SILVA-FILHO, G.N. & VIDOR, C. 2000. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24: 311-319.

SOUCHIE, E.L., ABOUD, A.C.S. & CAPRONI, A.L. 2007. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de Guandu. *Bioscience Journal*, 23 (2): 53-60.

SOUCHIE, E.L., SAGGIN-JUNIOR, O.J., SILVA, E.M.R., CAMPELLO, E.F.C., AZCÓN, R. & BAREA, J.M. 2006. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secundar forest of Paraty, RJ – Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 76 (1): 183-193.

WAKELIN, S.A., WARREN, R.A., HARVEY, P.R. & RYDER, M.H. 2004. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 40: 36–43.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

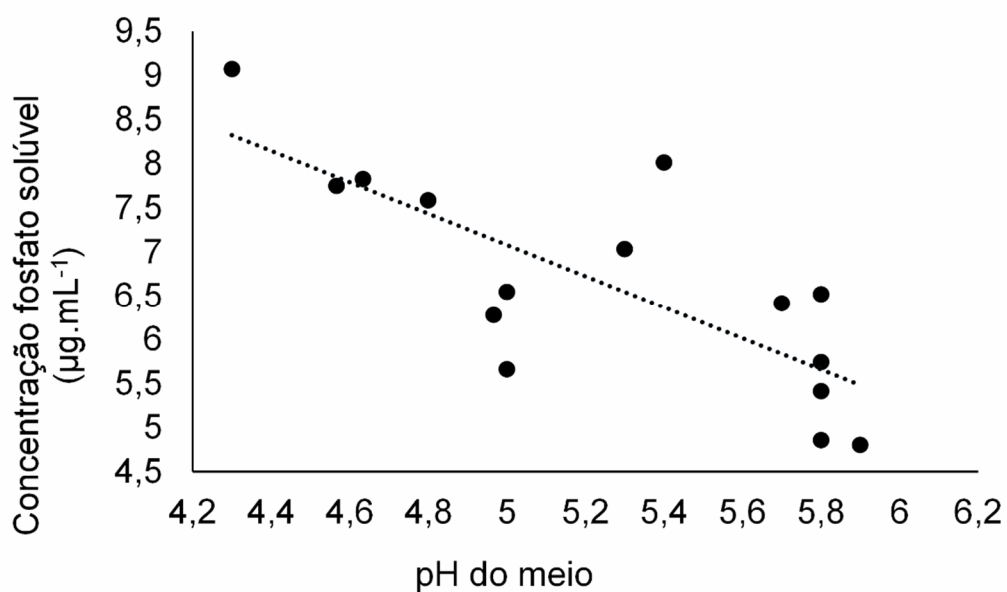


Figura 1. Relação entre a solubilização de fosfato com o pH do meio para os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21. Equação de regressão: $y = - 94,01x + 576,62$, $r = - 0,72^*$. * Correlação negativa significativa ($p < 0,05$).

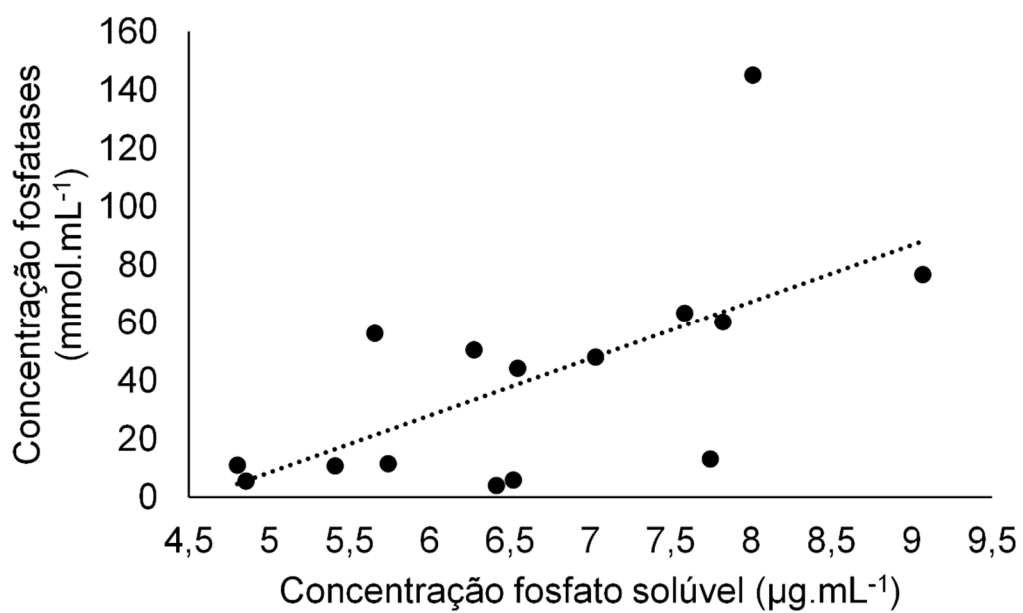


Figura 2. Relação entre a solubilização de fosfato e concentração de fosfatases para os isolados ICB07, ICB08, ICB09, ICB12 e ICB21. Equações de regressão: (A): $y = 19,587x - 89,50$, $r = 0,63^*$. * Correlação negativa significativa ($p < 0,05$).

Tabela 1. Solubilização de fosfato de cálcio (10 g.L⁻¹) em meio PVK por isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos de tempo (h).¹

Isolados	Concentração de fosfato solubilizado (µg.mL ⁻¹)		
	24h	72h	120h
ICB01	1,52 ^{bGHI}	2,82 ^{abGHI}	4,07 ^{aGHI}
ICB02	0,78 ^{aHI}	1,16 ^{aJ}	2,00 ^{aJ}
ICB03	1,80 ^{bAGHI}	3,60 ^{abEFGH}	5,27 ^{aGEFGH}
ICB04	2,96 ^{bDEFGH}	4,18 ^{abEFG}	5,67 ^{aDEFG}
ICB05	1,87 ^{bGHI}	3,64 ^{aEFGH}	5,89 ^{aCDEFG}
ICB06	4,30 ^{bBCDE}	5,53 ^{abBCDE}	7,23 ^{aABCDE}
ICB07	4,80 ^{bABCD}	6,41 ^{abABC}	8,01 ^{aAB}
ICB08	6,52 ^{bA}	7,75 ^{abA}	9,07 ^{aA}
ICB09	5,74 ^{aAB}	6,55 ^{aABC}	7,59 ^{aABCD}
ICB10	3,14 ^{bDEFGH}	4,20 ^{abDEFG}	5,57 ^{aDEFG}
ICB11	2,95 ^{bDEFGH}	4,08 ^{abEFG}	5,70 ^{aDEFG}
ICB12	4,86 ^{bABCD}	6,28 ^{abABCD}	7,82 ^{aABC}
ICB13	1,67 ^{bGHI}	2,65 ^{abGHI}	4,74 ^{aFGH}
ICB14	2,13 ^{bFGHI}	3,41 ^{abFGH}	5,16 ^{aEFGH}
ICB15	2,88 ^{bDEFGH}	3,87 ^{abEFGH}	5,22 ^{aEFGH}
ICB16	2,54 ^{bEFGH}	4,08 ^{abEFG}	5,36 ^{aEFGH}
ICB17	2,64 ^{bEFGH}	3,96 ^{abEFGH}	5,32 ^{aEFGH}
ICB18	2,04 ^{bGHI}	3,41 ^{abFGH}	5,03 ^{aFGH}
ICB19	2,65 ^{bEFGH}	4,18 ^{abEFG}	5,50 ^{aDEFG}
ICB20	3,40 ^{aCDEFG}	4,55 ^{aCDEFG}	5,27 ^{aEFGH}
ICB21	5,41 ^{aABC}	7,03 ^{aAB}	5,66 ^{aDEFG}
ICB22	3,16 ^{bDEFGH}	4,01 ^{abEFGH}	5,37 ^{aEFG}
ICB23	2,29 ^{bEFGHI}	3,98 ^{abEFGH}	5,07 ^{aFGH}
ICB24	4,16 ^{bBCDEF}	5,33 ^{abBCDEF}	6,59 ^{aBCDEF}
ICB25	1,75 ^{aGHI}	1,96 ^{aHIJ}	3,44 ^{aHI}
Controle	0,35 ^{aI}	0,36 ^{aJ}	0,36 ^{aJ}

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey 5%.

Tabela 2. pH do meio PVK, após a inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos de tempo (h)¹.

Isolados	pH do meio			
	Inicial	24h	72h	120h
ICB01	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,3 ^{bCDEFG}	5,0 ^{bCDEFG}
ICB02	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,3 ^{bCDEFG}	4,8 ^{cDEFG}
ICB03	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,2 ^{bEFGH}	4,9 ^{bDEFG}
ICB04	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,1 ^{bFGH}	4,9 ^{bDEFG}
ICB05	6,0 ^{aA}	6 ^{aA}	5,3 ^{bCDEFG}	4,9 ^{bCDEFG}
ICB06	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	4,9 ^{bGHI}	4,6 ^{bGH}
ICB07	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,7 ^{abABC}	5,4 ^{bB}
ICB08	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	4,6 ^{bIJ}	4,3 ^{bHI}
ICB09	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,0 ^{bGH}	4,8 ^{bEFG}
ICB10	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,1 ^{bFGH}	4,9 ^{bCDEFG}
ICB11	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aAB}	5,3 ^{bBC}
ICB12	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,0 ^{bGHI}	4,6 ^{bFGH}
ICB13	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,3 ^{bCDEFG}	4,9 ^{bCDEFG}
ICB14	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,0 ^{bGH}	4,6 ^{cFGH}
ICB15	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,2 ^{bCDEFG}	4,9 ^{bCDEFG}
ICB16	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,4 ^{bCDEF}	5,0 ^{cCDEFG}
ICB17	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	4,8 ^{bHIJ}	4,6 ^{bGH}
ICB18	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	4,4 ^{bJ}	4,1 ^{bI}
ICB19	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,2 ^{bEFGH}	4,7 ^{cFGH}
ICB20	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,6 ^{aABCD}	5,2 ^{bBCDE}
ICB21	6,0 ^{aA}	5,8 ^{aA}	5,3 ^{bCDEFG}	5,0 ^{bCDEF}
ICB22	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,0 ^{bGH}	4,3 ^{cHI}
ICB23	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	5,5 ^{bBCDE}	5,2 ^{bBCD}
ICB24	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,0 ^{bGH}	4,4 ^{cHI}
ICB25	6,0 ^{aA}	5,9 ^{aA}	5,5 ^{bCDEF}	5,0 ^{cCDEF}
Controle	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	6,0 ^{aA}	6,1 ^{aA}

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey 5%.

Tabela 3. Produção de enzimas fosfatase em meio BDA e tipo de fosfatase pro por isolados de *Trichoderma* spp. em diferentes intervalos de tempo (h)¹ e tipo de fosfatase produzida.

Isolados	Concentração de fosfatases (mmol.mL ⁻¹)			Fosfatase produzida
	24h	72h	120h	
ICB01	3,93 ^{ba}	19,02 ^{abCDEFGH}	58,99 ^{aGH}	Ácida/Alcalina
ICB02	17,58 ^{ba}	5,94 ^{bGH}	101,60 ^{aDEFG}	Ácida/Alcalina
ICB03	4,41 ^{ba}	8,59 ^{bFGH}	239,88 ^{aA}	Ácida/Alcalina
ICB04	3,45 ^{ba}	34,67 ^{bCDEFGH}	184,99 ^{aB}	Ácida/Alcalina
ICB05	25,60 ^{ba}	67,49 ^{abB}	106,66 ^{aCDEF}	Ácida/Alcalina
ICB06	7,86 ^{ba}	10,27 ^{bEFGH}	64,44 ^{aFGH}	Alcalina
ICB07	10,99 ^{ba}	4,09 ^{bH}	145,10 ^{aBC}	Ácida/Alcalina
ICB08	5,86 ^{ba}	13,16 ^{bEFGH}	76,64 ^{aEFGH}	Ácida/Alcalina
ICB09	11,48 ^{ba}	44,22 ^{abBCDEFGH}	63,40 ^{aFGH}	Ácida
ICB10	6,18 ^{ba}	50,56 ^{abCDEF}	78,89 ^{aEFGH}	Ácida/Alcalina
ICB11	7,86 ^{ba}	77,69 ^{aB}	63,32 ^{aFGH}	Ácida/Alcalina
ICB12	5,54 ^{ba}	50,56 ^{abCDEF}	60,27 ^{aGH}	Ácida/Alcalina
ICB13	12,44 ^{ba}	53,05 ^{abBCDE}	81,14 ^{aEFGH}	Ácida
ICB14	3,53 ^{ba}	48,23 ^{abCDEFG}	53,93 ^{aH}	Ácida/Alcalina
ICB15	8,67 ^{ba}	54,65 ^{abCD}	78,89 ^{aEFGH}	Ácida/Alcalina
ICB16	7,70 ^{ba}	54,65 ^{abCD}	64,77 ^{aFGH}	Ácida/Alcalina
ICB17	22,47 ^{aA}	49,36 ^{abCDEFG}	65,723 ^{aFGH}	Ácida/Alcalina
ICB18	24,24 ^{ba}	179,69 ^{aA}	138,76 ^{aCD}	Ácida/Alcalina
ICB19	9,31 ^{ba}	49,60 ^{abBCDEF}	92,93 ^{aEFGH}	Ácida/Alcalina
ICB20	10,83 ^{ba}	65,33 ^{aB}	60,99 ^{aGH}	Alcalina
ICB21	10,75 ^{ba}	48,07 ^{abBCDEFG}	56,34 ^{aH}	Ácida/Alcalina
ICB22	10,03 ^{ba}	66,93 ^{aB}	118,22 ^{aCDE}	Ácida/Alcalina
ICB23	19,26 ^{ba}	60,67 ^{bBC}	114,36 ^{aCDE}	Alcalina
ICB24	20,06 ^{ba}	42,29 ^{bCDEFGH}	141,73 ^{aBCD}	Ácida/Alcalina
ICB25	16,21 ^{aA}	54,57 ^{abCD}	51,12 ^{aH}	Ácida

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula não diferem entre si na linha e médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey 5%.

4.3 ARTIGO 3: Inoculação *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento e nutrição em feijoeiro³

³Artigo será submetido ao Comitê Editorial do Periódico Científico Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

Inoculação de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento e nutrição em feijoeiro.

Priscila Pauly Ribas⁽¹⁾, Aida Terezinha dos Santos Matsumura⁽²⁾ e Sueli Teresinha Van Der Sand⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Rua Sarmiento Leite, 500, sala 052, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: pripauly@gmail.com, svands@ufrgs.br ⁽²⁾ICB BIOAGRITEC LTDA, Rua Arabutan, 386, CEP: 90240-470, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: aida@ufrgs.br

Resumo – Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da inoculação de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de feijoeiro comum. Foram testados 25 isolados de *Trichoderma* em testes de germinação e vigor de sementes, promoção de crescimento e nutrição de plantas cultivadas em casa de vegetação. Todos os tratamentos aumentaram o percentual de germinação de sementes em relação à testemunha e os tratamentos com *Trichoderma* spp. também aumentaram a porcentagem de germinação após o período de envelhecimento precoce. Os tratamentos não apresentaram diferença significativa no comprimento radicular das plantas, enquanto o tratamento TA18 aumentou o comprimento da parte aérea das plantas quando comparado à testemunha. Quando avaliado o N no tecido das plantas, os tratamentos TA02, TA18 e TV25 não alcançaram a faixa de suficiência indicada para plantas de feijão. Os demais nutrientes avaliados estavam de acordo com a faixa de suficiência, ou acima desses valores. Apenas o tratamento TA02 apresentou deficiência em Zn nas plantas. O uso de *Trichoderma* spp. garante uma maior porcentagem de germinação e vigor nas sementes tratadas, entretanto

o efeito direto dos isolados testados na promoção de crescimento não pode ser garantida para estes isolados com os experimentos realizados neste trabalho.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris* L., *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*,

Trichoderma spp. inoculation in promoting growth and nutrition in beans culture.

Abstract This study aimed to evaluate the inoculation effect of *Trichoderma* spp. in growth promotion of common bean. It was tested twenty-five isolates of *Trichoderma* in germination and seed vigor tests, growth promotion and nutrition of cultivated plants in greenhouse. All treatments increased the percentage of seed germination compared to the control and the treatments containing *Trichoderma* spp. also increased germination percentage after the period of premature aging. The treatments showed no significant differences in root length of the plants, while the TA18 treatment increased the length of the air part of the plant when compared to control. When it was investigated the N in the plant tissue, the TA02, TA18 and TV25 treatments did not reach the sufficiency range indicated for bean plants. The other nutrients were evaluated according to the sufficiency range or above these values. Only treatment TA02 showed Zn deficiency in plants. The use of *Trichoderma* spp. ensures a higher germination and vigor percentage in treated seeds. However, the direct effect of the isolates tested in growth promotion can not be guaranteed for these isolates with the experiments performed in this work.

Index terms: *Phaseolus vulgaris* L., *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma virens*

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, com a produtividade na safra 2012/2013 avaliada em 2.829,1 mil t, em 3.061,2 mil ha com um rendimento médio de 924 kg ha (CONAB, 2013). Esses dados confirmam a importância não apenas econômicas, mas também social do grão para o país. Com o desenvolvimento de epidemias e escassez de nutrientes no solo, a agricultura passou a depender de insumos químicos, como fertilizantes e agrotóxicos (Friguetto, 1997; Berg, 2009). Entretanto, a utilização desses produtos sem amparo técnico aos produtores rurais, que até hoje realizam aplicações desnecessárias, em volumes maiores do que o recomendado e sem indicação de um agrônomo, têm provocado diversos impactos ambientais e na saúde do homem (Gunnel, et al., 2007; Leach & Mumford, 2008; Berg, 2009). Devido ao aumento dos problemas associados ao uso de produtos químicos sintéticos, o interesse no uso de microrganismos benéficos, sejam eles nativos ou não, com o objetivo de proporcionar sanidade vegetal, aumento da produtividade reduzindo os riscos à saúde do consumidor e os impactos ambientais só tem aumentado (Avis et al., 2008).

Os microrganismos promotores de crescimento vegetal podem ser empregados com a mesma finalidade dos fertilizantes, pois possuem um importante papel na produção vegetal e aumento da fertilidade do solo através de diferentes mecanismos, como fixação biológica do nitrogênio, solubilização de fosfatos, aquisição de macro e micronutrientes essenciais, produção de substâncias promotoras do crescimento e atividade de biocontrole (Vessey, 2003; Saharan & Nehra, 2011, Verma et al., 2014). Várias espécies de *Rhizobium* são empregadas neste sentido na cultura do feijão, entre eles *Rhizobium tropici*, que é nativo das regiões tropicais da América do Sul (Martínez-Romero et al.,

1991) e representa a maior população de *Rhizobium* em feijão em alguns solos brasileiros (Hungria et al., 1997a; Hungria et al., 1997b).

Além de bactérias, os produtos utilizados com finalidade de fertilizantes podem ter em seu conteúdo células vivas ou latentes de microrganismos como leveduras, algas e fungos filamentosos (Medeiros & Lopes, 2006). Algumas espécies de *Trichoderma* provocam efeitos benéficos no crescimento das plantas e aumentam à resistência aos estresses bióticos e abióticos (Hermosa et al., 2012). A ação de *Trichoderma* sp. ocorre por meio dos mecanismos de parasitismo, antibiose, competição por nutrientes e substratos, produção de enzimas extracelulares e antibióticos, que elevam sua capacidade hiperparasita, competitiva e garante eficiência no biocontrole, promoção de crescimento das plantas e indução de resistência contra diversos patógenos (Howell, 2003; Harman et al., 2004; Benitez et al., 2004, Hermosa, et al., 2012).

Tendo como um dos principais desafios para este século uma produção agrícola sustentável e ambientalmente saudável (Berg, 2009), a biotecnologia de plantas tem pode contribuir para o desenvolvimento de novas variedades com maior resistência a patógenos, tolerância a seca e sal e melhores valores nutricionais, entretanto, não podemos desconsiderar as interações benéficas que ocorrem entre plantas e microrganismos (Smith et al., 1999). Entre estas interações benéficas, podemos citar a promoção de crescimento das planta, que em comparação com o uso de fertilizantes são mais seguros, reduzem os danos ambientais e à saúde humana, apresentam atividade direcionada, são eficientes em menores quantidades, tem sua população controlada pelas plantas e pela população de microrganismos nativos, se decompõem mais rapidamente que os produtos químicos convencionais e podem ser empregados tanto em sistemas convencionais como em estratégias de manejo integrado (Berg, 2009), por isso, o estudo

dos microrganismos desejados antes de sua aplicação pode garantir a eficiência destes em campo. Tendo em vista o cenário dos microrganismos promotores de crescimento, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da inoculação de *Trichoderma* spp. no tratamento de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em casa de vegetação, visando avaliar os parâmetros para a promoção de crescimento vegetal.

Materiais e métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia e na Casa de Vegetação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Nos experimentos realizados foram testados 13 isolados de *Trichoderma* spp.. Os isolados pertencem a três diferentes espécies, identificados como ICB02, ICB03, ICB06, ICB07, ICB08, ICB11, ICB13, ICB14, ICB16, ICB17, ICB18 (*Trichoderma asperellum*), ICB05 (*Trichoderma harzianum*) e ICB25 (*Trichoderma virens*) e pertencem à Micoteca da empresa ICB BIOAGRITEC LTDA., Porto Alegre, Brasil. Foram utilizadas sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), sem nenhum tratamento químico, em todos os experimentos.

Para os testes de germinação e vigor das sementes, as mesmas receberam diferentes tratamentos combinados, que estão apresentados na Tabela 1. Nos tratamentos correspondentes ao uso de isolados de *Trichoderma* spp. as sementes foram mantidas por 8 h em solução de esporos na concentração de 10^7 esporos.mL⁻¹. O teste de germinação das sementes, foi conduzido de acordo com as Regras para Análise de Sementes (Brasil,

1992). Foram realizadas 3 repetições de 50 sementes para cada tratamento, em câmara de germinação (BOD) à temperatura constante de 27 ± 2 °C. A semeadura foi realizada em caixas plásticas sobre papel filtro umedecido em água destilada autoclavada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato seco. A contagem do número de sementes germinadas foi realizada no quinto dia após a semeadura. Os valores obtidos foram expressos na forma de porcentagem de germinação.

Para verificar o vigor das sementes medido após envelhecimento acelerado, foi empregada a metodologia de Resende et al., 2003. O experimento foi conduzido em triplicata de 50 sementes para cada tratamento. As sementes foram mantidas no interior de caixas plásticas tipo gerbox contendo 40 mL de água deionizada esterilizada, distribuídas uniformemente sobre uma superfície telada. As caixas vedadas foram mantidas em câmara de germinação (BOD), com temperatura de 40 ± 2 °C por um período de 72 h. Após o período de envelhecimento, as sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme já descrito anteriormente e a contagem do número de sementes germinadas foi realizada no quinto dia após a semeadura. O vigor das sementes foi expresso em porcentagem de sementes germinadas.

O experimento que avaliou a promoção de crescimento e a avaliação nutricional consistiu em 16 tratamentos e 3 repetições, totalizando 48 plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), dispostos em um delineamento inteiramente casualizado. 13 tratamentos contendo os diferentes isolados de *Trichoderma* spp., um contendo uma mistura entre todos os isolados de *Trichoderma* spp., um tratamento com adição de NH_4NO_3 em dose correspondente a $60 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ e uma testemunha sem nenhum tratamento (Tabela 1).

As sementes foram previamente desinfestadas método de imersão em soluções desinfestantes de álcool e hipoclorito de sódio e lavadas em água destilada estéril. Após a desinfestação as sementes foram pré-germinadas em rolos de papel filtro, que foram mantidos em câmara de germinação (BOD) com temperatura de 27 ± 2 °C umedecidos constantemente em água destilada estéril, durante cinco dias.

As soluções de esporos dos isolados de *Trichoderma* spp. (10^7 esporos.mL⁻¹) foram aplicadas no sulco de semeadura em um volume de 5 mL /planta. Para a semeadura das plântulas foram utilizados vasos de Leonard com substrato autoclavado de vermiculita e areia (2:1 v/v) na parte superior do vaso, e na parte inferior do vaso contendo a solução nutritiva de Sarruge (1975) modificada (sem nitrogênio), que era repostada a cada três dias, completando o volume dos vasos.

O experimento foi realizado durante 32 dias, no período de dezembro de 2013 a janeiro de 2014, até que o estágio R6 (floração) foi observado nas primeiras plantas. Neste momento foram realizadas as medidas de comprimento da parte aérea e comprimento das raízes.

Após as análises de promoção do crescimento, as amostras vegetais foram levadas ao Laboratório de Análise de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS, onde foram realizadas as análises nutricionais (macro e micronutrientes) das plantas, de acordo com as metodologias de Tedesco et al., 1995.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores foram expressos como a média entre elas. Os dados foram submetidos ao teste de variância (ANOVA) com nível de significância de 5 % e as médias foram analisadas pelo testes de Tukey ou Scott-Knott de acordo com o experimento realizado. Os softwares utilizados

para as análises estatística foram o Statistica 7.0 (Statsoft) e SASM-Agri (Canteri et al., 2001).

Resultados e discussão

Ao avaliar o efeito de *Trichoderma* spp. em diferentes tratamentos na germinação das sementes de feijão comum, foi possível observar que após cinco dias da inoculação, todos os tratamentos mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação à testemunha (C1), demonstrando que as sementes apresentam maior porcentual de germinação após submetidas aos tratamentos realizados (Tabela 2).

Após o período de envelhecimento das sementes, foi possível observar uma maior porcentagem de germinação ($p < 0,05$) nas sementes que receberam o tratamento com *Trichoderma* spp. em relação as sementes que não foram submetidas à nenhum tratamento (Tabela 2). As sementes submetidas aos tratamentos TA02 e Tmix apresentaram as menores porcentagem de germinação em relação aos demais tratamentos realizados com *Trichoderma* spp. entretanto, apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) do resultado obtido na testemunha (Tabela 2). Com base nas conclusões obtidas por Bassan et al. (2001), o tratamento TA02 inviabilizou as sementes, uma vez que os valores observados para a germinação foram inferiores a 80%.

Alguns metabólitos microbianos podem influenciar a germinação e emergência das sementes. A inibição ou estimulação da germinação pode ser relacionada com substâncias como giberelinas e o ácido abscísico (Celar & Valic, 2005). *Trichoderma* spp. pode produzir enzimas degradadoras da parede celular que podem induzir a síntese

de etileno nas sementes, auxinas, citoquininas e giberelinas que acentuam o potencial de biofertilização (El-Katatny, 2010; Benítez et al., 2004).

A Figura 1 mostra os valores referentes ao comprimento médio da parte aérea das plantas e comprimento médio do sistema radicular. Quando observado o comprimento médio da parte aérea é possível visualizar um aumento significativo ($p < 0,05$) nos resultados das plantas submetidas ao tratamento TA18 em relação ao tratamento Ttest (Figura 1). Todos os tratamentos realizados aumentaram o comprimento da parte aérea das plantas sem apresentar diferença estatística entre os tratamentos (Figura 2). Quando considerado o comprimento radicular das plantas, nenhum tratamento mostrou efeito positivo significativo no desenvolvimento radicular das plantas (Figura 1).

Carvalho et al. (2011) observou que sementes de feijão tratadas com cinco isolados de *Trichoderma harzianum* apresentavam maior comprimento da parte aérea em relação à testemunha, o maior valor foi encontrado quando as sementes foram tratadas com o isolado CEN240. Em relação ao comprimento do sistema radicular, o isolado CEN239 proporcionou resultados superiores ao comprimento radicular da testemunha, os demais isolados foram inferiores à testemunha, o que segundo os autores sugere um efeito negativo desses isolados sobre o desenvolvimento do sistema radicular. Contreras-Cornejo et al. (2009) atribuem o melhor desenvolvimento radicular, principalmente o desenvolvimento de raízes laterais, em plantas que foram submetidas ao tratamento com *Trichoderma virens* a sua capacidade de sintetizar e mediar os efeitos da auxina.

Todas as plantas foram avaliadas em relação à % de nitrogênio (massa/massa) (Tabela 3). Foi possível verificar que as plantas que receberam os tratamentos TA02, TA18 e TV25 não alcançaram a faixa de suficiência de nitrogênio sugerida por Tedesco et al. (2004). Plantas com deficiência desse elemento apresentam-se atrofiadas e as folhas

revelam coloração verde-pálido e amarela, que se inicia em folhas mais velhas e relaciona-se com a participação do nitrogênio na estrutura da molécula da clorofila (Oliveira et al., 1996).

Uma maior captação e melhor uso dos nutrientes são características atribuídas aos microrganismos promotores de crescimento vegetal (Benítez et al., 2004). Através da avaliação do tecido vegetal das plantas analisadas neste experimento, foi possível constatar que as plantas de todos os tratamentos encontram-se na faixa de suficiência para o Cu e estão acima do valor estabelecido para Mn e Fe (Tabela 3).

Problemas nutricionais envolvendo deficiência ou excesso de Cu são menos comuns, uma vez que a absorção de Cu ocorre ativamente como Cu^{2+} ou como compostos orgânicos solúveis e embora sua mobilidade na planta seja reduzida, o nutriente pode ser deslocado das folhas mais velhas para as mais novas (Leite et al., 2003). A discrepância entre a necessidade e o teor de Mn encontrado nos tecidos vegetais indica que ao contrário da maioria dos nutrientes, sua absorção é pouco regulada pela planta, o que pode levar ao acúmulo de Mn a níveis tóxicos (Cardoso et al., 2003). A toxicidade de Mn reduz a produção de clorofila e a capacidade fotossintética, comprometendo o crescimento das raízes e a produção de matéria seca total (Smith et al., 1983). Dobereiner (1966) demonstrou que o excesso de Mn no feijoeiro é mais prejudicial à simbiose do que ao desenvolvimento da planta em si e interfere no número e peso dos nódulos bem como na eficiência da fixação biológica do N_2 .

Apenas o tratamento TA02 apresentou deficiência em Zn (Tabela 3). Os sintomas de deficiência em Zn são observados primeiramente em folhas mais jovens e interferem na produção de matéria seca da parte aérea em feijão (Fageria, 2000). Os demais nutrientes avaliados (P, K, Ca, Mg e S) apresentaram resultados dentro da faixa de

suficiência em alguns tratamentos, enquanto que para todos os nutrientes, os tratamentos com valores fora da faixa de suficiência apresentam quantidade superior ao esperado (Tabela 4).

Conclusões

O uso de *Trichoderma* spp. garante uma maior porcentagem de germinação e vigor nas sementes tratadas, entretanto o efeito direto dos isolados testados na promoção de crescimento não pode ser garantida para estes isolados com os experimentos realizados neste trabalho.

Referências

- AVIS, T.J.; GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p.1733-1740, 2008.
- BASSAN, D.A.Z.; ARF, O.; BUZETTI, S.; CARVALHO, M.A.C.; SANTOS, N.C.B.; SÁ, M.E. Inoculação de sementes e aplicação de nitrogênio e molibdênio na cultura do feijão de inverno: produção e qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.76-83, 2001.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CÓDON, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.
- BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p.11-18, 2009.

BRASIL - Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. 365p. 1992.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S.; GIGLIOTTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos de Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v.1, n.2, p.18-24, 2001.

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, promoção de crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.28-34, 2011.

CARDOSO, E.J.B.N.; NAVARRO, R.B.; NOGUEIRA, M.A. Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crescentes deste nutriente. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.415-423, 2003.

CELAR, F.; VALIC, N. Effects of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum* culture filtrates on seed germination of vegetables and maize. **Journal of Plant Disease and Plant Protection**, v.112, n.4, p.343-350, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos, décimo levantamento**. Brasília, Conab, 2013. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_07_09_09_04_53_boletim_graos_junho__2013.pdf. Acesso em 20 jan. 2014.

CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.149, p.1579-1592, 2009.

EL-KATATNY, M.H. Enzyme production and nitrogen fixation by free, immobilized and coimmobilized inoculants of *Trichoderma harzianum* and *Azospirillum brasilense* and their possible role in growth promotion of tomato. *Food Technology and Biotechnology*, v.48, n.2, p.161-174, 2010.

FAGERIA, N.K. Níveis adequados e tóxicos de zinco na produção de arroz, feijão, milho, soja e trigo em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.4, n.3, p.390-395, 2000.

FRIGHETTO, R.T.S. Impacto Ambiental Decorrente do Uso de Pesticidas Agrícolas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, 1997. p.415-438.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P.H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.867-876, 2007.

GUNNELL, D.; EDDLESTON, M.; PHILLIPS, M.R., KONRADSEN, F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. **BMC Public Health**, v. 21, n.7, p.357, 2007.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v.2, p.3-56, 2004.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v.158, p.17-25, 2012.

HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant Soil**, v.311, p.1-18, 2008.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evaluation of current concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p.4-10, 2003.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Interação entre microrganismos do solo, feijoeiro e milho em monocultura e consórcio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.32, p.807-818, 1997a.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T., HUNGRIA, M. (Eds.). **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997b. p. 189-295.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with na emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v.65, p.151-164, 2000.

LEACH, A.W.; MUMFORS, J.D. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. **Environmental Pollutants**, v. 151, p. 39-147, 2008.

LEITE, U.T.; AQUINO, B.F.; ROCHA, R.N.C.; SILVA, J. Níveis críticos foliares de boro, cobre, manganês e zinco em milho. **Bioscience Journal**, v.19, n.2, p.115-125, 2003.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E., MERCANTE, F.M., FRANCO, A.A., RAHAM, P.H., PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.417- 426, 1991.

MEDEIROS, M.B.; LOPES, J.S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.24-26, 2006.

- OLIVEIRA, I.P.; ARAÚJO, R.S.; DUTRA, L.G. Nutrição mineral e fixação biológica do nitrogênio. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J. de O. (Coord.). **Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil**. Piracicaba: Potafos, 1996, p.169-221.
- RESENDE, O.; BORÉM, F.M.; CARVALHO, M.L.M.; GRIS, C.F. Análises fisiológicas em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenadas na presença de equipamento redutor de inóculo. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, n.2, p.133-144, 2003.
- RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N.; SANTAMARÍA, C.; TEMPRANO, F.; LEIDI, E.O. Interaction effects between *Rhizobium* strain and bean cultivar on nodulation, plant growth, biomass partitioning and xylem sap composition. **European Journal of Agronomy**, v.11, p.131-143, 1999.
- RUDRESH, D.L.; SHIVAPRAKASH, M.K.; PRASAD, R.D. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutriente uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). **Applied Soil Ecology**, v.28, p.139-146, 2005.
- SAHARAN, B.S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **International Journal of Life Science and Medical Research**, v.21, p.1-30, 2011.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, v.1, n.3, p.231-234, 1975.
- SMITH, G.S.; EDMEDS, D.C.; UPSDELL, M. Manganese status of New Zealand pastures. 1. Toxicity in ryegrass, white clover and lucerne. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.26, n.2, p.215-221, 1983.

- SMITH, K.P.; HANDELSMAN, J.; GODMAN, R.M. Genetic basis for plants interactions with disease-suppressive bacteria. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v.9, p.4786-4790, 1999.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.G. **Análise de Solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p.
- VERMA, J.P.; YADAV, J.; TIWARI, K.N.; JAISWAL, D.K. Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum*). **Soil Biology & Biochemistry**, v.70, p.33-37, 2014.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, v.255, p.571-586, 2003.

Tabelas e figuras

Tabela 1. Relação de tratamentos aplicados nos experimentos de germinação e vigor de sementes e promoção de crescimento e nutrição vegetal em casa de vegetação.

Tratamento	Composição
TA02	ICB02
TA03	ICB03
TH05	ICB05
TA06	ICB06
TA07	ICB07
TA08	ICB08
TA11	ICB11
TA13	ICB13
TA14	ICB14
TA16	ICB16
TA17	ICB17
TA18	ICB18
TV25	ICB25
Ttest	Testemunha (sem tratamento)
TN ⁽¹⁾	Nitrogênio
Tmix (C3)	Mix <i>Trichoderma</i> spp.

⁽¹⁾O tratamento TN não foi realizado nas avaliações de germinação e vigor das sementes.

Tabela 2. Porcentagem de germinação e vigor de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) após diferentes tratamentos com *Trichoderma* spp.

Identificação	Tratamento	% germinação	% germinação vigor
TA02	ICB02	100 ^A	75 ^B
TA03	ICB03	100 ^A	100 ^A
TV05	ICB05	100 ^A	100 ^A
TA06	ICB06	100 ^A	100 ^A
TA07	ICB07	100 ^A	100 ^A
TA08	ICB08	100 ^A	100 ^A
TA11	ICB11	100 ^A	100 ^A
TA13	ICB13	100 ^A	100 ^A
TA14	ICB14	100 ^A	100 ^A
TA16	ICB16	100 ^A	100 ^A
TA17	ICB17	100 ^A	100 ^A
TA18	ICB18	100 ^A	100 ^A
TV25	ICB25	100 ^A	100 ^A
Ttest	NENHUM TRATAMENTO	90 ^B	52 ^C
Tmix	MIX ICB	100 ^A	81 ^B
CV		1,04 %	3,10 %

Médias seguidas da mesma letra maiúscula não diferem entre si na coluna pelo teste de Tukey 5%.

Tabela 3. Avaliação nutricional das plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas à diferentes tratamentos com *Trichoderma* spp. e inoculante.

Tratamentos	Micronutrientes (%)				Macronutrientes (%)					N (%)
	(mg. kg ⁻¹)				(mg. kg ⁻¹)					
	Zn	Cu	Mn	Fe	P	K	Ca	Mg	S	
TA02	16	6	149	243	0,23	1,6	0,63	1,3	0,23	1,9
TA03	22	10	160	263	0,39	3,3	0,81	1,6	0,41	3,8
TV05	29	12	249	314	0,40	3,4	1,2	1,8	0,34	3,7
TA06	30	12	227	357	0,44	4,0	1,0	1,7	0,43	3,5
TA07	30	14	333	745	0,40	2,9	1,1	1,8	0,39	3,8
TA08	22	10	171	515	0,39	3,5	0,80	1,6	0,35	3,1
TA11	25	11	207	438	0,41	3,9	0,78	1,7	0,38	3,3
TA13	27	12	241	639	0,42	3,6	0,90	1,7	0,36	3,6
TA14	23	11	224	317	0,37	3,5	0,83	1,7	0,38	3,1
TA16	25	10	195	307	0,41	3,8	0,82	1,6	0,34	3
TA17	22	9	185	267	0,34	3,5	0,86	1,6	0,32	3,3
TA18	23	10	210	342	0,39	3,2	1,0	1,7	0,39	2,3
TV25	21	10	177	238	0,42	3,9	0,81	1,6	0,38	2,9
Ttest	27	16	371	418	0,55	3,9	0,97	3,2	1,0	1,2
TN	26	14	272	330	0,39	3,6	0,83	1,9	0,44	3,6
Tmix	29	11	288	527	0,38	3,2	1,3	1,8	0,30	4

Faixas de suficiência de macro e micronutrientes no tecido foliar para a cultura do feijão: Zn: 18-50; Cu: 4-20; Mn: 15-100; Fe: 40-140; P: 0,2-0,3; K: 2,0-2,5; Ca: 1,0-2,5; Mg: 0,25-0,5; S: 0,2-0,3. Fonte: Tedesco et al. (2004).

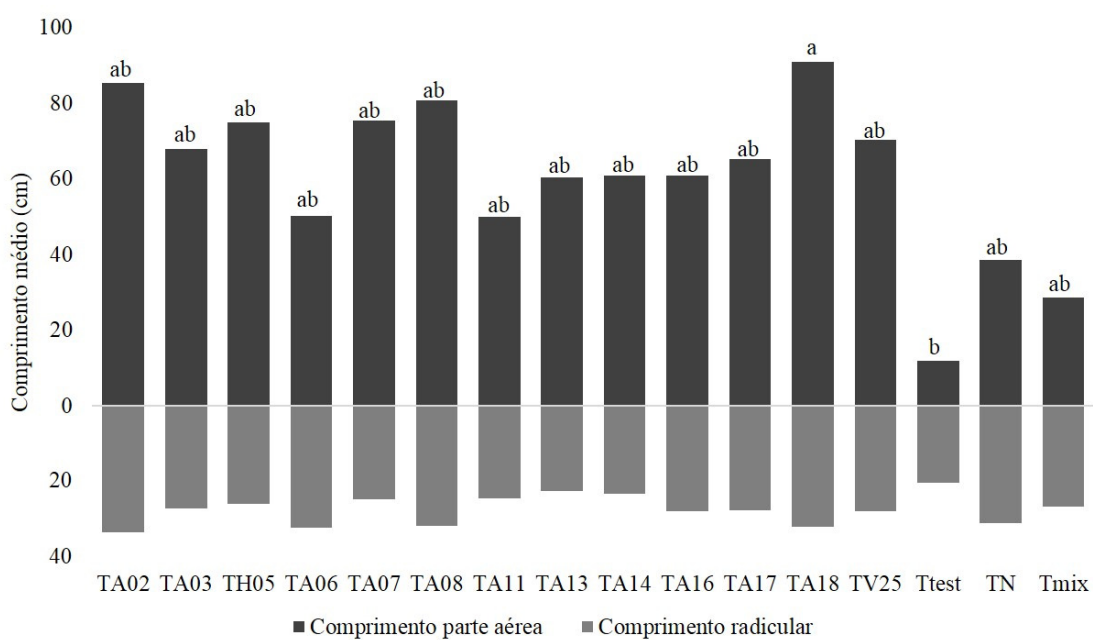


Figura 1. Comprimento médio (cm) da parte aérea e comprimento médio (cm) radicular de plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) submetidas a diferentes tratamentos. Comprimento parte aérea: Barras seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Tukey 5%. Comprimento radicular: Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

4.4 ARTIGO 4: Detecção de enzimas relacionadas com a indução de resistência em feijoeiro comum após inoculação de *Trichoderma* spp.⁴

⁴Artigo será traduzido para a língua inglesa e submetido ao Comitê Editorial do Periódico Científico Tropical Plant Pathology

**Detecção de enzimas relacionadas com a indução de resistência em feijoeiro
comum após inoculação de *Trichoderma* spp.**

Priscila Pauly Ribas, Aida Terezinha dos Santos Matsumura, Sueli Teresinha
Van Der Sand

RESUMO: Microrganismos empregados no controle biológico de fitopatógenos podem atuar como eliciadores de mecanismos de defesa de plantas. Esta capacidade pode estar associada com o aumento de proteínas relacionadas à patogênese nas plantas, o que as levaria ao estado de indução. Como *Trichoderma* spp. possui um importante papel no cenário do controle biológico, este trabalho visou averiguar a capacidade de 13 diferentes isolados estimularem os mecanismos de defesa do feijoeiro, analisando a produção de enzimas durante o processo de indução de resistência. Foram empregadas análises espectrofotométricas aos 16 e 32 dias após a inoculação para a detecção da atividade de peroxidases, polifenoloxidades e fenilalanina amônia-liase nas plantas tratadas. Observou-se a capacidade de *Trichoderma* aumentar a atividade enzimática de peroxidases em 84 % dos tratamentos após 16 dias da inoculação e 100 % após 32 dias. A atividade enzimática das polifenoloxidades aumentou em 92 % dos tratamentos após a inoculação e 100 % após 32 dias, já a atividade da fenilalanina amônia-liase aumentou em 46 % dos tratamentos na avaliação realizada 16 dias após a inoculação e em 77 % dos tratamentos, aos 32 dias após a inoculação. O isolado ICB05 apresentou maior potencial de imunização neste experimento. Assim, concluímos que o uso de *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico pode reduzir os níveis de infecção de fitopatógenos

em feijoeiro, não apenas através dos mecanismos envolvidos no antagonismo, mas também pela imunização das plantas tratadas.

Palavras-chave: peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase, indução de resistência, controle biológico

Enzymes detection related with the resistance induction in common beans after *Trichoderma* spp. inoculation

ABSTRACT: Microorganisms deployed in biological control of phytopathogens can act as elicitors of defense mechanisms in plants. This ability can be associated with the growth of proteins related with pathogenesis in plants, which would take them to an induction state. Since *Trichoderma* spp. has an important role on biological control, this work aimed to investigate the ability of thirteen different isolates to stimulate the defense mechanisms in common bean, by analyzing the enzymes production during the resistance induction process. It was deployed spectrophotometric analyzes on the 16th and the 32nd days after the inoculation to detect the activity of peroxidases, polyphenoloxidases and phenylalanine ammonia lyase in treated plants. It was observed the ability of *Trichoderma* on increasing the enzymatic activity of peroxidases in 84% of treatments after 16 days of inoculation and 100% after 32 days. The enzymatic activity of polyphenoloxidases increased in 92% of treatments after 16 days of the inoculation and 100% after 32 days, while the activity of phenylalanine ammonia lyase increased in 46% of treatments in the evaluation performed 16 days after the inoculation and in 77% of treatments, by the 32nd day after the inoculation. The isolate ICB05 showed higher immunization potential on this experiment. So, it is concluded that the use of

Trichoderma spp. as an agent of biological control can reduce the infection levels of phytopathogens in beans, not only through the mechanisms involved in the antagonism, but also through the immunization of treated plants.

Key words: peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, induced resistance, biological control

INTRODUÇÃO

A indução de resistência nas plantas é consequência da interação entre diferentes eliciadores microbianos e receptores em plantas, levando a ativação de vias de sinalização, que provocam modificações bioquímicas e fisiológicas nas plantas (Mastouri et al. 2010, Contreras-Cornejo et al. 2011, Harman et al. 2012). Isto leva a uma reação antecipada e mais forte ao ataque de patógenos e parasitas, com redução significativa na propagação das doenças (Contreras-Cornejo et al. 2011, Harman et al. 2012, Mathys et al. 2012). Esta resistência pode persistir por longos períodos, e dever haver uma re-indução sempre que necessário (Nawrocka & Malolepsza, 2013).

A habilidade de agentes de controle biológico (ACB) contribuírem para o desenvolvimento de resistência em diferentes culturas vem sendo descrito em diversas pesquisas (Mastouri et al. 2010, Salas-Marina et al. 2011, Hermosa et al. 2012, Harman et al. 2012, Ryder et al. 2012, Carreras-Villasenor et al. 2012). Entre os ACB, isolados do fungo *Trichoderma* tem demonstrado capacidade de induzir respostas de defesa nas plantas, bem como promover a resistência sistêmica e são essenciais para a proteção de culturas contra um amplo espectro de patógenos virais, bacterianos e fúngicos (Mastouri

et al. 2010, Salas-Marina et al. 2011, Contreras-Cornejo et al. 2011, Harman et al 2012, Carreras-Villasenor et al. 2012).

Os tratamentos com *Trichoderma* promovem a síntese e acumulação de vários metabólitos secundários e moléculas de sinalização, incluindo ácido jasmônico, etileno e ácido salicílico (Shoresh et al. 2010, Salas-Marina et al. 2011, Contreras-Cornejo et al. 2011, Harman et al 2012), aumentam a atividade de enzimas envolvidas na síntese de compostos antimicrobianos, tais como as proteínas relacionadas à patogênese, fitoalexinas e provocam o reforço da parede celular (Loon et al. 1998).

Tendo em vista a importância de agentes de controle biológico na imunização de plantas, este trabalho teve como objetivo averiguar a capacidade de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. estimularem plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) a ativarem seus mecanismos de defesa contra possíveis patógenos através da detecção de enzimas produzidas durante o processo de imunização.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia e na Casa de Vegetação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Nos experimentos realizados foram testados 13 isolados de *Trichoderma* spp. Os isolados pertencem a 3 diferentes espécies, identificados como ICB02, ICB03, ICB06, ICB07, ICB08, ICB11, ICB13, ICB14, ICB16, ICB17, ICB18 (*Trichoderma asperellum*), ICB05 (*Trichoderma harzianum*) e ICB25 (*Trichoderma virens*) e são armazenados na

Micoteca da empresa ICB BIOAGRITEC LTDA., Porto Alegre, Brasil. O experimento consistiu em 13 tratamentos e uma testemunha. Todos os tratamentos foram realizados com três repetições, totalizando 42 plantas de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), dispostos em um delineamento inteiramente casualizado.

Antes da semeadura, as sementes foram desinfestadas pelo método de imersão em soluções desinfestantes de álcool, hipoclorito de sódio e lavadas em água. Após a desinfestação as sementes foram pré-germinadas em rolos de papel filtro, que foram mantidos em câmara de germinação (BOD) com temperatura de 27 ± 2 °C com a ponta do papel submersa em água destilada estéril, durante cinco dias. No plantio das plântulas foram utilizados frascos contendo substrato autoclavado de vermiculita e areia (2:1 v/v) em vasos de Leonard, que permanecem submersos em solução nutritiva de Sarruge (1975). Ainda, no momento do plantio foram aplicadas as soluções de esporos dos isolados de *Trichoderma* spp. (10^7 esporos.mL⁻¹) diretamente no sulco em um volume de 5 mL / planta. O experimento foi realizado durante 32 dias, no período de dezembro de 2013 a janeiro de 2014 e as amostras foram coletadas aos 16 e 32 dias após a inoculação (DAI) de *Trichoderma* spp.

Após o período de desenvolvimento das plantas, foi determinada a concentração de proteínas totais nas amostras vegetais e foram realizadas as análises enzimáticas, visando a detecção da atividade de peroxidase, polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia-liase (PAL). Os valores foram expressos como atividade média entre as repetições. Os dados foram submetidos ao teste de variância (ANOVA), com nível de significância de 5 % e as médias foram analisadas pelo teste de Tukey. O software utilizado para a análise estatística foi o Statistica 7.0 (Statsoft).

O extrato vegetal para as análises foi preparado com a maceração das amostras vegetais em nitrogênio líquido, utilizando almofariz e pistilo. Ao macerado foram acrescentados 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, acrescido de polivinilpirrolidona 1 % (p/v) e fluoreto de fenilsulfonila (PMSF) 1 mM, com posterior centrifugação (30.000 g, 25 min, 4 °C) e recuperação do sobrenadante que foi mantido em banho de gelo durante a realização das análises.

A concentração de proteínas totais em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976) ajustando-se uma curva padrão com concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA), correlacionando-se a concentração de proteínas com as leituras de absorvância em espectrofotômetro com $\lambda = 595$ nm. Os dados foram expressos em μg proteínas g^{-1} tecido.

A atividade de peroxidases foi realizada pelo método descrito por Hammerschmidt et al. (1982) no qual é mensurada a oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio. A leitura espectrofotométrica é realizada com comprimento de onda de 470 nm e os resultados são expressos em unidades de PO mg^{-1} tecido min^{-1} , admitindo-se que uma unidade de PO equivale ao incremento de absorvância de 0,001 min^{-1} . A atividade de polifenoloxidase foi realizada de acordo com o método de Duangmal & Apenten (1999), em ensaio espectrofotométrico, onde acompanhou-se o aumento da absorvância a 420 nm, resultante da oxidação do catecol para quinona. Cada unidade de polifenoloxidase corresponde à variação de 0,001 no valor da absorvância a 420 nm por minuto de reação por μg de proteína total. A atividade de fenilalanina amônia-liase foi determinada através do método descrito por Halfeld-Vieira (2002) no qual a atividade enzimática é quantificada em espectrofotometria a 290 nm após a conversão de L-fenilalanina para ácido *trans*-cinâmico, monitorados em intervalos de 0,5 min e 3,5 min

após o início da reação a 37 °C. Os resultados foram expressos em nmoles de ácido *trans*-cinâmico g⁻¹ tecido min⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas plantas de feijoeiro comum tratadas com diferentes isolados e espécies de *Trichoderma*, foi possível detectar diferentes concentrações de proteínas totais (Figura 1). Tanto o isolado quanto o tempo possuem efeitos significativos na concentração de proteínas totais ($p < 0,05$). A concentração de proteínas aumentou em relação ao tempo em que as amostras foram analisadas em 86 % dos tratamentos. Apenas o isolado ICB02 e a testemunha não aumentaram significativamente ($p < 0,05$) a concentração de proteínas totais no intervalo de 16 e 32 dias após a inoculação.

O tratamento de plantas com diferentes agentes bióticos podem induzir a resistência ao ataque de patógenos tanto no local como sistematicamente em outras partes da planta (Walters & Fountaine, 2009). Segundo Walters et al. (2013) estes agentes são classificados como ativadores biológicos. Os fungos utilizados no controle biológico, como as espécies de *Trichoderma* tem sido relatados como eliciadores de resistência em plantas, tornando as raízes colonizadas preparadas para uma resposta de defesa intensa ao ataque dos patógenos (Tucci et al., 2011; Reglinski et al., 2012). Após a colonização das raízes, por isolados de *Trichoderma* rizocompetentes, as plantas controlam a colonização do fungo formando um calo, aumentando a atividade de quitinases e peroxidases e acumulando compostos fenólicos, em muitos casos associados com a expressão da fenilalanina amônia-liase, hidroxiperoxido liase e glucanase (Tucci et al., 2012). Os

isolados testados neste experimento demonstraram capacidade de aumentar a atividade de algumas destas enzimas em plantas submetidas aos diferentes tratamentos.

A concentração de proteínas totais variou entre 3,42 e 29,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ na avaliação realizada 16 dias após a inoculação (Figura 1). Todos os tratamentos diferiram significativamente dos resultados obtidos para a testemunha ($p < 0,05$), sendo a maior concentração encontrada para o tratamento com o isolado ICB05.

Após 32 dias da inoculação, a concentração de proteínas totais variou entre 3,76 e 46,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 1). Assim como na avaliação realizada 16 DAI, todos os tratamentos diferiram significativamente da testemunha ($p < 0,05$) e a maior concentração foi encontrada para o tratamento ICB05.

A atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase variou de acordo com o tempo em que a avaliação foi realizada e o isolado testado, demonstrando que ambas as variáveis possuem efeito sobre a atividade enzimática em feijoeiro ($p < 0,05$).

No experimento realizado, atividade de peroxidase aumentou em relação a atividade enzimática da testemunha após os tratamentos realizados com os diferentes isolados de *Trichoderma* spp. (Figura 2). Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa entre as análises realizadas aos 16 e 32 dias após a inoculação ($p < 0,05$), apenas a atividade enzimática detectada nas plantas da testemunha não apresentaram diferença entre as avaliações realizadas nos diferentes períodos.

Na avaliação realizada aos 16 dias após a inoculação, foi possível detectar a atividade enzimática de peroxidase variando entre 1,03 e 6,97 ($\text{U mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) nos tratamentos realizados, sendo que os valores detectados para os isolados ICB02, e ICB18

não diferiram dos valores encontrados para a testemunha (Figura 2). As plantas tratadas com o isolado ICB05 produziram a maior atividade enzimática ($p < 0,05$), tanto na avaliação realizada 16 dias após a inoculação, quanto aos 32 dias após a inoculação, quando apresentou atividade de $12,63 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, aproximadamente dez vezes maior do que atividade enzimática das plantas da testemunha ($1,21 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Quando avaliada a polifenoloxidase nas plantas tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. foi possível observar a atividade enzimática variando entre 0,28 e 2,96 ($\text{U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) na avaliação aos 16 dias após a inoculação e entre 0,38 e 10,95 ($\text{U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) na avaliação realizada aos 32 dias após a inoculação (Figura 3). O tratamento ICB18 não apresentou diferença significativa em relação a testemunha na primeira avaliação, aumentando a atividade enzimática na segunda avaliação, onde todos os tratamentos foram significativamente diferentes da testemunha ($p < 0,05$). As maiores atividades enzimáticas foram encontradas nas plantas tratadas com o isolado ICB05 em ambos os tempos de avaliação ($p < 0,05$).

Já para a enzima fenilalanina amônia-liase, um número maior de tratamentos não aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade enzimática nas plantas (Figura 4). Isto ocorreu para os tratamentos com os isolados ICB02, ICB03, ICB06, ICB08, ICB13, ICB17 e ICB18 na avaliação realizada 16 dias após a inoculação e para os tratamentos ICB02, ICB08 e ICB18 na avaliação em 32 dias após a inoculação.

Chowdappa et al. (2013) observaram aumento da atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e superóxido desmutase em tomateiro tratado com *Trichoderma harzianum* OTPB3 em concentração de $10,7 \pm 1,3 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $2,4 \pm 0,2 \text{ U g}^{-1}$

min^{-1} e $1,6 \pm 0,2 \text{ U g}^{-1} \text{ min}^{-1}$, 2,5; 6 e 4 vezes maior do que as concentrações obtidas em plantas que não receberam tratamento, respectivamente.

As plantas tratadas com OTPB3 reduziram os níveis de infecção de *Aspergillus solani* e *Phytophthora infestans* em 77 e 80 % respectivamente. A indução de resistência por *Trichoderma* em *Pinus* foi testada por Reglinski et al. (2012). Neste experimento, os autores verificaram aumento da atividade das enzimas peroxidase e fenilalanina amônia-liase após a inoculação de *Trichoderma atroviride* R33 em *Pinus radiata*, reduzindo a incidência de *Diplodia pinea* em 20%.

Além das enzimas avaliadas neste experimento, a imunização das plantas pode estar relacionada com a atividade de outras enzimas. Yedidia et al. (1999) relatam a indução de resposta de defesa em pepineiro por *Trichoderma harzianum*, através do aumento na atividade de peroxidase e quitinase. Alizadeh et al. (2013) relacionam a indução de resistência em pepineiro e *Arabidopsis thaliana* pelo aumento na atividade enzimática de quitinase, glucanase e fenilalanina amônia-liase, provocado pela combinação entre *Trichoderma harzianum* Tr6 e *Pseudomonas* sp. Ps14.

CONCLUSÕES

Os isolados de *Trichoderma* spp. podem atuar como eliciadores de resistência em feijoeiro, uma vez que provocaram o aumento na atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase. As maiores atividades enzimáticas foram encontradas em plantas tratadas com o isolado ICB05.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alizadeh H, Behboudi K, Ahmadzadeh M, Javan-Nikkhah M, Zamioudis C, Pieteese CMJ, Bakker PAHM (2013) Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological control*, 65:14-23.

Axelrod B, Cheesbrough TM, Laakso S (1981) Lipoxygenases from soybeans. In: Lowenstein, J.M. (Ed.) *Methods in enzymology*. New York, USA. Academic Press. pp.441-451.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microorganisms quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:248-254.

Carreras-Villaseñor N, Sánchez-Arreguín JA, Herrera-Estrella AH (2012) *Trichoderma*: sensing the environment for survival and dispersal. *Microbiology*, 158:3-16.

Chowdappa P, Mohan Kumar SP, Jyothi Lakshmi M, Upreti KK (2013) Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 e *Trichoderma harzianum* OTPB3. *Biological Control*, 65:109-117.

Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Beltrán-Peña E, Herrera-Estrella A, López-Bucio J (2011) *Trichoderma* induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling & Behavior*, 6:1554-1563.

Duangmal K, Apenten RKO (1999) A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). *Food Chemistry*, 64:351-359.

Halfeld-Vieira BA (2002) Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

Hammerschmidt R, Nuckles EM, Kuc J (1982) Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology*, 20:73-81.

Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M (2012) Special issue: *Trichoderma* – from basic biology to biotechnology. *Microbiology*, 158:1-2.

Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158:17-25.

Loon LC, Bakker PAHM, Pieterse CMJ (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36:453-483.

Mastouri F, Björkman T, Harman GR (2010) Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates, biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Biological Control*, 100:1213-1221.

Mathys J, De Cremer K, Timmermans P, Van Kerckhove S, Lievens B, Vanhaecke M, Cammue BPA, De Coninck B (2012) Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in Plant Science*, 3:1-25.

Nawrocka J, Malolepsza U (2013) Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 67:149-156.

Reglinski T, Rodenburg N, Taylor JT, Northcott GL, Chee AA, Spiers TM, Hill RA (2012) *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. *Forest Pathology*, 42:75-78.

Ryder LS, Harris BD, Soanes DM, Kershaw MJ, Talbot NJ, Thornton CR (2012) Saprotrophic competitiveness and biocontrol fitness of a genetically modified strain of

the plant-growth-promoting fungus *Trichoderma hamatum* GD12. *Microbiology*, 158:84-97.

Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Uresti-Rivera EE, Castro-Longoria E, Herrera-Estrella A, Casas-Flores S (2011) 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*, 131:15-26.

Sarruge JR (1975) Soluções nutritivas. *Summa Phytopathologica*, 1:231-234.

Shoresh M, Harman GE, Mastouri F (2010) Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48:21-43.

Tucci M, Ruocco M, De Mais L, De Palma M, Lorito M (2011) The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by plant genotype. *Molecular Plant Pathology*, 12:341-354.

Walters DR, Fountaine JM (2009) Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. *Journal of Agricultural Science*, 147:523-535.

Yedidia I, Benhamou N, Chet I (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1061-1070.

LISTA DE FIGURAS

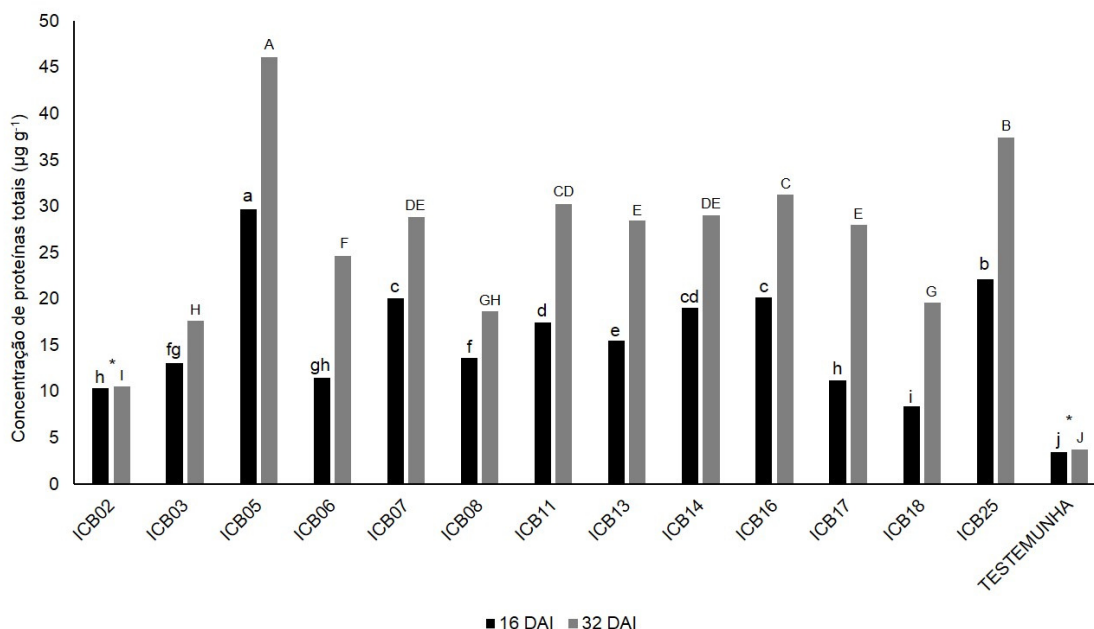


Figura 1. Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g g}^{-1}$) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas 16 e 32 dias após a inoculação (DAI). Tratamentos com * sobre as barras não apresentaram diferença significativa na concentração de proteínas totais em relação ao tempo de avaliação pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na concentração de proteínas totais na avaliação realizada em 16 DAI pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na concentração de proteínas totais na avaliação realizada em 32 DAI pelo teste de Tukey 5%.

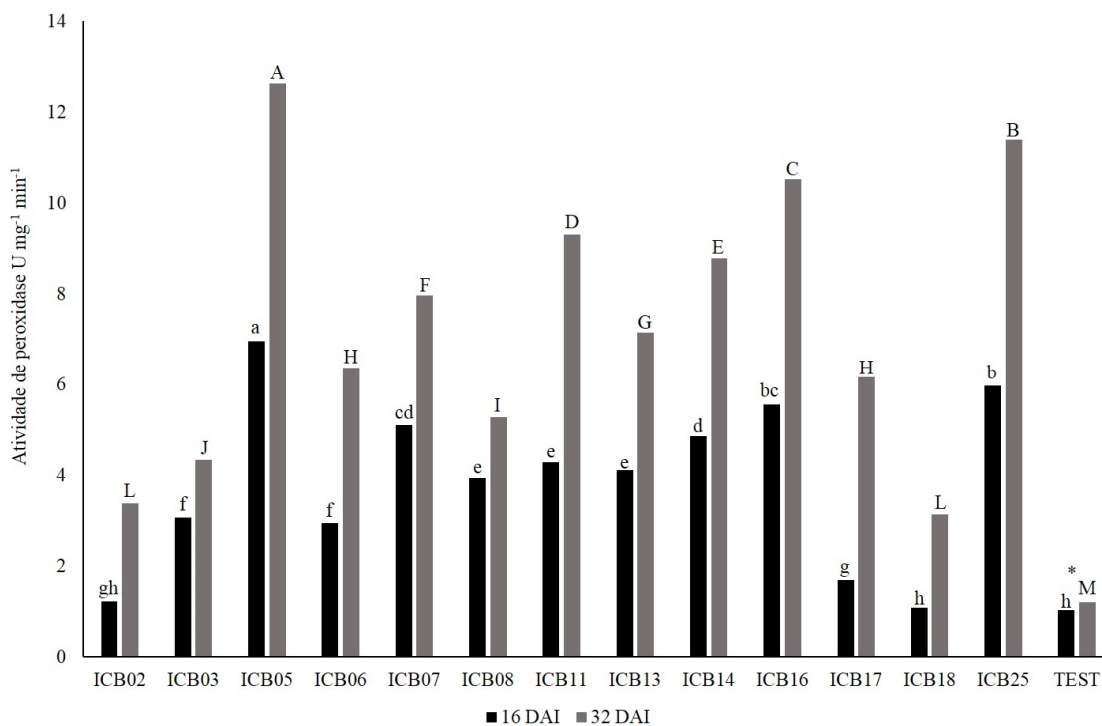


Figura 2. Atividade de peroxidase ($\text{U mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas 16 e 32 dias após a inoculação (DAI). Tratamentos com * sobre as barras não apresentaram diferença significativa na atividade de peroxidase em relação ao tempo de avaliação pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na atividade de peroxidases na avaliação realizada em 16 DAI pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na atividade de peroxidases na avaliação realizada em 32 DAI pelo teste de Tukey 5%.

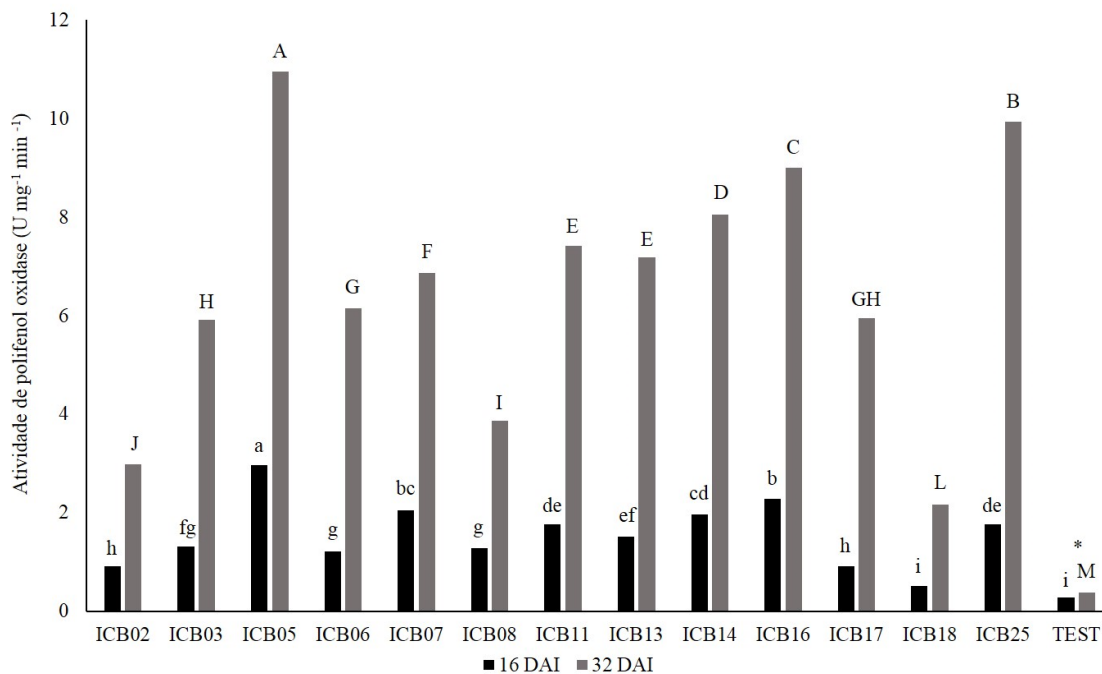


Figura 3. Atividade de polifenol oxidase ($\text{U mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas 16 e 32 dias após a inoculação (DAI). Tratamentos com * sobre as barras não apresentaram diferença significativa na atividade de polifenol oxidase em relação ao tempo de avaliação pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na atividade de polifenol oxidase na avaliação realizada em 16 DAI pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na atividade de polifenol oxidase na avaliação realizada em 32 DAI pelo teste de Tukey 5%.

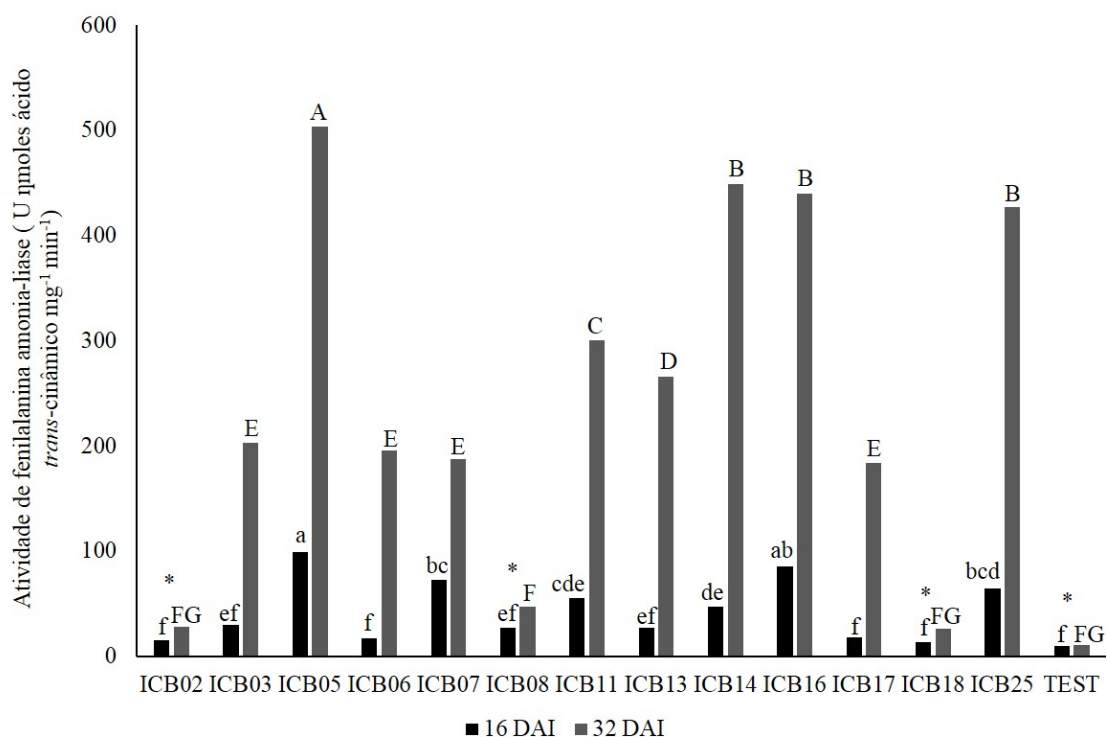


Figura 4. Atividade de fenilalanina amônia-liase ($\text{U } \mu\text{moles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) em plantas de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) sob diferentes tratamentos com isolados de *Trichoderma* spp. avaliadas 16 e 32 dias após a inoculação (DAI). Tratamentos com * sobre as barras não apresentaram diferença significativa na atividade de fenilalanina amônia-liase em relação ao tempo de avaliação pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa na atividade de fenilalanina amônia-liase na avaliação realizada em 16 DAI pelo teste de Tukey 5%. Barras seguidas pela mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa na atividade de fenilalanina amônia-liase na avaliação realizada em 32 DAI pelo teste de Tukey 5%.

5. DISCUSSÃO

A aplicação de *Trichoderma* na agricultura vem sendo amplamente explorada, desde os primeiros relatos científicos do parasitismo de *Trichoderma lignorum* a *Rhizoctonia solani* por Weidling (1931) aos produtos biológicos comercializados em todo mundo. No Brasil, o uso destes bioprodutos na agricultura vem ganhando destaque, tendo atualmente cinco produtos registrados como fungicidas microbiológicos (AGROFIT, 2014) e um inoculante (GUIMARÃES & MATSUMURA, 2013).

Trichoderma é um fungo cosmopolita, que é capaz de crescer em condições ambientais variadas e diversos substratos. Esta característica confere ao gênero a possibilidade de ser utilizado em muitas situações de interesse biotecnológico (ESPOSITO & SILVA, 1998). Entretanto, para que o uso comercial destes produtos biológicos se faça possível é necessário que se realizem pesquisas prévias que caracterizem os isolados de interesse de acordo com seu perfil enzimático e metabólico, além da necessidade de se conhecer seu comportamento em diferentes condições ambientais e o efeito do sinergismo

entre os mecanismos de ação ativos e demais microrganismos presentes no ambiente de aplicação (HERMOSA et al., 2000).

Quanto aos mecanismos envolvidos no processo de antagonismo entre *Trichoderma* e fitopatógenos sabe-se que muitos isolados podem produzir metabólitos voláteis e não voláteis tóxicos (relacionados com a antibiose) e enzimas hidrolíticas, ou degradadoras da parede celular (envolvidas no micoparasitismo). A combinação entre as enzimas hidrolíticas e os antibióticos resulta em um alto nível de antagonismo, maior do que o obtido por cada mecanismo sozinho (HOWELL, 1998; MONTE, 2001).

Segundo Howell (2003), os antibióticos, que podem se difundir no meio, juntamente com os metabólitos voláteis atuam no princípio do antagonismo, evitando a disseminação do patógeno (Figura 5B). Ainda segundo este autor, caso a aproximação do patógeno aconteça, as enzimas hidrolíticas podem atuar, degradando a parede celular, provocando aumento na sensibilidade aos demais compostos tóxicos, extravasamento do conteúdo celular e posterior morte do patógeno (Figura 5A).

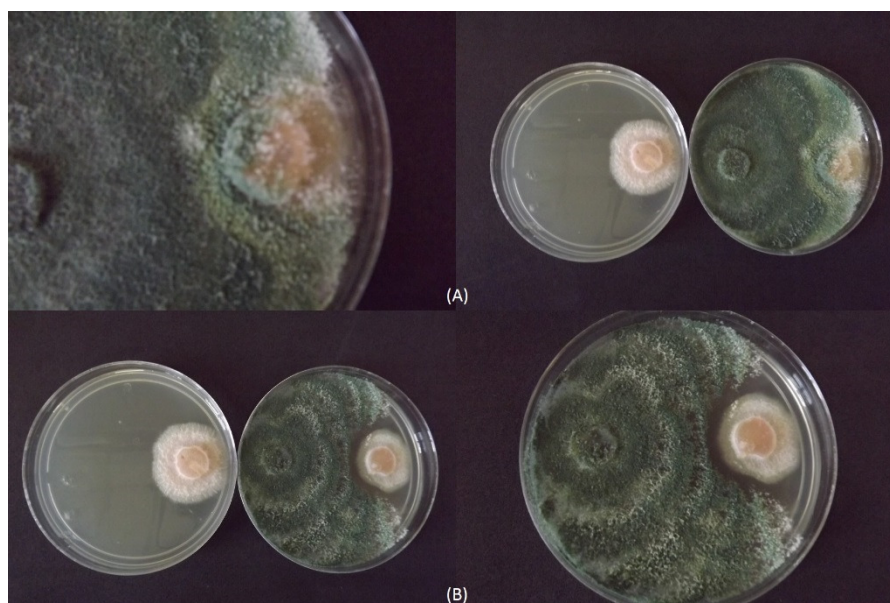


Figura 5. Antagonismo de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*. (A) Isolado ICB12 sobrepondo a colônia de FOPEM (B) Isolado ICB14 inibindo o crescimento de FOPEM sem que haja contato direto entre os dois isolados.

Howell (2003) descreve a ação sinérgica entre a endoquitinase produzida por *Trichoderma harzianum* e gliotoxina e entre enzimas hidrolíticas e peptaboils inibindo a germinação de conídios de *Botrytis cinerea*. O mesmo autor conclui que o sinergismo que ocorre entre os mecanismos de ação é dependente da ação anti-fúngica da enzima. Assim, o sinergismo é baixo quando a enzima é adicionada depois do antibiótico, indicando que a degradação da parede celular é necessária para o estabelecimento da interação.

Muitos trabalhos relatam a eficiência de *Trichoderma* spp. na promoção de crescimento de diferentes culturas (SRIVASTAVA et al. 2006; BAE et al. 2009; SALAS-MARINA et al., 2011; VERMA et al. 2014). Um possível mecanismo para o aumento no crescimento das plantas é que *Trichoderma* spp.

aumenta a eficiência da transferência de nutrientes dos compostos para a raiz de forma análoga ao que ocorre com as micorrizas (OUSLEY et al., 1994). Esta otimização na captação e utilização dos nutrientes é dependente da capacidade deste fungo alterar as condições ambientais da rizosfera reduzindo o pH do meio, e/ou liberando ácidos orgânicos, sideróforos e enzimas, que aumentam a solubilidade de compostos inorgânicos pelas raízes das plantas (VASSILEV et al., 2006).

Os isolados de *Trichoderma* spp. selecionados demonstraram capacidade variada de induzir a síntese de proteínas relacionadas à patogênese em feijoeiro. Plantas cultivadas com a inoculação de *Trichoderma* spp. podem desenvolver modificações físicas e bioquímicas características do desenvolvimento de resistência (NOWROCKA & MALOLEPSZA, 2013). Entre as respostas bioquímicas da planta estão a acumulação de espécies oxigênio reativas bem como o aumento na síntese de moléculas sinalizadoras e metabólitos secundários como as fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese. Esses compostos são considerados marcadores das respostas de defesa nas plantas quando se conduz experimentos com sistemas *Trichoderma*-planta-patógeno (SALAS-MARINA et al., 2011; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2011; HARMAN et al., 2012).

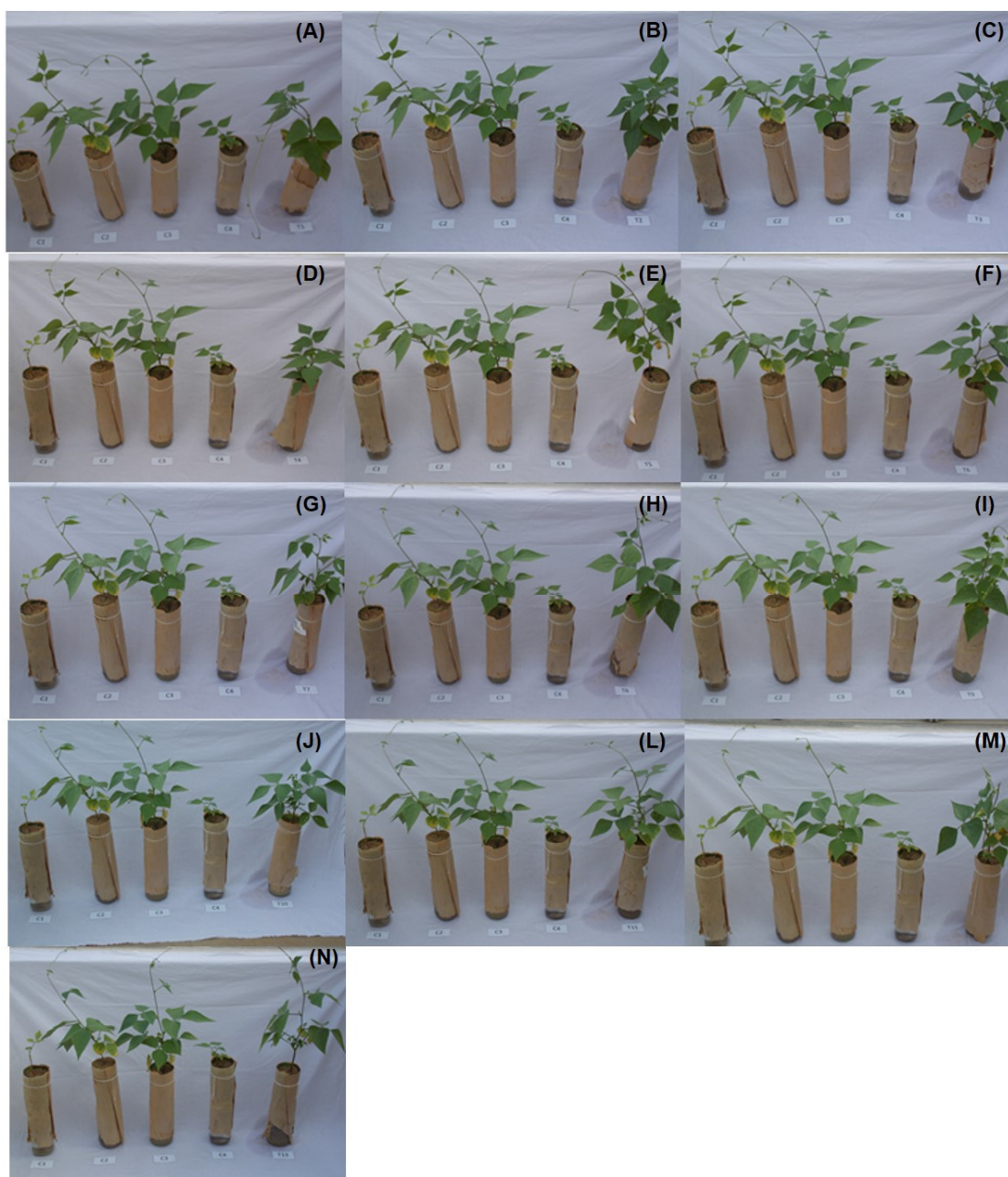


Figura 6. Plantas de feijoeiro comum tratadas com a inoculação de diferentes isolados de *Trichoderma* spp. Em todas as fotos, a ordem da esquerda para a direita corresponde ao tratamento C1 (sem nenhum tratamento), C2 (testemunha nitrogenada), C3 (mix de isolados de *Trichoderma* spp.), C4 (mix de isolados de *Trichoderma* spp. e o inoculante) e a planta mais à direita corresponde ao tratamento. (A) ICB02; (B) ICB03; (C) ICB05; (D) ICB06; (E) ICB07; (F) ICB08; (G) ICB11; (H) ICB13; (I) ICB14; (J) ICB16; (L) ICB17; (M) ICB18; (N) ICB25.

6. CONCLUSÕES

1. Os diferentes isolados de *Trichoderma* spp. apresentam diferentes mecanismos que podem atuar de forma sinérgica no controle biológico de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* e *Sclerotinia sclerotiorum* *in vitro*. Todos os isolados produziram metabólitos voláteis e enzimas hidrolíticas relacionados com o antagonismo e micoparasitismo contra os fitopatógenos testados.
2. Todos os isolados de *Trichoderma* spp. são capazes de produzir sideróforos e atuam na solubilização de fosfatos *in vitro*, tanto pela modificação do pH do meio quanto pela produção de enzimas fosfatases.
3. Os isolados de *Trichoderma* spp. aumentaram a porcentagem de germinação e o vigor das sementes de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) tratadas e o efeito na promoção de crescimento precisa ser melhor estudada.
4. Os isolados de *Trichoderma* spp. aumentaram a atividade enzimática de peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase em feijoeiro

comum. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas quando as plantas foram tratadas com o isolado de *Trichoderma harzianum* ICB05.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G.N. Plant Pathology. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1997. 635p
- AGROFIT – **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2014. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 15 de março de 2014.
- ALTOMORE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of phosphates and micronutrients by plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2926-2933, 1999.
- AMBARDAR, S.; VAKHLU, J. Plant growth promoting bacteria from *Crocus sativus* rhizosphere. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, p.2271-2279, 2013.
- ASERI, G.K.; JAIN, N.; TARAFDAR, J.C. Hydrolysis of organic phosphate forms by phosphatases and phytases producing fungi of arid and semi arid soils of India. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v.5, n.4, p.564-570, 2009.
- ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants: recent advances. **Biotechnology Advances**, v.28, n.1, p.169-183, 2010.
- BAE, H.; SICHER, R.C.; KIM, M.S.; STREM, M.D.; ELNICK, R.L.; BAILEY, B.A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.11, p.3279-3295, 2009.
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p.233-266, 2006.

BAR-NESS, E.; HADAR, Y.; CHIEN, Y.; ROMHELD, V.; MARSCHNER, H. Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. **Plant Physiology**, v.100, p.451-456, 1992.

BARBOSA, L. Feijão com arroz: o Brasil no prato dos brasileiros. **Horizontes antropológicos**, v.13, n.28, p.87-116, 2007.

BASHAN, Y. Interactions of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology advances**, v.16, p.729-770, 1998.

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

BENT, A. F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. **Annual Reviews of Phytopathology**, v.45, p.399-436, 2007.

BERG, G.; ROSKOT, N.; STEIDLE, A.; EBERL, L.; SMALLA, K. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic *Rhizobacteria* isolated from different *Verticillium* host plants. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.3328-3338, 2002.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, v.71, p.4203-4213, 2005.

BERG, G.; OPELT, K.; ZACHOW, C.; LOTTMANN, J.; GÖTZ, M.; COSTA, R.; SMALLA, K. The rhizosphere effect on bacteria antagonistic towards the pathogenic fungus *Verticillium* differs depending on plant species and site. **FEMS Microbiology Ecology**, v.56, p.250-261, 2006.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p.11-18, 2009.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, n. 68, p.1-13, 2009.

BETTIOL, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: BETTIOL, W. (Ed.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p.33-52.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (Ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 2003. p.79-93.

BIRD, G.W.; EDENS, T.; DRUMMOND, F.; GRODEN, E.; Design of pest management systems for suitable agriculture. In: FRANCIS, C.A.; FLORA, C.B.; KING, L.D. (Ed.). **Sustainable agriculture in temperate zones**. New York: John Wiley, 1990. p.55-110.

BOHNERT, H.; JENSEN, R.G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v.14, p.89-97, 1996.

BOWEN, G.D.; ROVIRA, A.D. The rhizosphere and its management to improve plant growth. **Advances in Agronomy**, v.66, p.1-102, 1999.

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, n.1, p.28-34, 2011.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G.; FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting *Rhizobacteria* to promote soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v.63, p.1670-1680, 1999.

CHAGAS-JUNIOR, A.F.; SANTOS, G.R.; REIS, I.H.B.; MILLER, L.O.; CHAGAS, L.F.B. Resposta de feijão-caupi a inoculação com rizóbio e *Trichoderma* sp. no cerrado, Gurupi, TO. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.7, n.2, p.242-249, 2012.

CHEN, L.L.; YANG, X.; RAZA, W.; LUI, Y.; QIU, M.; ZHANG, F.; SHEN, Q. *Trichoderma harzianum* SQR-T037 rapidly degrades allelochemicals in rhizospheres of continuously cropped cucumbers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, p.1653-1663, 2011.

CHET, I.; INBAR, J.; HADAR, I. Fungal antagonists and mycoparasites. In: WICKLOW D.T.; SÖDERSTRÖM, B. (Eds.). **The Mycota IV: Environmental and microbial relationships**. Berlin:Springer-Verlag, 1997. p.165-184.

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

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.4951-4959, 2005.

CONAB, **Acompanhamento da Safra Brasileira: grãos, décimo levantamento**. Brasília, Companhia Nacional de Abastecimento, 2013. Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_07_09_09_04_53_bol_etim_graos_junho__2013.pdf. Acesso em 20 jan. 2014.

CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACAS-RODRGUEZ, L.; CORTS-PENAGO, C.; LPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomasa production and promoters lateral root growth throught an auxin-dependent mechanism in arabidopsis. **Plant Physiology**, v.149, p.1579-1592, 2009.

COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. **Critical Reviwes in Microbiology**, v.21, p.1-18, 1995.

DE SOUZA, V.L.; MARINGONI, A.C.; CARBONELL, S.A.M.; ITO, M.F. Resistência genética em genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, v.32, n.4, p.339-344, 2006.

DRUZHININA, I.S.; SEIDL-SEIBOTH, V., HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B.A.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P.K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I.V.; KUBICEK, C.P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic succes. **Nature reviews**, v.9, p.749-759, 2011.

EVANS, H.C.; HOLMES, K.A.; THOMAS, S.E. Mycobiota of indigenou *Theobroma* species (*Sterculiaceae*) in Ecuador: assessing its potential for biological control of cocoa diseases. **Micological Progress**, v.2, p.149-160, 2003.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v.24, n.2, p.89-98, 1998.

FRIGHETTO, R.T.S. Impacto Ambiental Decorrente do Uso de Pesticidas Agrícolas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L., Ed. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, p.415-438, 1997.

FÜRNKRANZ, M.; MÜLER, H.; BERG, G. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.116, n.4, p.149-155, 2009.

GUIMARÃES, A.M.; MATSUMURA, A. *Trichoderma* na agricultura: muito além do controle de fungos do solo. **Revista Campo & Negócios**, n.125, p.6, 2013.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R.J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of índole acetic acid (IAA). **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, p.1968-1977, 2007.

GRUBER, S.; KUBICEK, C.P.; SEIDL-SEIBOTH, V. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.7217-7226, 2011.

GUNNELL, D.; EDDLESTON, M.; PHILLIPS, M.R., KONRADSEN, F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. **BMC Public Health**, v.21, n.7, p.357, 2007.

HANNAN, M.A.; HASAN, M.M.; HOSSAIN, I. Impact of dual inoculations with *Rhizobium* and *Trichoderma* on root rot disease and plant growth parameters of grasspea under field conditions. **Persian Gulf Crop Protection**, v.2, n.1, p.1-9, 2013.

HARMAN, G.E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. **Plant Disease**, v.84, p.377-393, 2000.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews**, v.2, p. 3-56, 2004.

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.

HENIS, Y.; CHET, I. Microbiological control of plant pathogens. **Advances in Applied Microbiology**, v.19, p.85-111, 1975.

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

HERNÁNDEZ, A.; RIVES, N.; CABALLERO, A.; HERNÁNDEZ, A.N.; HEYDRICH, M. Caracterización de rizobacterias asociadas al cultivo del maíz en la producción de metabolitos del tipo AIA, sideróforos y ácido salicílico. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 6, n. 1, p. 6-13, 2004.

HOWELL, C.R. The role of antibiosis in biocontrol. In: HARMAN, G.E.; KUBICEK, C.P. (Eds.) ***Trichoderma & Gliocladium***, v.2. Padstow: Taylor & Francis, p.173-184, 1998.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant disease: the history and evaluation of current concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1, p.4-10, 2003.

JONES, D.A., TAKEMOTO, D. Plant innate immunity—direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. **Current**

Opinion in Immunology, v.16, p.48–62, 2004.

KAJALA, K.; COVSHOFF, S.; KARKI, S.; WOODFIELD, H.; TOLLEY, B.J.; DIONARA, M.J.A.; MOGUL, R.T.; MABILANGAN, A.E.; DANILA, F.R.; HIBBERD, J.M.; QUICK, W.P. Strategies for engineering a two-celled C4 photosynthetic pathway into rice. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.3001-3010, 2011.

KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; AZAROVA, T.; MULDER, I.; LUGTENBERG, B. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. **Environmental Microbiology**, v.7, p.1809-1817, 2005.

KAPRI, A., TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010.

KUBICEK, C.P.; HARMAN, G.E. **Trichoderma and Gliocladium – Basic biology, taxonomy and genetics**, v.1. Taylor & Francis, Londres. 1998.

LEACH, A.W.; MUMFORS, J.D. Pesticide environmental accounting: a method for assessing the external costs of individual pesticide applications. **Environmental Pollutants**, v. 151, p. 139-147, 2008.

LOPER, J.E.; BUYER, J.S. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.4, n.1, p.5-13, 1992.

LUGTENBERG, B.J.J.; CHIN-A-WOENG, T.F.C.; BLOEMBERG, G.V. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. **Antoine Van Leeuwenhoek**, v.81, p.373-383, 2002.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO, R.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 cacauete expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.1, p.34-37, 2008.

MACHADO, R.G.; SÁ, E.L.S.; DAMASCENO, R.G.; HAHN, L.; ALMEIDA, D.; MORAES, T.; CAMARGO, F.A.O.; REARTES, D.S. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. **Ciência e Natura**, v.33, n.2, p.111-126, 2011.

MASUNAKA, A.; HYAKUMACHI, M.; TAKENAKA, S. Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningii* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/in the roots of *Lotus japonicus*. **Microbes and Environments**, v.26, p.128-134, 2011.

MEHRABI-KOUSHKI, M.; ROUHANI, H.; MAHDIKHANI-MOGHADDAM, E. Differential display of abundantly expressed genes of *Trichoderma harzianum*

during colonization of tomato-germinating seeds and roots. **Current Microbiology**, v.65, n.5, p.524-533, 2012.

MENDES, G.O.; FREITAS, A.L.M.; PEREIRA, O.L.; SILVA, I.R.; VASSILEV, N.B.; COSTA, M.D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungus isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v.64, p.239-249, 2014.

MONTE, E. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, v.4. p.1-4, 2000.

NAWROCKA, J.; MALOLEPSZA, U.; Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. **Biological Control**, v.67, p.149-156, 2013.

NIMNOI, P.; PONGSILP, N.; LUMYONG, S. Endophytic actinomycetes isolated from *Aquilaria crassna* Pierre ex Lec and screening of plant growth promoters production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.193-203, 2010.

OUSLEY, M.A.; LYNCH, J.M.; WHIPPS, J.M. Potencial of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. **Biology and Fertility of Soils**, v.17, p.85-90, 1994.

PAL, K.K.; DEY, R.; BHATT, D.M. Groundnut, *Arachis hypogaea* L. growth, yield and nutrient uptake as influenced by inoculation of plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Oilseeds Research**, v.21, n.2, p.284-287, 2004.

PATTERN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of índole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.207-220, 1996.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant, Cell and Environment**, v.26, p.189-199, 2003.

PUNJA, Z.K.; UTKHEDE, R.S. Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases. **Trends in Biotechnology**, v.21, p.400-407, 2003.

REITHNER, B.; IBARRA-LACLETTE, E.; MACH, R.L.; HERRERA-ESTRELLA, A. Identification of mycoparasitism-related genes in *Trichoderma atroviride*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.13, p.4361-4370, 2011.

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian journal of plant physiology**, v.28, p.897-906, 2001.

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

ROIGER, T.C.; JEFFERS, S.N.; CALDWELL, R.W. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, n.4, p.353-359, 1991.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV, 269p., 2007 a.

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

RUOCCO, M.; LANZUISE, S.; VINALE, F.; MARRA, R.; TURRÀ, D.; WOO, S.L.; LORITO, M. Identification of a new biocontrol gene in *Trichoderma atroviride*: the role of an ABC transporter membrane pump in the interaction with different plant-pathogenic fungi. **Molecular Plant-Microbes Interactions**, v. 22, p.291-301, 2009.

SABER, W.I.A.; ABD EL-HAI, K.M.; GHONEEM, K.M. Syneristic effect of *Trichoderma* and *Rhizobium* on both biocontrol of chocolate spot disease and induction of nodulation, physiological activities and productivity of *Vicia faba*. **Research Journal of Mycobiology**, v.4, n.8, p.286-300, 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.

SCHIRMBÖCK, M.; LORITO, M.; WANG, Y.L.; HAYES, C.K., ARISAN-ATAC, I.; SCALA, F.; HARMAN, G.E.; KUBICECK, C.P. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaboiol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi, **Applied Environmental Microbiology**, v.60, p.4364-4370, 1994.

SEGARRA, G.; CASANOVA, E.; BELLIDO, D.; ODENA, M.A.; OLIVEIRA, E.; TRILLAS, I. Proteome, salicylic acid and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. **Proteomics**, v.7, p.3943-3952, 2007.

SHABAN, W.I.; EL-BRAMAWY, M.A. Impact of dual inoculation with *Rhizobium* and *Trichoderma* on damping off, root rot diseases and plant growth parameters of some legumes field crop under greenhouse conditions. **International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science**, v.1, n.3, p.98-108, 2011.

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, v.95, p.76-84, 2005.

SHORESH, M.; HARMAN, G.E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agentes. **Annual Review of Phytopathology**, v.48, p.21-43, 2010.

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288-295, 2004.

SRIVASTAVA, S.N.; VIJAI, S.; AWASTHI, S.K. *Trichoderma* induced improvement in growth, yield and quality of sugarcane. v.8, p.166-169, 2006,

SOUZA, P.E.; DUTRA, M.R. Fungicidas no controle e manejo de doenças de plantas. Lavras: UFLA, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 848p., 2009.

THAKORE, Y. The biopesticide Market for global agriculture use. **Industrial Biotechnology**, v.2, p.194-208, 2006.

TANIMOTO, E. Regulation of root growth by plant hormones – roles for auxin and gibberelin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.24, p.249-265, 2005.

VARGAS, W.A.; MANDAWA, J.C.; KENERLEY, C.M. Plant-derived sucrose is a key elemento in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. **Plant Physiology**, v.151, p.792-808, 2009.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilization and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.71, p.137-144, 2006.

VENEGAS, F.; SCUDELER, F. Compatibilidade de diferentes cepas de *Rhizobium tropici* com o fungo *Trichoderma harzianum* no tratamento de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v.15, n.5, p.19-30, 2011.

VERMA, M.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D.; SURAMPALLI, R.Y.; VALÉRO, J.R. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, p.1-20, 2007.

VERMA, J.P.; YADAV, J.; TIWARI, K.N.; JAISWAL, D.K. Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. **Soil Biology & Biochemistry**, v.70, p.33-37, 2014.

XIE, H.; PASTERNAK, J.J.; GLICK, B.R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. **Current Microbiology**, v.32, p.67-71, 1996.

WANG, Y.; BROWN, H.N.; CROWLEY, D.E.; SZANISZLO, P.J. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. **Plant Cell Environmental**, v.16, p.579-585, 1993.

WEIDLING, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, v.22, p.837-845, 1931.

WHIPPS, J. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487-511, 2001.

WHITELAW, M.A.; HARDEN, T.J.; HELYAR, K.R. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology & Biochemistry**, v.31, p. 655-665, 1999.

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