

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – MESTRADO

PÂMELA VANESSA SCORTEGAGNA

PRODUTOS ALTERNATIVOS PARA PROTEÇÃO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À  
MANCHA ANGULAR EM PLANTAS DE FEIJÃO

PONTA GROSSA  
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE ENGENHARIAS, CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA – MESTRADO

PÂMELA VANESSA SCORTEGAGNA

PRODUTOS ALTERNATIVOS PARA PROTEÇÃO E INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA À  
MANCHA ANGULAR EM PLANTAS DE FEIJÃO

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia.  
Área de Concentração: Agricultura.  
Linha de Pesquisa: Manejo Fitossanitário.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos  
Dias  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maristella Dalla Pria

PONTA GROSSA  
2022

S423 Scortegagna, Pâmela Vanessa  
Produtos alternativos para proteção e indução de resistência à mancha angular em plantas de feijão. / Pâmela Vanessa Scortegagna. Ponta Grossa, 2022.  
69 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Fitotecnia e Fitossanidade), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias.  
Coorientadora: Profa. Dra. Maristella Dalla Pria.

1. Phaseolus vulgaris. 2. Pseudocercospora griseola. 3. Trichoderma spp.. 4. Fungos sapróbios. 5. Acibenzolar-S-metílico. I. Santos Dias, Carlos Tadeu dos. II. Dalla Pria, Maristella. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fitotecnia e Fitossanidade. IV.T.

CDD: 633



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

## TERMO

Título da Dissertação: “**Produtos alternativos para proteção e indução de resistência à mancha angular em plantas de feijão**”.

Nome: **Pâmela Vanessa Scortegagna**

### Conceito

Aprovada

Reprovada

### Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Carlos Tadeus dos Santos Dias

Profa. Dra. Amanda Regina Godoy Baptistaõ

Dr. Marcelo Barreto da Silva



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Barreto da Silva, Usuário Externo**, em 20/06/2022, às 11:17, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Regina Godoy Baptistaõ, Professor(a)**, em 20/06/2022, às 11:23, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Tadeu dos Santos Dias, Usuário Externo**, em 04/08/2022, às 11:59, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1005788** e o código CRC **EF30C7B0**.

À minha família,  
DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pela força que me guia em toda minha vida.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, ao curso de Agronomia e à Pós-graduação em Agronomia, pela estrutura, seus professores e funcionários e pelos conhecimentos a mim transmitidos durante minha graduação e mestrado.

À CAPES pela concessão de bolsa de auxílio durante o período de realização do mestrado.

À Fazenda Escola Capão da Onça, pela área, insumos, maquinários e funcionários disponibilizados para a realização de parte dessa pesquisa em campo.

Ao Professor Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias, pela disposição em me orientar e auxiliar em todos os momentos que precisei.

À Professora Dra. Maristella Dalla Pria, minha co-orientadora, pela confiança, paciência e oportunidade a mim concedidas na realização desse trabalho.

À Embrapa Arroz e Feijão, principalmente à Dra. Adriane W. Ferreira, pelo fornecimento de alguns isolados de patógeno necessários para essa pesquisa.

À empresa Inova e à Universidade Estadual do Centro Oeste pelo fornecimento de alguns produtos para a realização dessa pesquisa.

À minha mãe, Selma Scortegagna, pela minha criação, pelo amor e incentivo à educação, à escrita e leitura, desde a mais tenra idade.

Ao meu pai, Ademir Scortegagna, a quem devo o amor pela agricultura, agradeço por toda ajuda na execução e montagem dos meus experimentos, nos quais era o maior interessado em entender a pesquisa.

Aos meus irmãos, Tiago e Paola, que partilharam da mesma educação e amor que recebi, obrigada por serem meus grandes exemplos profissionais.

Ao meu namorado, João Vitor de Araujo, pelo companheirismo e suporte emocional constante, mesmo nas horas em que a ansiedade superava a razão e quando o mal-humor predominava. Agradeço também sua disposição em me auxiliar nos experimentos em sábados, domingos e feriados, sem se importar com o horário ou o calor e sol em campo.

À minha madrinha, Raquel Franco, minha primeira professora, com a qual aprendi a ler e escrever, além de sempre ter seu incentivo e carinho.

À Polyana E. T. P. Christmann, por toda ajuda e disponibilidade em colaborar com esse projeto, além de ter se tornado uma amiga após esses anos.

À Aline Brizola, pelo exemplo de força e resiliência e por seu apoio inquestionável nos mais diversos momentos e nas situações mais inusitadas nesses anos de amizade.

À Angelica Ribeiro, pela amizade e por todo o companheirismo, paciência e inabalável no meu sucesso.

À Dra. Luciane Hennemberg, técnica dos laboratórios de Fitossanidade, por toda a ajuda na preparação de materiais para essa pesquisa.

Aos alunos do Laboratório F-26, Taize Schafranski, Alexandre Ochonski, Zandia S. Nascimento e Rafaela Marcantes que me auxiliaram durante a execução dos experimentos.

Aos meus companheiros de pesquisa, Gabrielle Bueno e Luiz Felipe Gerlinger, pela ajuda na execução dos experimentos e pela oportunidade em contribuir com sua educação e seu trabalho de conclusão de curso.

“A agricultura é a arte de saber esperar.”  
(Riccardo Bacchelli)

## RESUMO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de grande destaque na produção e consumo de grãos no Brasil. Dentre os fatores que levam à redução na sua produtividade, a mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) é uma doença capaz de levar a danos e perdas na cultura. O estudo de produtos alternativos aos fungicidas no controle dessa doença pode trazer resultados positivos e ambientalmente sustentáveis. O objetivo desse estudo foi avaliar na cultura do feijão a eficiência de fungos do gênero *Trichoderma*, em condições *in vitro*, em casa de vegetação, em duas repetições e campo, contra o patógeno *P. griseola* e avaliar o efeito desses produtos na indução de resistência em plantas tratadas, por meio da atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e da fitoalexina faseolina. Avaliou-se *in vitro* sete espécies de *Trichoderma*, em três testes distintos, para verificar o antagonismo e a ação de metabólitos voláteis e não-voláteis sobre o crescimento e esporulação de *P. griseola*. Em casa de vegetação e a campo avaliou-se as espécies de *Trichoderma*, o indutor de resistência acibenzolar-S-metil (ASM) e o fungicida hidróxido de fentina, sobre a severidade de mancha angular. Nos testes enzimáticos utilizou-se os mesmos tratamentos avaliados a campo e verificou-se o efeito desses produtos na indução de resistência em plantas tratadas via foliar, por meio da atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e da fitoalexina faseolina. Nos testes *in vitro*, *P. griseola* apresentou redução no crescimento micelial e na esporulação quando submetido aos fungos do gênero *Trichoderma*. Em condições de casa de vegetação, para a cultivar IPR-Tuiuiú, na segunda repetição do experimento, os tratamentos com *T. tomentosum*, *T. viride* e ASM foram eficientes em reduzir a severidade de mancha angular. Os produtos alternativos baseados em esporos de fungos do gênero *Trichoderma* e ASM, aplicados na cultura do feijão em condições de campo, foram tão eficientes quando o fungicida na redução da severidade de mancha angular. Os tratamentos contendo *T. asperellum*, *T. endophyticum*, *T. lentiforme* e *T. tomentosum* foram capazes de promover acúmulo da enzima peroxidase quando comparados à testemunha e ao ASM nos tempos avaliados. Para a polifenoloxidase, na cultivar IPR-Tuiuiú os tratamentos com *Trichoderma* não influenciaram o acúmulo dessa enzima, enquanto o ASM apresentou acúmulo ascendente com o passar do tempo. Na cultivar IPR-Quero-Quero, houve acúmulo de polifenoloxidase no tratamento com *T. harzianum*, mas apresentando tendência de decréscimo após 48 horas.

Palavras chave: *Phaseolus vulgaris*; *Pseudocercospora griseola*; *Trichoderma* spp.; fungos sapróbios; acibenzolar-S-metílico.

## ABSTRACT

The common bean (*Phaseolus vulgaris*) is a legume of great prominence in the production and consumption of grains in Brazil. Among the factors that lead to a reduction in its productivity, angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*) is a disease capable of leading to damage and losses in the crop. The study of alternatives to control this disease can bring positive and environmentally sustainable results. The objective of this study was to evaluate the efficiency of fungi of the genus *Trichoderma* in the bean crop, under *in vitro* conditions, in a greenhouse and field, against the pathogen *P. griseola* and to evaluate the effect of these products in the induction of resistance in treated plants, through the activity of peroxidase, polyphenoloxidase and phytoalexin phaseolin enzymes. Seven species of *Trichoderma* were evaluated *in vitro*, in three different tests, to verify the antagonism and action of volatile and non-volatile metabolites on the growth and sporulation of *P. griseola*. In a greenhouse and in the field, the species of *Trichoderma*, the acibenzolar-S-methyl (ASM) resistance inducer and the fungicide fentin hydroxide were evaluated on the severity of angular leaf spot. In the enzymatic tests, the same treatments evaluated in the field were used and the effect of these products on the induction of resistance in plants treated via foliar was verified, through the activity of the enzymes peroxidase, polyphenoloxidase and phytoalexin phaseolin. In *in vitro* tests, *P. griseola* showed a reduction in mycelial growth and sporulation when subjected to fungi of the genus *Trichoderma*. Under greenhouse conditions, for the cultivar IPR-Tuiuiu, in the second experiment, treatments with *T. tomentosum*, *T. viride* and ASM were efficient in reducing the severity of angular leaf spot. Alternative products based on spores of fungi of the genus *Trichoderma* and ASM, applied to the bean crop under field conditions, were as efficient as the fungicide in reducing the severity of angular leaf spot. The treatments containing *T. asperellum*, *T. endophyticum*, *T. lentiforme* and *T. tomentosum* were able to promote accumulation of the peroxidase enzyme when compared to the control and to ASM in the evaluated times. For polyphenoloxidase, in the cultivar IPR-Tuiuiu, treatments with *Trichoderma* did not influence the accumulation of this enzyme, while ASM showed an ascending accumulation over time. In the cultivar IPR-Quero-Quero, there was accumulation of polyphenoloxidase in the treatment with *T. harzianum*, but showing a tendency to decrease after 48 hours.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*; *Pseudocercospora griseola*; *Trichoderma* spp.; saprobic fungi; acibenzolar-S-methyl.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Sintomas de mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) em face adaxial e abaxial, respectivamente, de folíolo de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Ponta Grossa, 2022.....19
- FIGURA 2 – Discos de colônias de *Pseudocercospora griseola* sobrepostos aos meios de cultura (A); placas lacradas com plástico filme (B). Ponta Grossa, 2022.....25
- FIGURA 3 – Colônia de *Pseudocercospora griseola* em béquer contendo 1 mL de água destilada (A). Raspagem de colônia de *Pseudocercospora griseola* com pincel para liberação dos esporos em água (B). Suspensão de esporos sendo colocada em câmara de Neubauer (C). Imagem de esporo de *Pseudocercospora griseola* em microscópio ótico (objetiva 40x) (D). Ponta Grossa, 2022.....26
- FIGURA 4 – Pré-cultivo de *Pseudocercospora griseola* livre de antagonistas (A). Colônia de *Pseudocercospora griseola* com dez dias de desenvolvimento (à esquerda) e disco de colônia de *Trichoderma lentiforme* (à direita) (B). Placa de cultivo pareado lacrada com plástico filme (C). Ponta Grossa, 2022.....28
- FIGURA 5 – Pré-cultivo de *Pseudocercospora griseola* livre de antagonistas (A). Colônia de *Pseudocercospora griseola* com dez dias de desenvolvimento em meio aveia ágar (à esquerda) e colônia de *Trichoderma lentiforme* em meio BDA (à direita) (B). Placa contendo o antagonista sobreposto à placa do patógeno (C). Placas sobrepostas lacradas com plástico filme (D). Ponta Grossa, 2022.....28
- FIGURA 6 – Pré-cultivo de *Pseudocercospora griseola* livre de antagonistas (A). Colônia de *Trichoderma lentiforme* sobre celofane em placa contendo meio aveia ágar (B). Colônia de *Pseudocercospora griseola* com dez dias de desenvolvimento (acima) e colônia de *Trichoderma lentiforme* com 5 dias de desenvolvimento (abaixo) (C). Transferência da colônia de *Pseudocercospora griseola* para meio contendo metabólitos de *Trichoderma lentiforme* (D). Placas lacradas com plástico filme (E). Ponta Grossa, 2022.....29
- FIGURA 7 – Proteção do segundo trifólio de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no momento da aplicação dos tratamentos para proteção contra mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) em casa de vegetação (A). Câmara úmida em vasos contendo plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas com suspensão de esporos de *Pseudocercospora griseola* (B). Ponta Grossa, 2022.....32
- FIGURA 8 – Escala diagramática para a avaliação da severidade de mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*).....32
- FIGURA 9 – Condições climáticas: precipitação (mm), umidade relativa (%) e temperatura (°C) durante a condução do experimento com a cultura do feijão (*Phaseolus*

- vulgaris*) para proteção contra a mancha angular (*Pseudocercospora griseola*). Ponta Grossa – PR.....34
- FIGURA 10 – Esquema de execução do experimento visando a coleta de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) para análise enzimática.....35
- FIGURA 11 – Folha de feijão (*Phaseolus vulgaris*) mantida à 4°C (A). Folha macerada em tampão acetato de sódio (B). Homogenato de folhas maceradas em microtubo tipo Eppendorf® (C). Homogenato após centrifugação (D). Ponta Grossa, 2022.....36
- FIGURA 12 – Semeadura de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) IPR-Quero-Quero e IPR-Tuiuiú em bandeja contendo areia esterilizada (A); plântulas emergidas em câmara para estiolamento dos hipocótilos (B); segmentos de hipocótilos estiolados em gerbox para aplicação dos tratamentos (C). Tubo de ensaio contendo etanol e o hipocótilo segmentado (D)..... 37
- FIGURA 13 – Curvas de severidade de mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) nas cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) IPR-Tuiuiú (A) e IPR-Quero-Quero (B)..... 47
- FIGURA 14 – Regressão quadrática do acúmulo de peroxidase nos três tempos de coleta para a cultivar IPR-Tuiuiú. Eixo x: tempo 1 – 24 horas antes dos tratamentos; 2 – 24 horas após os tratamentos; 3 – 48 horas após os tratamentos; Eixo y: acúmulo de peroxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína). Dados transformados (Box-Cox) em  $(x)^{0,3}$ ; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; ns: não significativo. Ponta Grossa – PR, 2022.....54
- FIGURA 15 – Regressão quadrática do acúmulo de peroxidase nos três tempos de coleta para a cultivar IPR-Quero-Quero. Eixo x: tempo 1 – 24 horas antes dos tratamentos; 2 – 24 horas após os tratamentos; 3 – 48 horas após os tratamentos; Eixo y: acúmulo de peroxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína). Dados transformados (Box-Cox) em  $(x)^{0,3}$ ; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; ns: não significativo. Ponta Grossa – PR, 2022.....55
- FIGURA 16 – Regressão quadrática do acúmulo de polifenoloxidase nos três tempos de coleta para a cultivar IPR-Tuiuiú. Eixo x: tempo 1 – 24 horas antes dos tratamentos; 2 – 24 horas após os tratamentos; 3 – 48 horas após os tratamentos; Eixo y: acúmulo de peroxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína). Dados transformados (Box-Cox) em  $(x + 0,5)^{0,2}$ ; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; ns: não significativo. Ponta Grossa – PR, 2022.....56
- FIGURA 17 – Regressão quadrática do acúmulo de polifenoloxidase nos três tempos de coleta para a cultivar IPR-Quero-Quero. Eixo x: tempo 1 – 24 horas antes dos tratamentos; 2 – 24 horas após os tratamentos; 3 – 48 horas após os tratamentos; Eixo y: acúmulo de peroxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína). Dados transformados (Box-Cox) em  $(x + 0,5)^{0,2}$ ; \*

significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; ns: não significativo. Ponta Grossa – PR, 2022.....57

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 – Estádios fenológicos do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*).....18
- TABELA 2 – Espécies de *Trichoderma* utilizadas na execução dos testes *in vitro* contra *Pseudocercospora griseola*.....27
- TABELA 3 – Tratamentos e suas respectivas dosagens, pulverizados em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cultivadas em casa de vegetação e campo para proteção contra mancha angular (*Pseudocercospora griseola*).....31
- TABELA 4 – Índices de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de colônias de *Pseudocercospora griseola* em diferentes meios de cultura. Ponta Grossa – PR, 2021.....39
- TABELA 5 – Índices de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de colônias de *Pseudocercospora griseola* submetidas ao crescimento pareado com fungos do gênero *Trichoderma*. Ponta Grossa – PR, 2021.....41
- TABELA 6 – Índices de crescimento micelial e esporulação de colônias de *Pseudocercospora griseola* submetidas a metabólitos voláteis de fungos do gênero *Trichoderma*. Ponta Grossa – PR, 2021.....42
- TABELA 7 – Índices de crescimento micelial e esporulação de colônias de *Pseudocercospora griseola* submetidas a metabólitos não voláteis de fungos do gênero *Trichoderma*. Ponta Grossa – PR, 2021.....43
- TABELA 8 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivadas em casa de vegetação. Ponta Grossa – PR, 2022.....46
- TABELA 9 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivadas em condições de campo na Fazenda Escola Capão da Onça. Ponta Grossa – PR, safra 2020/2021.....48
- TABELA 10 – Componentes de rendimento e produtividade de feijão (*Phaseolus vulgaris*) da cultivar IPR-Tuiuiú, cultivada em condições de campo na Fazenda Escola Capão da Onça. Ponta Grossa – PR, safra 2020/2021.....49
- TABELA 11 – Acúmulo de peroxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), em folhas de feijão das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivadas em casa de vegetação. Ponta Grossa – PR, 2022.....51
- TABELA 12 – Acúmulo de polifenoloxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), em folhas de feijão das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivadas em casa de vegetação. Ponta Grossa – PR, 2022.....53

TABELA 13 – Acúmulo de faseolina, expresso em unidades de absorbância por grama de peso fresco ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), em hipocótilos estiolados de feijão das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivados câmara de germinação, na ausência de luz. Ponta Grossa – PR, 2022.....58

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVO .....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3 HIPÓTESES .....</b>	<b>16</b>
<b>4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
4.1 CULTURA DO FEIJÃO .....	17
4.2 DOENÇAS DA CULTURA DO FEIJÃO .....	18
4.2.1 Mancha Angular.....	18
4.2.1.1 Indução de resistência.....	20
4.2.1.2 Fungos sapróbios .....	21
4.2.1.3 Acibenzolar-S-metílico.....	23
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
5.2 TESTES <i>in vitro</i> .....	26
5.3 TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	30
5.4 TESTES EM CAMPO.....	33
5.5 ANÁLISE ENZIMÁTICA .....	34
5.5.1 Obtenção dos Extratos Proteicos.....	35
5.5.2 Atividade de Peroxidase.....	36
5.5.3 Atividade de Polifenoloxidase .....	36
5.5.4 Atividade de Faseolina.....	37
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>6 RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
6.1 TESTES PRELIMINARES.....	39
6.2 TESTES <i>in vitro</i> .....	40
6.3 TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	45
6.4 TESTES EM CAMPO.....	47
6.5 ANÁLISES ENZIMÁTICAS.....	50
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO A - COMPOSIÇÃO DOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA O TESTE DE CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE <i>Pseudocercospora griseola</i>.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A preocupação mundial em relação à sustentabilidade expande ano a ano e com isso, busca-se a produção de alimentos em quantidades suficientes e de forma sustentável. Logo, a experimentação e a pesquisa são fundamentais na busca de produtividades mais elevadas e de forma ambientalmente sustentável.

Com ampla distribuição e boa adaptação a diversas condições de cultivo, o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma planta de ciclo anual e importante cultura comercial nacional. O grão ocupa posição de destaque na alimentação humana, além de possibilitar uma alternativa de cultivo a diversos sistemas produtivos na agricultura nacional (CARNEIRO, 2014).

A produtividade da cultura do feijão relaciona-se com a escolha e posicionamento das cultivares adequadas para o local de semeadura, fertilidade e adubação, controle de plantas daninhas e manejo de pragas e doenças. Dentre as principais doenças de relevância econômica à cultura, está a mancha angular (*Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous & U. Braun), que pode reduzir sua produção (EMBRAPA, 2018).

O monitoramento e o manejo de doenças fúngicas é uma prática muito utilizada na cultura do feijão e essencial na manutenção da produtividade. São empregadas no manejo integrado de doenças estratégias como a rotação de culturas, cultivares resistentes, controle biológico e também o controle químico. Entretanto, a aplicação inadequada de defensivos agrícolas, destacando-se os fungicidas, traz consigo problemas como a fitotoxidez, contaminação ambiental, além de uma possível seleção de populações resistentes às moléculas (SARTORATO, 2006).

Busca-se então, o desenvolvimento de alternativas que possibilitem redução no custo produtivo e seguridade no controle de doenças fúngicas, como a mancha angular. Nesse sentido, o uso de produtos que promovam a indução de resistência em plantas de feijão, pode se tornar uma alternativa de controle efetivo e menos oneroso (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013).

A resistência em plantas é comumente induzida com o uso de produtos químicos, os quais necessitam de diversos cuidados em relação ao ambiente e aplicador, além de não serem permitidos em alguns sistemas de produção, como o orgânico. Então, como uma alternativa ao uso de químicos, pode-se empregar o uso de agentes biológicos e de nutrição mineral na indução de resistência em plantas, reduzindo as contaminações ambientais e promovendo também o controle das doenças (ROMEIRO, 2007).

## **2 OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar produtos alternativos aplicados na cultura do feijão com finalidade de indução de resistência e proteção contra a mancha angular.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Realização de testes *in vitro* para averiguação da sensibilidade da *P. griseola* aos produtos.

Realização de análises enzimáticas para averiguação da indução de resistência da doença via aplicação foliar.

## **3 HIPÓTESES**

*Pseudocercospora griseola* será sensível aos produtos nos testes *in vitro*.

A aplicação de fungos sapróbios (*Trichoderma* spp.), acibenzolar-S-metílico e fungicida (hidróxido de fentina) em plantas de feijão, promoverá proteção contra a mancha angular em casa de vegetação e campo.

A aplicação foliar destes produtos proporcionará aumento das enzimas peroxidase e polifenoloxidase nas plantas de feijão em casa de vegetação, aumentando sua resistência.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 CULTURA DO FEIJÃO

A planta de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à família Fabaceae, sub-família Faboideae e gênero *Phaseolus*. É uma planta dicotiledônea, herbácea e originária de leguminosas americanas, que se encontravam distribuídas do Norte do México ao Noroeste da Argentina e foram domesticadas por indígenas (BITOCCHI, 2012).

A cultura possui hábito de crescimento indeterminado, folhas trifolioladas e fruto do tipo vagem, onde se desenvolvem as sementes (SILVA, 1981). Historicamente, os grãos possuem grande destaque na produção agrícola nacional, uma vez que são uma importante fonte proteica, consumida diariamente na dieta da população (CARNEIRO *et al.*, 2014; IBGE, 2020).

O desenvolvimento da planta de feijão em campo pode ser dividido em duas fases, a vegetativa e a reprodutiva (Tabela 1). O uso da escala fenológica facilita o entendimento do desenvolvimento da cultura, além de permitir localizar suas suscetibilidades à déficits e patogenias, juntamente com as estratégias de manejo a serem adotadas (OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

Os cinco maiores produtores mundiais da cultura em 2020, foram respectivamente, Índia, Myanmar, Brasil, Estados Unidos da América e China (FAO, 2020a). No Brasil, está entre as vinte commodities mais produzidas, ultrapassando a marca de 3 milhões de toneladas produzidas anualmente (FAO, 2020b).

A planta de feijão caracteriza-se por ser uma leguminosa de grande adaptabilidade edafoclimática, permitindo seu cultivo em praticamente toda a extensão do território brasileiro, durante o ano todo, em aproximadamente 2,9 milhões de hectares, distribuídos em três grandes safras anuais. A primeira safra é semeada entre os meses de agosto e dezembro (safra das águas), seguida pela segunda safra entre janeiro e abril (safra das secas), e por fim, a terceira safra, de maio a julho, melhor adaptada em regiões mais quentes do país (CONAB, 2021).

Por ser uma cultura de ciclo curto, em média 80 a 90 dias, o feijão apresenta vantagens quanto à sua produção, uma vez que os agricultores adequam sua semeadura em janelas pequenas, sem deixar de produzir outros grãos. No entanto, a constante presença da cultura em campo favorece o desenvolvimento de populações de pragas e doenças, que podem levar à redução da produtividade e diminuição na qualidade dos grãos (BONETT *et al.*, 2006; CARNEIRO *et al.*, 2014).

TABELA 1 – Estádios fenológicos do feijão (*Phaseolus vulgaris*).

Estádio	Nome	Descrição
V0	Germinação	Germinação da semente.
V1	Emergência	Emergência de pelo menos 50% dos cotilédones até o início do desenvolvimento das folhas primárias.
V2	Folhas primárias	Folhas primárias totalmente expandidas até a abertura do primeiro trifólio.
V3	Primeiro trifólio	Primeiro trifólio totalmente expandido, segundo trifólio em crescimento até o início da abertura do terceiro trifólio.
V4	Terceiro trifólio	Terceiro trifólio aberto até o surgimento dos primeiros botões florais.
R5	Pré-floração	Aparecimento dos botões florais até o início do florescimento.
R6	Floração	Abertura de pelo menos 50% dos botões florais até o florescimento pleno.
R7	Formação de vagens	Formação das primeiras vagens (canivetes) e termina quando as vagens atingem comprimento máximo.
R8	Enchimento de vagens	Enchimento de grãos até o início da queda de folhas.
R9	Maturação	Senescência foliar e maturação dos grãos.

Fonte: Adaptado de: Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos (OLIVEIRA *et al.*, 2018a).

## 4.2 DOENÇAS DA CULTURA DO FEIJÃO

Entre os principais fatores que levam a danos no rendimento da cultura do feijão, estão as doenças. Estas podem ser causadas por fungos, bactérias, nematoides e vírus, que em conjunto com um hospedeiro suscetível e condições climáticas favoráveis, causam interferência nos processos fisiológicos das plantas, levando a um desempenho deficitário, reduzindo seu potencial produtivo (CARNEIRO *et al.*, 2014; KRUGNER, 1995).

No Brasil, existem cerca de 20 doenças de importância epidemiológica catalogadas para a cultura do feijão, as quais, em grande parte, possuem um agente fúngico atuando. Doenças comumente presentes nas áreas cultivadas como antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn. Lams. Scrib), mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), ferrugem (*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger)), oídio (*Oidium* sp.), que sem o devido controle, podem levar a danos próximos a 100% (EMBRAPA, 2018).

### 4.2.1 Mancha Angular

A mancha angular, com agente causal *P. griseola*, é uma doença observada em todas as regiões produtoras de feijão no Brasil, podendo levar a danos na produtividade de até 80%. A safra da seca (semeadura de janeiro à abril) apresenta melhores condições para disseminação e desenvolvimento da doença, como a alternância entre períodos secos e úmidos, umidade relativa acima de 70% e temperatura média de 24°C (WENDLAND *et al.*, 2016).

Os conídios de *P. griseola* são disseminados principalmente pelo vento, sobrevivendo também em hospedeiros alternativos, sementes e restos culturais infectados, favorecendo a contaminação precoce na cultura (SINDHAN; BOSE, 1980; SINGH; SCHWARTZ, 2010). Em condições de campo, os conídios podem sobreviver por até 19 meses, dificultando seu controle em áreas de semeadura direta na palha (WENDLAND *et al.*, 2016).

Em meio de cultura, *P. griseola* cresce lentamente, requerendo temperatura mínima de 8°C e máxima de 28°C e pH entre 6 e 7 para seu desenvolvimento. Apresenta ainda diferentes necessidades de compostos carbônicos, nitrogenados e água entre suas fases de crescimento micelial e esporulação, dificultando a obtenção de meios de cultura ideais para seu crescimento (GOES, 2017; MARZLUF *et al.*, 1997; MELETIADIS *et al.*, 2001; SARTORATO; RAVA, 1994).

A esporulação abundante do fungo *in vitro* ocorre em média entre 14 e 15 dias após a incubação, variando com o meio de cultura empregado. As placas contendo as culturas devem ser mantidas no escuro e em temperatura entre 22 e 24°C a fim de estimular a esporulação (RIBEIRO, 1991; SARTORATO; RAVA, 1994).

De acordo com o aumento da severidade da doença em campo, o fungo pode ocasionar sintomas nas folhas, vagens e também no caule. Na folha, surgem lesões angulares, de coloração amarronzada e contidas pelas nervuras, podendo levar à desfolha prematura (Figura 1). Já nas vagens e no caule, surgem lesões arredondadas, de coloração marrom, não deprimidas (EMBRAPA, 2018; MONDA; SENDERS; HICK, 2001).

FIGURA 1 – Sintomas de mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) em face adaxial e abaxial, respectivamente, de folíolo de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Ponta Grossa, 2022.



Fonte: a autora.

Entre as estratégias para minimizar os danos da mancha angular em feijão, estão o controle químico e resistência varietal, a qual é dificultada devido à variabilidade patogênica do fungo. O uso de fungicidas, por sua vez, podem levar à contaminação ambiental e humana, além da resposta evolutiva natural de populações do patógeno que se tornam resistentes às moléculas (SARTORATO, 2006).

Nesse sentido, buscam-se alternativas ao uso de químicos no controle de doenças, de forma mais sustentável. Dentre essas alternativas, pode-se destacar a indução de resistência, que ativa mecanismos de defesa naturalmente presentes nas plantas e o controle biológico, que atua com agentes antagonistas aos fitopatógenos (DILDEY, 2017; SHARMA *et al.*, 2017).

#### 4.2.1.1 Indução de resistência

A resistência à patógenos é caracterizada pela capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada de um microrganismo, ou criar condições adversas à colonização de seus tecidos, além da presença de mecanismos capazes de suportarem suas injúrias (PASCHOLATI; LEITE, 1995). Podem ser observadas características estruturais ou bioquímicas, como a presença de parede celular e também a presença de metabólitos como as fitoalexinas, que possuem toxicidade aos patógenos (AHUJA; KISSEN; BONES, 2012).

As fitoalexinas são produzidas a partir de estímulos obtidos naturalmente com o início da infecção ou por meio de estímulos de indutores. Estas, acumulam-se em torno de tecidos doentes, e em concentrações suficientes, são capazes de deter o desenvolvimento de fitopatógenos (AGRIOS, 2005; FURLAN *et al.*, 2020; SOLINO *et al.*, 2017).

A indicação da resistência induzida pode ser observada também com o aumento da atividade de enzimas na planta, como as polifenoloxidasas e peroxidases. Estas, são indicativos de que a planta apresenta metabólitos e reações de defesa contra a infecção promovida pelos patógenos (BRESSAN, 2011; LORENZETTI *et al.*, 2018).

A importância das polifenoloxidasas na resistência de planta está ligada ao fato de que essas enzimas detém a capacidade de oxidar compostos fenólicos em quinonas, aumentando o seu nível de toxicidade aos patógenos. Logo, pode-se assumir que maiores níveis dessas enzimas nos tecidos das plantas podem levar a um incremento na resistência, uma vez que se aumenta a concentração de produtos tóxicos, dificultando a infecção (AGRIOS, 2005).

As peroxidases também são responsáveis pela oxidação de compostos fenólicos, transformando-os em quinonas e, produzindo peróxido de hidrogênio como produto da reação. O peróxido age não somente como um composto antimicrobiano altamente tóxico, mas liga-se

à radicais livres na planta, incrementando a taxa de polimerização de compostos fenólicos em substâncias lignificantes. Estas, depositam-se nas paredes celulares das células vegetais, dificultando a entrada e o desenvolvimento do patógeno (AGRIOS, 2005; BARCELÓ, CALDERÓN; ZAPATA 1994).

Em pesquisa avaliando a indução de resistência em plantas de feijão à mancha angular decorrente da aplicação de micélio de *Pycnoporus sanguineus* (L. ex Fr.) Murr., Viecelli *et al.* (2010) constataram mudanças significativas no acúmulo de enzimas. Os autores constataram que o uso de *P. sanguineus* promoveu controle sobre *P. griseola in vitro*, além de atuar como um elicitador para indução de resistência através do aumento do nível de peroxidases e polifenoxidases.

Os elicitores são moléculas que possuem a capacidade de ativar as defesas fisiológicas e produção de metabólitos e enzimas ligadas à resistência em plantas, e podem ser de origem biótica ou abiótica. Dentre estes elicitores, destacam-se substâncias como o ácido salicílico (WALTERS; RATSEP; HAVIS, 2013), acibenzolar-S-metílico (BRESSAN, 2011; HUANG *et al.*, 2014) e indutores bióticos como espécies de *Trichoderma* (ALIZADEH *et al.*, 2013).

#### 4.2.1.2 Fungos sapróbios

Fungos sapróbios são microrganismos presentes no ambiente e que apresentam relação simbiótica, ou seja, não causam danos ou injúrias aparentes às plantas. Essa relação tem grande complexidade, porém pode trazer uma série de benefícios às plantas hospedeiras, como proteção a fitopatógenos e promoção de crescimento (AZEVEDO, 2014; DUTTA *et al.*, 2014; JIA *et al.*, 2016).

O auxílio à proteção da planta promovido por fungos sapróbios pode ocorrer de três diferentes formas. A primeira, caracteriza-se pelo biocontrole através da competição por nutrientes, na qual o organismo antagonista tem taxa de crescimento mais elevada, sobressaindo-se ao patógeno. Na segunda, há produção de substâncias antimicrobianas pelos organismos endofíticos, que possuem efeito direto aos patógenos, interferindo no seu metabolismo e/ou degradando suas estruturas (ATANASOVA *et al.*, 2013; MBARGA *et al.*, 2012; MONTE, 2001; RABEA *et al.*, 2003;).

Por fim, na terceira forma, há o aumento da resistência da planta induzida a partir de substâncias produzidas, como fitoalexinas, alcaloides, flavonoides, diterpenos, isoflavonoides e quitinases. Deste modo, esses microrganismos sapróbios podem colaborar com a proteção contra doenças, sendo um método alternativo ao controle químico e uma ferramenta ao manejo

integrado para cultivos orgânicos (FIRÁKOVÁ; STURDÍKOVÁ; MÚCKOVÁ, 2007; GAJERA *et al.*, 2013; MOHAMED *et al.*, 2020).

Dentre as diversas espécies de fungos sapróbios, destaca-se o gênero *Trichoderma*, que não apresenta fitotoxicidade e tem, dentre seus efeitos em plantas, a produção de substâncias que levam à indução de resistência (BAIYEE; ITO; SUNPAPAO, 2019; FURLAN *et al.*, 2020; LUNA *et al.*, 2021; MEI *et al.*, 2019; OLIVEIRA, 2018b; SARZI, 2019).

Esse gênero é eficiente também no controle de patógenos *in vitro* e *in vivo* e, conseqüentemente, na redução da severidade de doenças em plantas (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020; BHUSAL *et al.* 2018; FARIAS; CRUZ; DUARTE, 2020; FIGUEIRA *et al.*, 2020; GABARDO *et al.*, 2020b; SILVA *et al.*, 2021). Pode haver ainda o incremento produtivo das culturas após a utilização destes fungos, assim como o observado por Pereira *et al.* (2019) e Steffen *et al.* (2021).

Estudos realizados na proteção da cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum falcatum*, testando elicitores provenientes de fungos do gênero *Trichoderma*, obtiveram resultados positivos quanto ao incremento na síntese e atividade de enzimas, como quitinases, peroxidases, polifenoloxidasas, elevando a resistência das plantas e reduzindo os danos pela doença (SINGH *et al.*, 2018).

O gênero *Trichoderma* é também capaz de produzir metabólitos voláteis, como a 6-pentil- $\alpha$ -pirona, o ácido heptelídico e não voláteis, como gliotoxina e viridina. Estes, possuem ação antimicrobiana, afetando diretamente os patógenos (DEGANI; DOR, 2021; MUKHERJEE; HORWITZ; KENERLEY, 2012; WEINDLING, 1964).

Avaliando o potencial de controle de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o fungo *Colletotrichum musae*, causador da antracnose da banana (*Musa* spp.), *in vitro*, Barbosa *et al.* (2021) tiveram resultados positivos. Os isolados tiveram potencial antagonístico e produziram metabólitos voláteis que foram capazes de reduzir o desenvolvimento do patógeno.

Christmann *et al.* (2019) tiveram resultados satisfatórios quanto ao controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em plantas de feijão em casa de vegetação. As espécies utilizadas, *Trichoderma viride* e *Trichoderma tomentosum* foram capazes também de reduzir o crescimento do patógeno *in vitro*, em condições de cultivo pareado e pela produção de compostos voláteis e não voláteis, promovendo seu controle.

O gênero *Trichoderma* possui ainda fácil utilização, podendo ser incorporado às sementes, sulco de plantio e até mesmo via foliar. Além disso, têm tolerância à estresses abióticos, a condições adversas de desenvolvimento e também a combinações com fungicidas, sendo, portanto, um bom agente de biocontrole de doenças de plantas (ADNAN, 2019;

BONETT *et al.*, 2013; CHRISTMANN, 2019; LUCON, 2009; ROMEIRO, 2007; SÁNCHEZ-MONTESINOS *et al.*, 2021).

#### 4.2.1.3 Acibenzolar-S-metílico

O acibenzolar-S-metílico (ASM) é um composto sintético, pertencente ao grupo dos benzotriazolóis. Causa interferência fisiológica e bioquímica em plantas, tendo capacidade de aumentar a atividade enzimática envolvida com a resistência das mesmas, induzindo a produção de metabólitos para sua autodefesa (MYRESIOTIS; VRYZAS; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2014; OOSTENDORP *et al.*, 2001).

A atividade do ASM ocorre sistemicamente, levando a ativação de genes nas plantas, porém sem interferir diretamente nos patógenos. Sua utilização resulta na ativação enzimática e posterior produção de proteínas e fitoalexinas. Buscando a eficiência de diversos indutores de resistência na produção de fitoalexina faseolina em cultivares de feijão, Schafranski (2020) obteve resultados positivos quanto ao acúmulo dessa enzima após o tratamento com ASM na cultivar BRS-Esteio.

Testando fosfitos e o ASM isolados ou combinados com fungicidas para o controle de patógenos biotróficos em trigo (*Triticum aestivum* L.), observou-se que o ASM foi eficiente no controle de oídio na cultura (SANTOS *et al.*, 2018). Por sua vez, Melo; Serra; Nascimento (2021), testando o efeito do extrato hidroalcoólico e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) sobre o fungo *Fusarium oxysporum*, determinaram que o ASM também foi eficaz na redução da severidade da doença.

O ASM pode levar ainda à síntese de peroxidases, polifenoloxidasas e catalases, conferindo resistência por exemplo, às plantas de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) (MELO; SERRA; NASCIMENTO, 2021); soja (*Glycine max* L. Merrill) (GABARDO *et al.*, 2020c); laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (DAROLT, 2016); tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (MYRESIOTIS; VRYZAS; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, 2014); e feijão (BRESSAN, 2011).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em condições de laboratório, casa de vegetação e campo. As dependências laboratoriais e a estrutura de casas de vegetação são localizadas no campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa (S25°5'25", O50°6'10"), e a área experimental em campo, na Fazenda Escola Capão da Onça (S25°5'49", O50°3'11"), em Ponta Grossa, Paraná.

### 5.1 TESTES PRELIMINARES

Os meios batata-dextrose-ágar (BDA) e meio suco de tomate apresentavam resultados insatisfatórios com relação à velocidade de crescimento e produção de esporos de *P. griseola*. Então, devido a necessidade de produzir grandes quantidades de inóculo para a utilização no trabalho, buscaram-se alternativas aos meios de cultura utilizados para o patógeno.

Foram testados os meios de cultura (Anexo A):

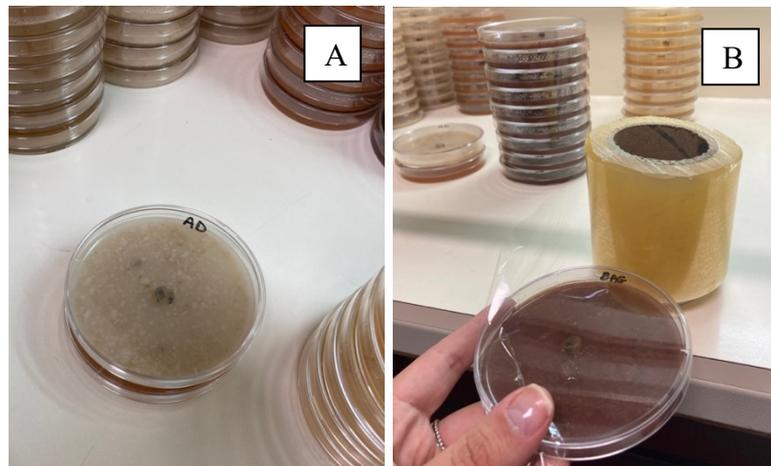
- BA – Batata-ágar (Adaptado de: RIKER; RIKER, 1936. In: MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997);
- BDA – Batata-dextrose-ágar (RIKER; RIKER, 1936. In: MENEZES; SILVA-HANLIN, 1997);
- ST – Meio de suco de tomate (DALLA PRIA; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1997);
- ET – Meio de extrato de tomate (DALLA PRIA; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1997);
- AI – Meio de alimento infantil (SANTOS FILHO et al., 1976. Adaptado por: DALLA PRIA; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1997);
- FFA – Meio de extrato de folhas de feijão-ágar (Adaptado de: SILVEIRA, 1967);
- FFD – Meio de extrato de folhas de feijão-dextrose-ágar (SILVEIRA, 1967);
- V8 – Meio de suco de vegetais V8 (CAMPOS; FUCIKOVSKY, 1980);
- AA – Meio de Aveia-ágar (Adaptado de: DIAS NETO, 2010);
- AD – Meio de Aveia-dextrose-ágar (DIAS NETO, 2010);
- BAG – Meio de Banana-ágar (Adaptado de: CANO et al., 2020) e
- CZ – Meio Czapek Ágar (TUIITE, 1969).

Os meios foram preparados em balão volumétrico, com capacidade para 0,5 L, tampados com algodão e papel do tipo kraft e então autoclavados, a 121°C e 1 atm de pressão por 30 minutos. Após a esterilização, foram adicionadas 0,3 g.L<sup>-1</sup> de estreptomicina, com a finalidade de inibir contaminantes de origem bacteriana.

Os meios foram vertidos no dia anterior à repicagem e mantidos em iluminação ultravioleta, para evitar contaminação. Foram utilizadas placas de Petri, com diâmetro de 90 x 15 mm, de material plástico, esterilizadas industrialmente.

As colônias de *P. griseola* foram obtidas de placas previamente repicadas por meio de suspensão de esporos, mantidas em BOD a 24°C por 30 dias, de modo que a superfície do meio estava integralmente ocupada pelo fungo. Foram extraídos discos contendo as colônias do fungo de 0,7 cm de diâmetro, e posteriormente sobrepostos aos meios de cultura. As placas de todos os tratamentos foram fechadas com plástico filme e mantidas em BOD a 24°C, por 20 dias, na ausência de luz (Figura 2).

FIGURA 2 – Discos de colônias de *Pseudocercospora griseola* sobrepostos aos meios de cultura (A); placas lacradas com plástico filme (B). Ponta Grossa, 2022.



Fonte: a autora.

Para todos os meios de cultura, foram realizadas avaliações do crescimento micelial durante 20 dias, por meio da medição diária do diâmetro da colônia do fungo, em dois eixos opostos, com auxílio de régua milimetrada, calculando-se a média para cada repetição. Posteriormente, os valores foram utilizados para cálculo do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) (OLIVEIRA, 1991):

$$IVCM = \sum \frac{(D - Da)}{N}$$

Sendo:

D: diâmetro médio atual da colônia;

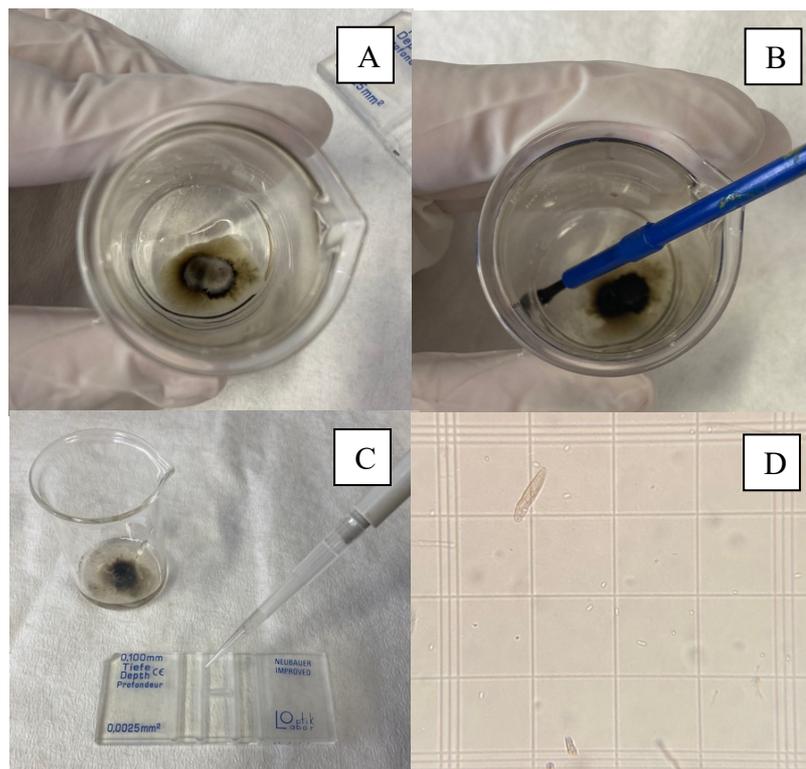
Da: diâmetro médio da colônia no dia anterior;

N: número de dias após a repicagem.

A avaliação da esporulação do fungo foi realizada através da contagem dos esporos com o auxílio de microscópio ótico em câmara de Neubauer. Para cada tratamento, foram coletadas as colônias com auxílio de uma pinça, e transferidas para um béquer contendo 1 mL de água destilada e esterilizada. Com o auxílio de um pincel de cerdas macias, raspou-se a superfície da colônia, para a liberação dos esporos na água. A suspensão de esporos foi transferida com auxílio de uma micropipeta para a câmara de Neubauer, procedendo-se a contagem (MARQUES; MONTEIRO; PEREIRA, 2004) (Figura 3).

O delineamento experimental empregado foi inteiramente aleatorizado, com 12 tratamentos e 10 repetições, cada repetição era composta por uma placa de Petri com o respectivo meio vertido.

FIGURA 3 – Colônia de *Pseudocercospora griseola* em béquer contendo 1 mL de água destilada (A). Raspagem de colônia de *Pseudocercospora griseola* com pincel para liberação dos esporos em água (B). Suspensão de esporos sendo colocada em câmara de Neubauer (C). Imagem de esporo de *Pseudocercospora griseola* em microscópio ótico (objetiva 40x) (D). Ponta Grossa, 2022.



Fonte: a autora.

## 5.2 TESTES *in vitro*

Os testes *in vitro* consistiram em análises do efeito antagônico e produção de compostos voláteis e não voláteis dos fungos endofíticos do gênero *Trichoderma* sobre o crescimento e esporulação do fungo fitopatogênico *P. griseola*.

As colônias do patógeno foram mantidas em placas de Petri, contendo meio de cultura de aveia-ágar e as espécies de *Trichoderma* (Tabela 2) em meio BDA, armazenadas em câmara tipo BOD a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Dentre as espécies utilizadas, *Trichoderma asperellum* (Samuels, Lieckf. & Nirenberg), *Trichoderma endophyticum* (Rocha, Samuels & Chaverri), *Trichoderma harzianum* (Rifai), *Trichoderma lentiforme* ((Rehm) Chaverri, Samuels & Rocha) e *Trichoderma koningiopsis* (Samuels, Suárez & Evans) foram disponibilizadas pela empresa Innova®. Os produtos, em formulação granulada, foram dispostos em placas contendo meio BDA para a germinação dos esporos e posterior obtenção dos discos de colônia.

Já as espécies *Trichoderma tomentosum* (Bissett) e *Trichoderma viride* (Pers.), tiveram isolamento realizado por Pittner (2017), no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO), Campus Guarapuava – PR. Estas espécies foram isoladas das plantas daninhas papuã (*Brachiara plataginea* (Link) Hitchc., *Rumex obtusifolius* L., *Sida rhombifolia* L., e leiteira (*Euphorbia heterophylla* L.), respectivamente.

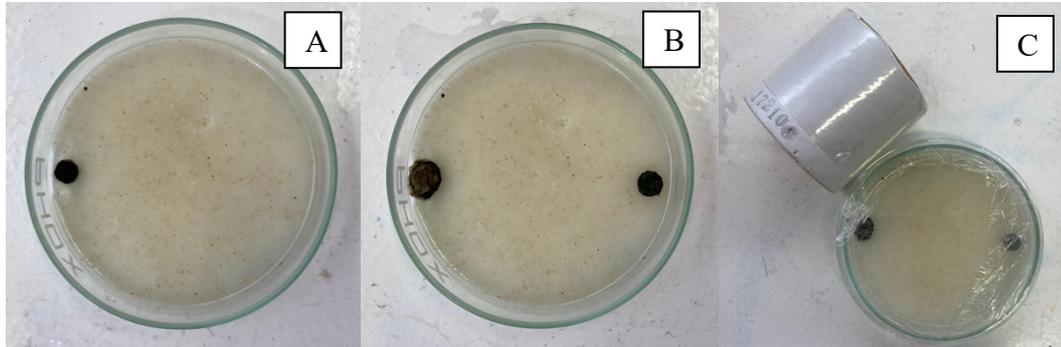
TABELA 2 – Espécies de *Trichoderma* utilizadas na execução dos testes *in vitro* contra *Pseudocercospora griseola*.

Espécie	Composição
<i>Trichoderma asperellum</i>	Conídios
<i>Trichoderma endophyticum</i>	Conídios
<i>Trichoderma harzianum</i>	Conídios
<i>Trichoderma lentiforme</i>	Conídios
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	Conídios
<i>Trichoderma tomentosum</i>	Conídios
<i>Trichoderma viride</i>	Conídios
<i>Pseudocercospora griseola</i> (Controle)	Conídios

Fonte: a autora.

Para o estudo do efeito antagônico utilizou-se a técnica de cultivo pareado em placas de Petri (DENNIS; WEBSTER, 1971). Para tanto, discos de 7 mm de diâmetro de colônias do fungo fitopatogênico foram colocados em placas contendo meio de cultura aveia-ágar. As colônias de *P. griseola* foram previamente submetidas a 10 dias de crescimento sem antagonistas, devido a baixa velocidade de crescimento e a fragilidade das colônias de *P. griseola*. Efetuou-se medições diárias de crescimento das colônias e após o período de crescimento, foram repicados discos de *Trichoderma*, em lado oposto ao patógeno. (Figura 4). Placas contendo somente o patógeno serviram de testemunha.

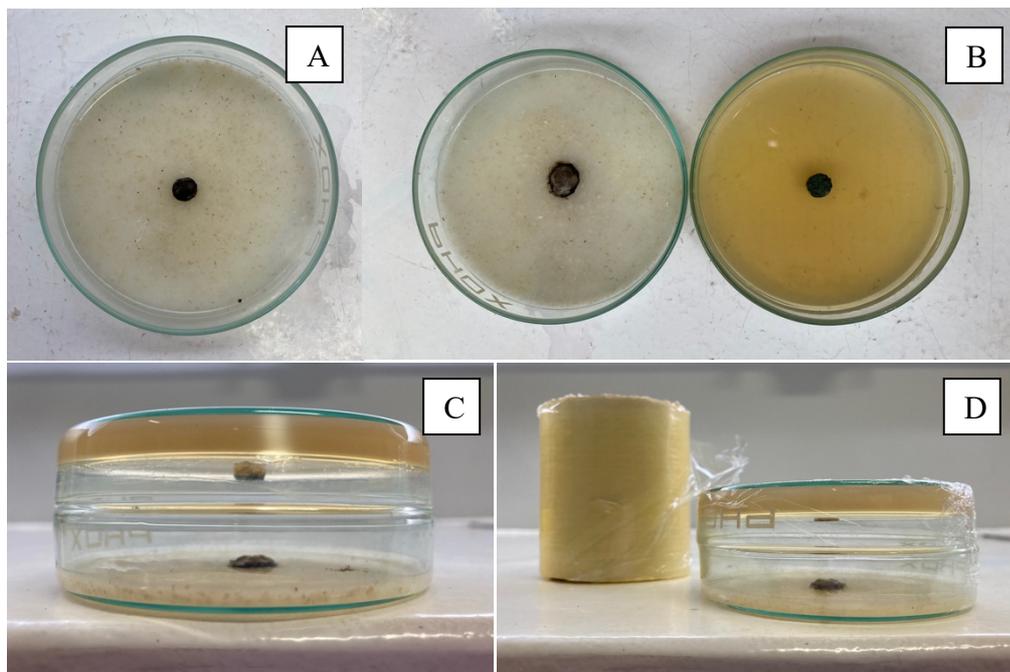
FIGURA 4 – Pré-cultivo de *Pseudocercospora griseola* livre de antagonistas (A). Colônia de *Pseudocercospora griseola* com dez dias de desenvolvimento (à esquerda) e disco de colônia de *Trichoderma lentiforme* (à direita) (B). Placa de cultivo pareado lacrada com plástico filme (C). Ponta Grossa, 2022.



Fonte: a autora.

Para avaliação da produção de metabólitos voláteis foram utilizadas duas placas de Petri, uma contendo meio aveia-ágar e a outra meio BDA (Figura 5). Na placa contendo meio aveia-ágar, colocou-se um disco de cultura do patógeno, o qual permaneceu em crescimento livre de antagonistas por 10 dias. Efetuaram-se as medições de crescimento micelial de forma que se obtivesse a taxa de crescimento prévio ao tratamento.

FIGURA 5 – Pré-cultivo de *Pseudocercospora griseola* livre de antagonistas (A). Colônia de *Pseudocercospora griseola* com dez dias de desenvolvimento em meio aveia ágar (à esquerda) e colônia de *Trichoderma lentiforme* em meio BDA (à direita) (B). Placa contendo o antagonista sobreposto à placa do patógeno (C). Placas sobrepostas lacradas com plástico filme (D). Ponta Grossa, 2022.

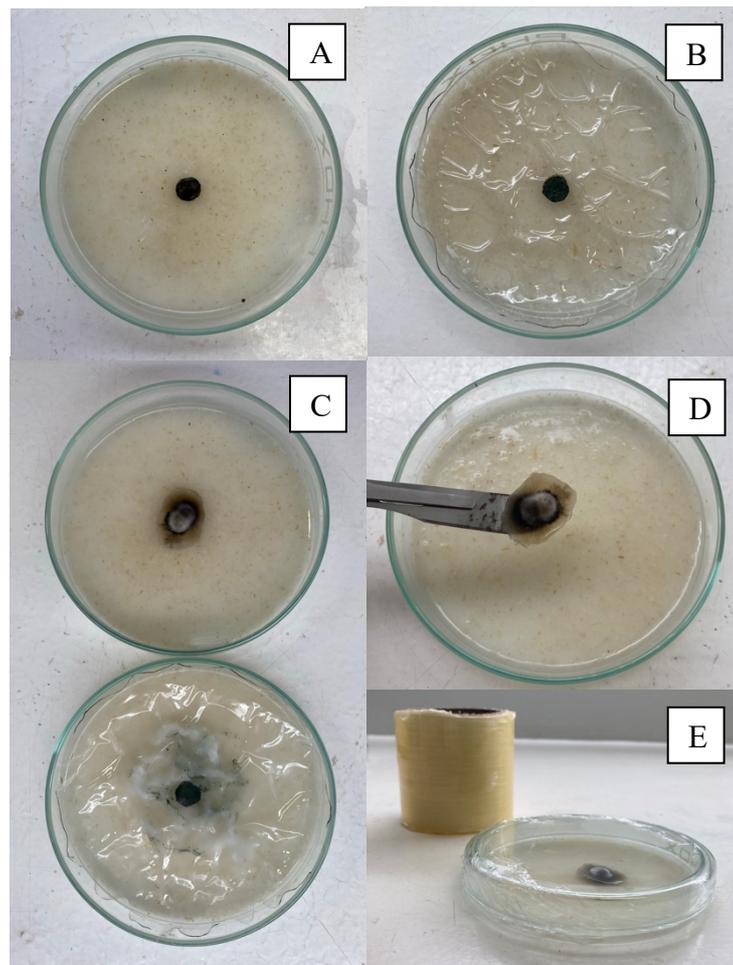


Fonte: a autora.

Após dez dias, nas placas com meio BDA, colocou-se um disco de cultura do antagonista. As placas foram sobrepostas com as placas que continham o patógeno e vedadas com filme plástico (Figura 5). A testemunha consistiu em placas contendo o patógeno sobrepostas com placas contendo somente o meio aveia-ágar (adaptada de DICK; HUTCHINSON, 1962, citados por MARIANO, 1993).

O método do papel celofane (GIBBS, 1967 citado por MARIANO, 1993) foi adaptado e utilizado para avaliar a produção de metabólitos não voláteis pelas espécies de *Trichoderma* (Tabela 2). Discos de colônias de *P. griseola* foram repicados em placas de Petri contendo meio aveia-ágar e mantidas para crescimento livre de tratamentos pelo período de 10 dias (Figura 6).

FIGURA 6 – Pré-cultivo de *Pseudocercospora griseola* livre de antagonistas (A). Colônia de *Trichoderma lentiforme* sobre celofane em placa contendo meio aveia ágar (B). Colônia de *Pseudocercospora griseola* com dez dias de desenvolvimento (acima) e colônia de *Trichoderma lentiforme* com 5 dias de desenvolvimento (abaixo) (C). Transferência da colônia de *Pseudocercospora griseola* para meio contendo metabólitos de *Trichoderma lentiforme* (D). Placas lacradas com plástico filme (E). Ponta Grossa, 2022.



Fonte: a autora.

No quinto dia após a repicagem do patógeno, um disco de colônia do antagonista foi transferido para o centro de outro conjunto de placas de Petri contendo meio aveia-ágar, sobreposto por papel celofane transparente lavado e esterilizado. Após o crescimento do antagonista por cinco dias, o celofane foi retirado da placa e então, foi transferida a colônia do patógeno para o centro da placa. A testemunha consistiu no cultivo do patógeno após a retirada do celofane, sem a prévia sobreposição do antagonista.

Para todos os testes *in vitro*, foi avaliado o crescimento micelial durante 10 dias prévios e sete dias posteriores aos tratamentos, através da medição diária do diâmetro da colônia do fungo *P. griseola*, em dois eixos opostos, com auxílio de régua milimetrada, calculando-se a média para cada repetição. Posteriormente, os valores foram submetidos à fórmula descrita por Oliveira (1991), para cálculo do IVC. O delineamento experimental para o IVC foi inteiramente aleatorizado, com dez tratamentos e dez repetições, considerando-se cada placa de Petri como uma repetição.

Ao fim da execução dos experimentos, as colônias de *P. griseola* foram submetidas à avaliação da esporulação, seguindo a metodologia de contagem em câmara de Neubauer, descrita no item 5.1. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente aleatorizado, com cinco repetições, considerando-se cada placa de Petri como uma repetição.

### 5.3 TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO

Testaram-se sete tratamentos baseados em suspensões de esporos de espécies do gênero *Trichoderma*, um tratamento com indutor de resistência e um com fungicida (Tabela 3). As cultivares de feijão utilizadas foram IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero.

A cultivar IPR-Tuiuiú pertence ao grupo preto, e tem hábito de crescimento indeterminado tipo II, porte ereto e ciclo médio de 89 dias. Essa cultivar é considerada como moderadamente resistente à mancha angular (IAPAR, 2020).

A cultivar IPR-Quero-Quero pertence ao grupo carioca, e tem hábito de crescimento indeterminado, porte semiereto e ciclo médio de 89 dias. Essa cultivar é considerada como moderadamente resistente à mancha angular (IAPAR, 2013).

O experimento ocorreu em casa de vegetação, sob delineamento inteiramente aleatorizado, com quatro repetições. Cada repetição consistiu em dois vasos plásticos, com três litros de capacidade, preenchidos com solo do tipo “terra preta”, nos quais foram semeadas três sementes. Sete dias após a emergência, ocorreu o desbaste das plantas, deixando no vaso apenas

uma planta, com aspecto mais vigoroso. Os experimentos foram repetidos duas vezes, para assegurar a confiabilidade dos resultados.

TABELA 3 – Tratamentos e suas respectivas dosagens, pulverizados em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cultivadas em casa de vegetação e campo para proteção contra mancha angular (*Pseudocercospora griseola*).

Tratamento	Concentração
<i>Trichoderma asperellum</i>	10 <sup>6</sup> conídios mL <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma endophyticum</i>	10 <sup>6</sup> conídios mL <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i>	10 <sup>6</sup> conídios mL <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma lentiforme</i>	10 <sup>6</sup> conídios mL <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	10 <sup>6</sup> conídios mL <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma tomentosum</i>	10 <sup>6</sup> conídios mL <sup>-1</sup>
<i>Trichoderma viride</i>	10 <sup>6</sup> conídios mL <sup>-1</sup>
Acibenzolar-S-metilico (Bion <sup>®</sup> )	25 g ha <sup>-1</sup>
Fungicida - hidróxido de fentina (Mertin <sup>®</sup> )	500 mL ha <sup>-1</sup>
Água destilada e esterilizada (Controle)	-

Fonte: ADAPAR (2021).

As aplicações dos tratamentos foram realizadas com o auxílio de um pulverizador manual, com início no estágio vegetativo V3 (primeiro trifólio desenvolvido) (OLIVEIRA *et al.*, 2018) (Tabela 1). Os respectivos tratamentos foram pulverizados no primeiro trifólio, sendo o segundo trifólio (em desenvolvimento) protegido com um copo plástico, com a finalidade de evitar o contato com o produto aplicado (Figura 7A). Para todos os tratamentos foram aplicados 10 mL por planta da calda contendo o respectivo tratamento dissolvido em água, com exceção da testemunha, na qual foi aplicado apenas água destilada.

Foi realizada a inoculação do patógeno *P. griseola* três dias após a aplicação dos tratamentos por meio de pulverização de suspensão de esporos com auxílio de pulverizador manual. Para a produção da suspensão de inóculo foram utilizadas colônias esporuladas do patógeno em meio de cultura de aveia ágar. Após a inoculação, cobriram-se os vasos com pacotes plásticos transparentes e umedecidos, por 48 horas, a fim de estabelecer uma câmara úmida para desenvolvimento do patógeno (Figura 7B).

Após o aparecimento dos primeiros sintomas da doença nas folhas, foram realizadas avaliações de severidade segundo a escala diagramática proposta por Godoy *et al.* (1996) (Figura 8). Foram realizadas 10 avaliações, que ocorreram com um intervalo de cinco dias, avaliando-se as folhas cotiledonares até o quarto trifólio.

FIGURA 7 – Proteção do segundo trifólio de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) no momento da aplicação dos tratamentos para proteção contra mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) em casa de vegetação (A). Câmara úmida em vasos contendo plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) inoculadas com suspensão de esporos de *Pseudocercospora griseola* (B). Ponta Grossa, 2022.



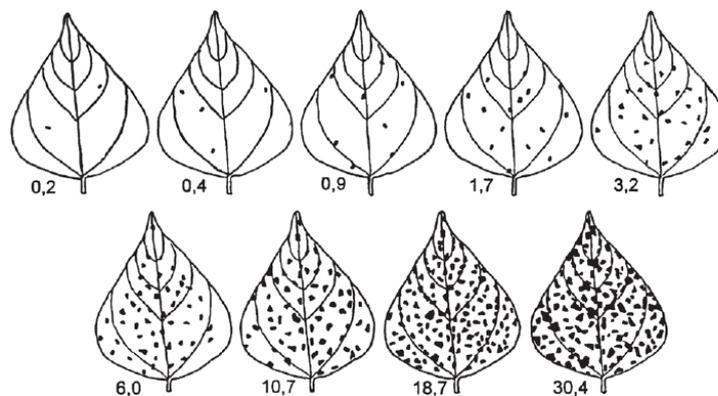
Fonte: Luiz F. Gerlinger.

Com os dados obtidos nas avaliações de severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) pela fórmula proposta por Shaner e Finney (1977):

$$AACPD = \sum_i^{n-1} \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) (t_{i+1} - t_i)$$

na qual,  $n$  é o número de avaliações,  $y$  é a proporção da doença e  $(t_{i+1} - t_i)$  o intervalo de avaliações consecutivas.

FIGURA 8 – Escala diagramática para a avaliação da severidade de mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*).



Fonte: Godoy *et al.* (1997).

## 5.4 TESTES EM CAMPO

O experimento à campo foi realizado em área sob sistema de semeadura direta sobre a palha na Fazenda Escola Capão da Onça (UEPG). O manejo de adubação, controle de daninhas e insetos seguiu as recomendações técnicas da cultura.

As cultivares utilizadas foram IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero. A semeadura foi realizada no dia 09/11/2020, no espaçamento de 0,4 m entre linhas. As parcelas possuíam área total de 15 m<sup>2</sup>, considerados 2 m<sup>2</sup> centrais de área útil para as avaliações e posterior colheita. No dia 16/11/2020 ocorreu a emergência das plântulas. As condições climáticas na região durante o período de execução da pesquisa à campo estão representadas na Figura 9.

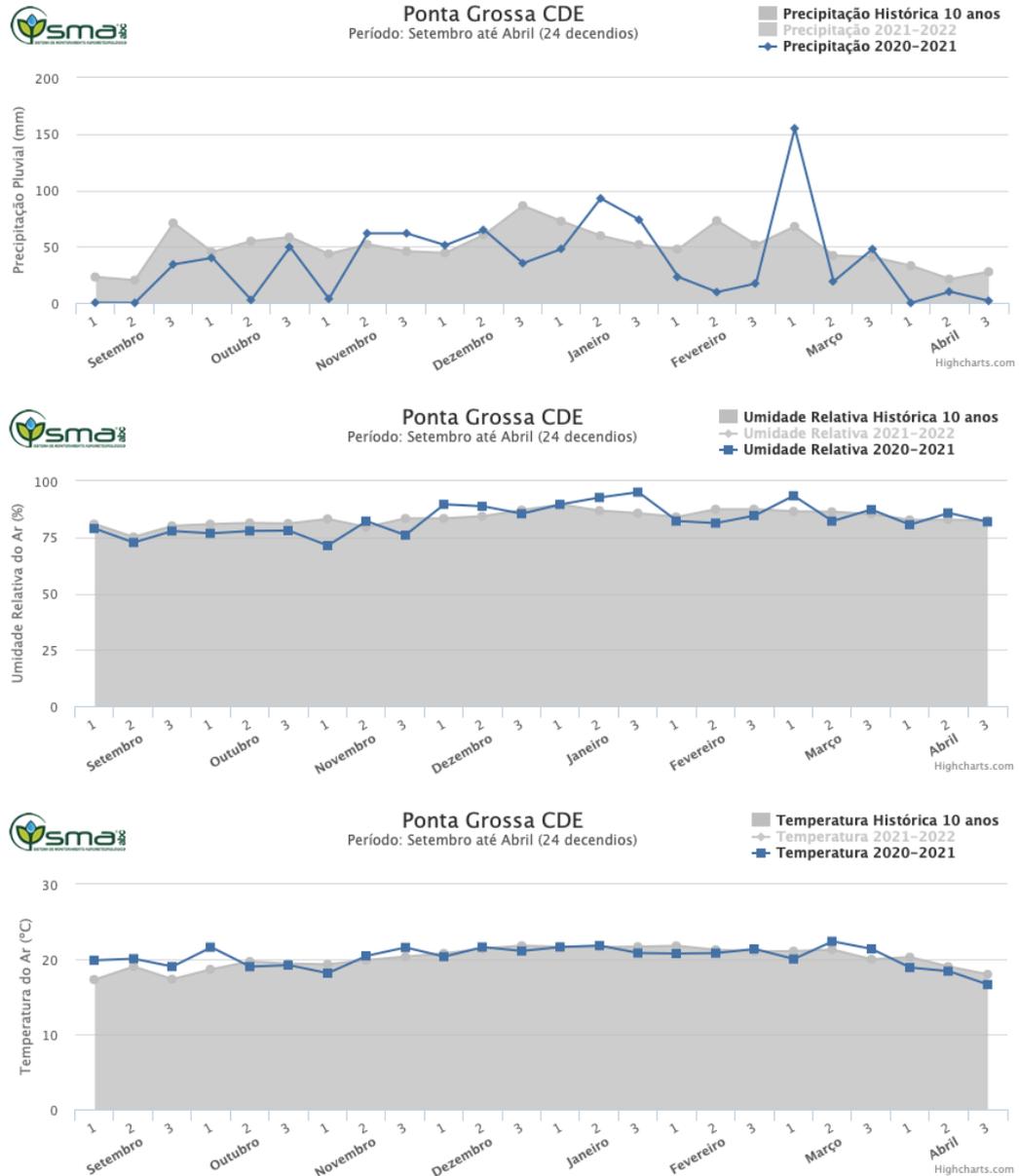
Os tratamentos testados foram os mesmos utilizados em casa de vegetação, ou seja, suspensões de esporos de espécies de *Trichoderma*, um tratamento com o indutor de resistência, Bion<sup>®</sup> (acibenzolar-S-metílico) e um com o fungicida Mertin<sup>®</sup> (hidróxido de fentina) (Tabela 3). Para as variáveis analisadas em campo, o delineamento experimental foi realizado em blocos aleatorizados com 10 tratamentos e quatro repetições.

Para a aplicação dos tratamentos foi utilizado um pulverizador costal pressurizado por CO<sub>2</sub>, com barra de 2,0 m, utilizando volume de calda de 200 L ha<sup>-1</sup>. As pulverizações foram realizadas respeitando-se as condições ideais, com umidade relativa do ar acima de 55%, temperatura abaixo de 30°C e velocidade do vento entre 3,0 e 10,0 km h<sup>-1</sup>.

Foram realizadas quatro aplicações, a primeira no dia 12/12/2020, 26 dias após a emergência (DAE) no estádio V3, a segunda no dia 19/12/2020 (33 DAE, R5), a terceira no dia 26/12/2020 (40 DAE, R6) e a quarta no dia 02/01/2021 (47 DAE, R7). Cinco avaliações de severidade de mancha angular foram feitas a partir do surgimento dos sintomas, aos 36, 43, 50, 57 e 64 DAE, seguindo a escala diagramática proposta por Godoy *et al.* (1996) (Figura 8). Calculou-se para a severidade a variável área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), através da fórmula exposta por Shaner e Finney (1977).

A colheita manual das plantas da área útil das parcelas ocorreu no dia 22 de fevereiro de 2021. Foram determinados todos os componentes de rendimento (população final, vagens por planta, grãos por vagem, massa de mil grãos e produtividade), estimando-se a produtividade a partir dessas variáveis.

FIGURA 9 – Condições climáticas: precipitação (mm), umidade relativa (%) e temperatura (°C) durante a condução do experimento com a cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris*) para proteção contra a mancha angular (*Pseudocercospora griseola*). Ponta Grossa – PR.



Fonte: Fundação ABC (2022).

## 5.5 ANÁLISE ENZIMÁTICA

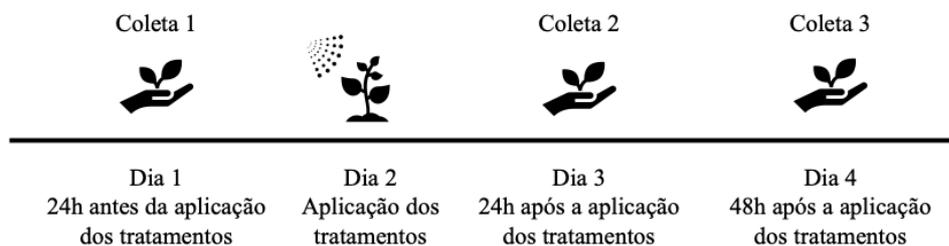
Buscando-se a comprovação da indução de resistência proporcionada pelos produtos, foram realizadas análises enzimáticas, de acordo com as propostas por Lusso e Pascholati (1999) e Duangmail e Apenten (1999).

Vasos plásticos, com doze litros de capacidade e acondicionados em casa de vegetação, foram preenchidos com substrato e em seguida semeadas 30 sementes de feijão das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero. Após a emergência, foram selecionadas as plantas mais vigorosas, de modo que restassem nos vasos a quantidade de repetições necessárias para as coletas.

O experimento teve delineamento inteiramente aleatorizado, com quatro repetições. Cada repetição consistia em uma planta coletada por tempo após a aplicação dos tratamentos (Figura 10).

Os tratamentos foram aplicados com o auxílio de um pulverizador manual, cujas aplicações foram feitas no estágio vegetativo V3 (primeiro trifólio desenvolvido). Foram aplicados 10 mL por planta de calda contendo o respectivo tratamento (Tabela 3.) dissolvido em água, exceto na testemunha, na qual foi aplicado apenas água destilada.

FIGURA 10 – Esquema de execução do experimento visando a coleta de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) para análise enzimática.



Fonte: a autora.

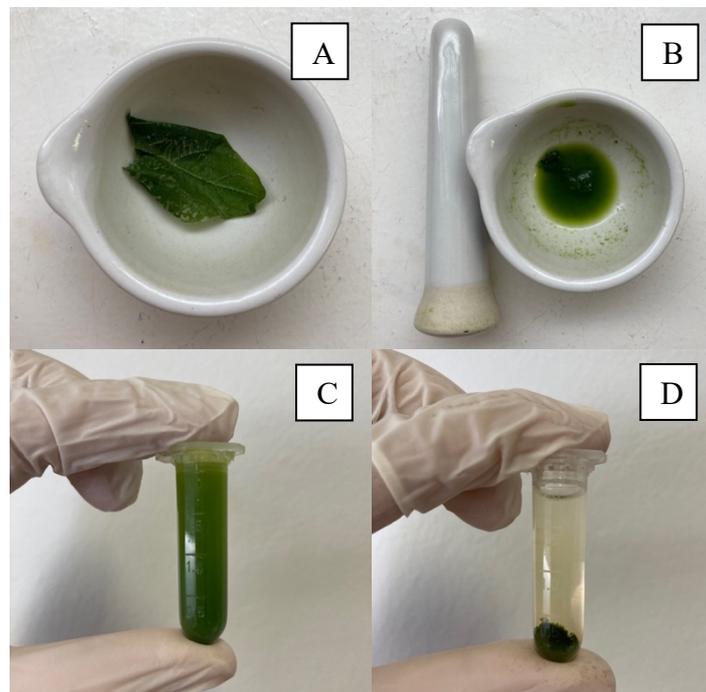
Em todas as coletas, as plantas foram destacadas e congeladas instantaneamente em nitrogênio líquido. Após o congelamento, foram colocadas em embalagem plástica, identificadas e mantidas em freezer até a preparação dos extratos proteicos (Item 5.5.1).

### 5.5.1 Obtenção dos extratos proteicos

Para a obtenção dos extratos proteicos, 0,5 g de folhas das plantas coletadas foram maceradas em 4 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), com auxílio de almofariz e pistilo. O homogenato foi centrifugado a 20.000g durante 25 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante obtido considerado como extrato proteico (Figura 11).

O delineamento experimental empregado foi inteiramente aleatorizado, com 10 tratamentos e quatro repetições. Cada repetição consistia no extrato preparado a partir de folhas de cada planta coletada em casa de vegetação.

FIGURA 11 – Folha de feijão (*Phaseolus vulgaris*) mantida à 4°C (A). Folha macerada em tampão acetato de sódio (B). Homogenato de folhas maceradas em microtubo tipo Eppendorf® (C). Homogenato após centrifugação (D). Ponta Grossa, 2022.



Fonte: a autora.

### 5.5.2 Atividade de Peroxidase

A atividade da peroxidase foi determinada a partir da mistura de 0,10 mL do extrato proteico e 2,9 mL de solução de guaiacol [250  $\mu$ L de guaiacol + 306  $\mu$ L de peróxido de hidrogênio + 100 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0)], à temperatura de 30°C. A quantificação se deu através do método espectrofotométrico direto, pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (LUSSO; PASCHOLATI, 1999).

A atividade da peroxidase foi expressa como atividade específica (unidades de absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína).

### 5.5.3 Atividade de Polifenoloxidase

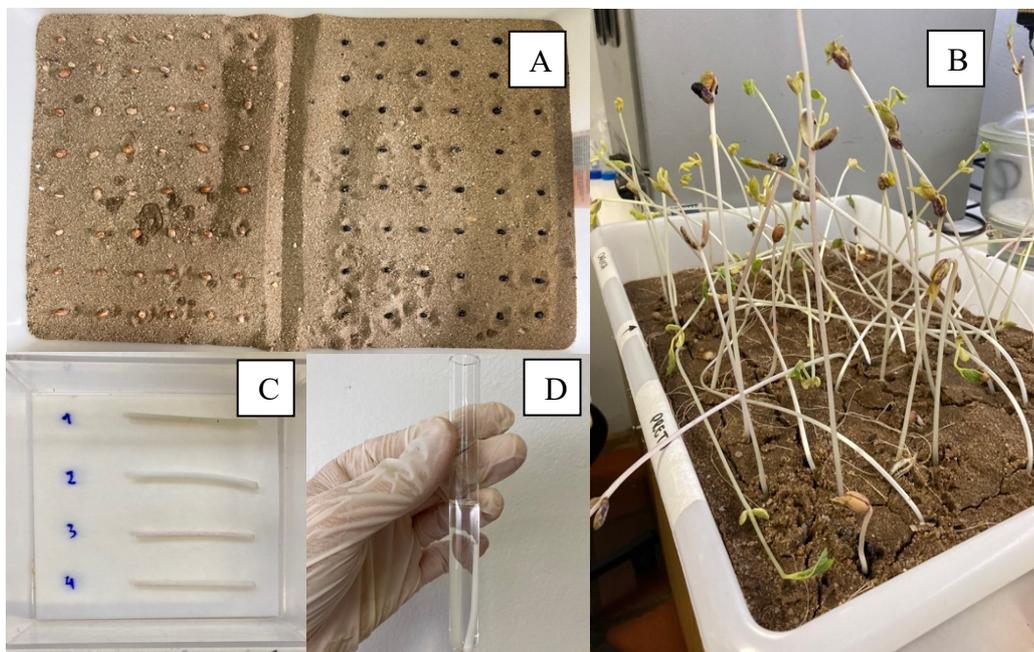
A atividade da polifenoloxidase foi determinada a partir da mistura de 100  $\mu$ L do extrato proteico com 900  $\mu$ L do substrato [0,1101 g de catecol (20 mM) + 50 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8)], à temperatura de 30°C.

A quantificação foi realizada em espectrofotômetro, a 420 nm, fazendo-se 2 leituras de forma direta no período de dois minutos. O diferencial entre a última e a primeira leitura foi utilizado para a determinação da atividade da enzima. Os resultados foram expressos em absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína (DUANGMAIL; APENTEN, 1999).

#### 5.5.4 Atividade de Faseolina

Foi realizada também, a quantificação da fitoalexina faseolina, conforme metodologia proposta por Dixon *et al.* (1983) e adaptada por Solino *et al.* (2017). Para essa quantificação, as sementes de feijão foram desinfetadas em hipoclorito de sódio por cinco minutos, em seguida lavadas com água esterilizada e semeadas em bandejas com areia esterilizada. As bandejas com as sementes plantadas foram mantidas em câmara climatizada com temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , na ausência de luz (Figura 12).

FIGURA 12 – Semeadura de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) IPR-Quero-Quero e IPR-Tuiuiú em bandeja contendo areia esterilizada (A); plântulas emergidas em câmara para estiolamento dos hipocótilos (B); segmentos de hipocótilos estiolados em gerbox para aplicação dos tratamentos (C). Tubo de ensaio contendo etanol e o hipocótilo segmentado (D).



Fonte: a autora.

Após sete dias, os hipocótilos estiolados das plantas foram retirados e lavados em água esterilizada (Figura 12B). Os hipocótilos foram divididos em quatro segmentos, os quais foram pesados e colocados em gerbox com papel filtro umedecido (Figura 12C). Os tratamentos foram pulverizados sobre os segmentos e os gerbox mantidos em BOD a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , no escuro.

Após 48h, os hipocótilos foram transferidos para tubos com 10 mL de etanol e acondicionados a  $4^{\circ}\text{C}$  por mais 48 horas (Figura 12D). Após, os tubos foram agitados agitador orbital a 200 rpm por uma hora para a extração da faseolina. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro a 280 nm e os resultados expressos como unidades de absorvância por grama de peso fresco ( $\text{ABS g pf}^{-1}$ ).

O delineamento experimental para a extração de faseolina foi inteiramente aleatorizado, com quatro repetições. Cada repetição consistia em um hipocótilo segmentado em quatro partes.

## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados encontrados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância, com o software SAS-Studio, versão livre, 2020.

Todas as pressuposições para análise de variância, como homogeneidade de variâncias, normalidade dos resíduos, presença de pontos discrepantes, independência dos resíduos e aditividade do modelo foram verificadas, utilizando-se o método de transformação potência ótima de Box-Cox (BOX; COX, 1964) para resolver alguma pressuposição não atendida.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 TESTES PRELIMINARES

Foram realizadas medições diárias do diâmetro da colônia dos fungos durante 20 dias, procedendo-se os cálculos de Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) e a esporulação de *P. griseola* em diferentes meios de cultura (Tabela 4.).

TABELA 4 – Índices de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de colônias de *Pseudocercospora griseola* em diferentes meios de cultura. Ponta Grossa – PR, 2021.

Tratamento	$\Sigma$ IVCM	Esporos (nº de esporos mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )
BA – Batata + ágar	0,057c*	2,7de
BDA – Batata +dextrose + ágar	0,081c	5,2cd
ST – Suco de tomate	0,068bc	7,2c
ET – Extrato de tomate	0,069bc	3,0de
AI – Alimento infantil	0,060c	3,6de
FFA – Extrato de folhas de feijão + ágar	0,071bc	11,5a
FFD – Extrato de folhas de feijão + ágar + dextrose	0,066bc	8,2bc
V8 – Suco de vegetais V8	0,061c	2,0e
AA – Aveia + ágar	0,068bc	10,6ab
AD – Aveia + ágar + dextrose	0,106b	7,06c
BAG – Banana + ágar	0,151a	3,4de
CZ – Czapek + ágar	0,073bc	2,5de
Coeficiente de variação	28,84%	25,99%

\*Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: a autora.

Com relação aos IVCMs diários, o meio BAG teve a maior somatória de índices, diferenciando-se do meio AD, o qual diferenciou-se dos meios BA, BDA, AI e V8.

O meio BAG foi o que proporcionou maior velocidade de crescimento das colônias de *P. griseola*, o que pode ter sido influenciado pelos altos índices de nutrientes presentes no mesmo. Cano *et al.* (2020) obtiveram resultados semelhantes, nos quais o tratamento composto por ágar+banana obteve as melhores médias no crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

No entanto, considerando-se que a formação do inóculo se dá com a germinação de esporos, considera-se que esporulação maior favoreça potencial de desenvolvimento de colônias, uma vez que os esporos são as estruturas de penetração nos tecidos das plantas (RIBEIRO, 1991). Realizou-se então a contagem de esporos das colônias de *P. griseola* submetidas a crescimento em diferentes meios.

O meio FFA foi o que mais estimulou a esporulação do patógeno, diferenciando-se dos demais e seguido pelo meio AA. Silveira (1967), utilizando meio contendo extrato de folhas de

feijão+dextrose e Dias Neto (2010), com meio ágar+aveia+dextrose, obtiveram também altas taxas de esporulação.

No presente teste, no entanto, a retirada experimental da dextrose na composição dos meios de aveia e extrato de folhas de feijão, favoreceu a esporulação. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que a indisponibilidade de compostos carbônicos como a dextrose, influencia a síntese enzimática nos fungos (MARZLUF *et al.*, 1997). Esta, levaria a um estresse metabólico que pode levar ao favorecimento das atividades reprodutivas como alternativa à sobrevivência e disseminação do patógeno (GOES, 2017).

Em seguida, estão os meios FFD, AD e ST (Tabela 4). O meio ST também apresentou menor esporulação quando comparado aos meios FFA e AA. O resultado obtido não corrobora com os valores encontrados por Dalla Pria; Bergamin Filho e Amorim (1997), nos quais o meio contendo suco de tomate foi o que melhor favoreceu a esporulação de *P. griseola*.

O meio BDA, utilizado comumente em repicagens de fungos, também apresentou menor esporulação em relação aos meios FFA e AA (Tabela 4). Por fim, os meios BA, ET, AI, V8, BAG e CZ foram os que menos estimularam a produção de esporos nas colônias.

Logo, visando a obtenção de inóculo para execução de experimentos dessa pesquisa, observou-se que os meios FFA e AA são os ideais, uma vez que possibilitaram maior produção de esporos. No entanto, devido à dificuldade de obtenção de folhas de feijão saudáveis e não tratadas com defensivos, e considerando-se também sua disponibilidade sazonal, optou-se pela utilização do meio AA na execução dos experimentos dessa pesquisa.

## 6.2 TESTES *in vitro*

Nos testes *in vitro*, avaliaram-se o efeito antagônico pelo crescimento ou produção de compostos voláteis e não voláteis dos fungos do gênero *Trichoderma* sobre o IVCM e esporulação do fungo fitopatogênico *P. griseola*.

Realizaram-se 17 dias de avaliações para os três experimentos, dentre os quais, 10 dias foram reservados ao crescimento do patógeno sem a exposição aos tratamentos. No décimo dia, expuseram-se as colônias do patógeno aos tratamentos, procedendo-se então os sete dias finais de avaliações.

No primeiro experimento, avaliou-se o efeito antagônico das espécies de *Trichoderma*, no teste de culturas pareadas ao fungo *P. griseola*, obtiveram-se as médias de IVCM e esporulação (Tabela 5). Com relação ao IVCM para os dias anteriores à repicagem dos tratamentos (Tabela 5), não se obteve diferenciação estatística, resultado esse esperado, uma vez que as colônias de *P. griseola* cresceram livres de antagonismos nesse período. O

tratamento controle, caracterizado por colônias de *P. griseola* não expostas a nenhum tratamento, diferenciou-se estatisticamente dos demais nos índices de IVCM total, IVCM após tratamento e na esporulação.

TABELA 5 – Índices de crescimento micelial (IVCM) e esporulação de colônias de *Pseudocercospora griseola* submetidas ao crescimento pareado com fungos do gênero *Trichoderma*. Ponta Grossa – PR, 2021.

Tratamento	$\Sigma$ IVCM pré tratamento <sup>1</sup>	$\Sigma$ IVCM pós tratamento <sup>2</sup>	IVCM total <sup>3</sup>	Esporos (nº de esporos mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )
<i>Trichoderma asperellum</i>	0,092ns	0,021b*	0,114b	0,6b
<i>Trichoderma endophyticum</i>	0,101	0,029b	0,130b	0,6b
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,096	0,024b	0,120b	0,3b
<i>Trichoderma lentiforme</i>	0,099	0,028b	0,127b	0,9b
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	0,104	0,022b	0,126b	0,3b
<i>Trichoderma tomentosum</i>	0,104	0,021b	0,125b	1,1b
<i>Trichoderma viride</i>	0,102	0,019b	0,121b	0,9b
<i>Pseudocercospora griseola</i> (Controle)	0,112	0,093a	0,205a	14,5a
Coeficiente de variação	14,13%	27,29%	12,88%	24,31%

<sup>1</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 10 dias anteriores à repicagem dos tratamentos; <sup>2</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 7 dias posteriores à repicagem dos tratamentos; <sup>3</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 17 dias de avaliação; ns: não significativo; \* Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: a autora.

Analisando-se o IVCM pós tratamento (Tabela 5), constatou-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos contendo o antagonista. Tal resultado demonstra que as espécies de *Trichoderma* do presente estudo tiveram potencial de controle sobre o patógeno quando em cultivo pareado, uma vez que ocuparam toda a superfície do meio, além de terem iniciado o crescimento sobre as colônias de *P. griseola*.

Os estudos realizados *in vitro* são a primeira etapa na avaliação do potencial de biocontrole promovido por uma espécie antagonista, como os fungos do gênero *Trichoderma* (MBARGA *et al.*, 2012). Nessa pesquisa, pode-se atribuir aos tratamentos a redução do crescimento das colônias de *P. griseola*, uma vez que a ocupação da placa pelo crescimento das espécies de *Trichoderma* pode ter levado à uma competição por espaço e nutrientes e/ou micoparasitismo (ATANASOVA *et al.*, 2013).

Em pesquisa realizada *in vitro*, para verificar o controle de espécies do gênero *Trichoderma* sobre o crescimento e esporulação de *Colletotrichum truncatum*, Farias; Cruz; Duarte (2020) também tiveram resultados positivos quanto ao controle do patógeno. Suas espécies dispostas no cultivo pareado com o patógeno cresceram sobre o mesmo e cobriram integralmente a superfície do meio.

O controle *in vitro* de espécies de *Trichoderma* sobre patógenos também foi positivo em estudos realizados por Christmann *et al.* (2019) e Barbosa *et al.* (2021), atuando como agente

antagonista às espécies *Colletotrichum lindemuthianum* e *Colletotrichum musae*, respectivamente. Concluiu-se que o gênero *Trichoderma* possui potencial de biocontrole sobre várias espécies fitopatogênicas, e também ao fungo *P. griseola* de acordo com os resultados demonstrados.

Buscando verificar se as espécies do gênero *Trichoderma* possuíam a capacidade de produzir metabólitos voláteis capazes de interferir no crescimento e esporulação das colônias de *P. griseola*, realizou-se um segundo experimento, sobrepondo as colônias do patógeno aos tratamentos. Calcularam-se os índices de crescimento totais, antes e após os tratamentos e se procedeu a contagem de esporos (Tabela 6).

TABELA 6 – Índices de crescimento micelial e esporulação de colônias de *Pseudocercospora griseola* submetidas a metabólitos voláteis de fungos do gênero *Trichoderma*. Ponta Grossa – PR, 2021.

Tratamento	$\Sigma$ IVCM pré tratamento <sup>1</sup>	$\Sigma$ IVCM pós tratamento <sup>2</sup>	$\Sigma$ IVCM <sup>3</sup>	Esporos (nº de esporos mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )
<i>Trichoderma asperellum</i>	0,152 <sup>ns</sup>	0,019c*	0,171b	0,6b
<i>Trichoderma endophyticum</i>	0,135	0,020bc	0,156b	0,4b
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,146	0,025bc	0,172b	0,4b
<i>Trichoderma lentiforme</i>	0,146	0,029b	0,175b	0,6b
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	0,145	0,028bc	0,173b	0,8b
<i>Trichoderma tomentosum</i>	0,106	0,028bc	0,174b	0,9b
<i>Trichoderma viride</i>	0,132	0,028bc	0,160b	0,9b
<i>Pseudocercospora griseola</i> (Controle)	0,144	0,072a	0,216a	11,5a
Coefficiente de variação	15,58%	20,75%	13,47%	32,78%

<sup>1</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 10 dias anteriores à repicagem dos tratamentos; <sup>2</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 7 dias posteriores à repicagem dos tratamentos; <sup>3</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 17 dias de avaliação; ns: não significativo; \* Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: a autora.

Novamente, as colônias livres da exposição aos tratamentos tiveram IVCM semelhantes estatisticamente (Tabela 6). Após a repicagem dos antagonistas, no entanto, as colônias do patógeno expostas aos metabólitos dos fungos do gênero *Trichoderma* tiveram IVCM inferiores ao tratamento controle.

No IVCM calculado para os sete dias após tratamento (Tabela 6), observou-se ainda que o tratamento composto por *T. asperellum* foi o que mais reduziu o crescimento das colônias do patógeno quando comparado ao tratamento controle. Avaliando o biocontrole de *T. asperellum* sobre *Pythium myriotylum*, Mbarga *et al.* (2012) também observaram a inibição do crescimento micelial do patógeno submetido aos metabólitos do antagonista.

Os autores Barbosa *et al.* (2021), Farias; Cruz; Duarte (2020) e Gabardo *et al.* (2020b) também avaliaram o crescimento dos patógenos *C. musae*, *C. truncatum* e *Sclerotium rofsii*, respectivamente, submetidos aos metabólitos voláteis produzidos por espécies de *Trichoderma*.

Todos tiveram resultados positivos quanto à inibição do crescimento dos patógenos, concluindo que este produz metabólitos difusíveis e possuem ação antifúngica sobre os patógenos testados.

Os metabólitos voláteis produzidos por fungos do gênero *Trichoderma* são substâncias com compostos capazes de degradar a parede celular de fungos e reduzir seu metabolismo (MUKHERJEE; HORWITZ; KENERLEY, 2012). Patógenos submetidos a esses metabólitos, como *C. lindemuthianum*, tem seu crescimento inibido em até 78%, comprovando a ação antifúngica destes (CHRISTMANN *et al.*, 2019).

Com o objetivo de verificar se os fungos do gênero *Trichoderma* produzem compostos não voláteis com capacidade de reduzir o crescimento e a esporulação das colônias de *P. griseola*, realizou-se o terceiro experimento (Tabela 7).

TABELA 7 – Índices de crescimento micelial e esporulação de colônias de *Pseudocercospora griseola* submetidas a metabólitos não voláteis de fungos do gênero *Trichoderma*. Ponta Grossa – PR, 2021.

Tratamento	$\Sigma$ IVCM pré tratamento <sup>1</sup>	$\Sigma$ IVCM pós tratamento <sup>2</sup>	$\Sigma$ IVCM <sup>3</sup>	Esporos (nº de esporos mL <sup>-1</sup> x 10 <sup>6</sup> )
<i>Trichoderma asperellum</i>	0,089 <sup>ns</sup>	0,002b*	0,119b	3,6b
<i>Trichoderma endophyticum</i>	0,091	0,031b	0,123b	3,5b
<i>Trichoderma harzianum</i>	0,086	0,030b	0,117b	5,1b
<i>Trichoderma lentiforme</i>	0,087	0,038b	0,125b	3,5b
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	0,085	0,030b	0,115b	3,6b
<i>Trichoderma tomentosum</i>	0,096	0,021b	0,118b	4,4b
<i>Trichoderma viride</i>	0,093	0,018b	0,112b	3,5b
<i>Pseudocercospora griseola</i> (Controle)	0,099	0,092a	0,192a	14,4a
Coefficiente de variação	16,02%	30,55%	13,80%	28,86%

<sup>1</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 10 dias anteriores à repicagem nas placas contendo os metabólitos dos tratamentos; <sup>2</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 7 dias após a repicagem nas placas contendo os metabólitos dos tratamentos; <sup>3</sup>  $\Sigma$  IVCM para os 17 dias de avaliação; ns: não significativo; \* Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: a autora.

Nos dez dias prévios à exposição aos tratamentos (Tabela 7), as colônias do patógeno cresceram livremente em placas sem os antagonistas e tiveram IVCMs semelhantes estatisticamente entre si, assim como nos outros dois experimentos realizados.

Após a retirada do celofane contendo os antagonistas, repicou-se as colônias do patógeno e então prosseguiram-se as medições. Comparados à testemunha, todos os tratamentos foram eficazes em produzir compostos não voláteis capazes de reduzir os índices de crescimento do patógeno (Tabela 7). No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos compostos por *Trichoderma* para a variável IVCM (Tabela 7).

Por se tratar de uma barreira semipermeável, os exsudatos produzidos pelos antagonistas crescidos em papel celofane podem ter sido difundidos no meio de cultura e então entrar em contato com as colônias do patógeno. Gliotoxina e viridina são alguns dos metabólitos

produzidos, e têm ação antifúngica, levando à redução no crescimento micelial de fungos (WEIDLING, 1964), assim como o observado nessa pesquisa.

Avaliando o potencial de metabólitos produzidos na metodologia do papel celofane por espécies de *Trichoderma*, Degani e Dor (2021) observaram resultados que corroboram com os obtidos na pesquisa. Os metabólitos secretados no meio de cultura foram eficientes em reduzir o crescimento micelial de *Magnaportheopsis maydis*.

De acordo com Gabardo *et al.* (2020b), em pesquisa avaliando o antagonismo de *T. asperellum* e *Bacillus subtilis* a fungos fitopatogênicos, o fungo antagonista teve potencial de controle sobre *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum dematium* var *truncata*. Essa avaliação ocorreu pelo método de produção de metabólitos tóxicos com o uso de papel celofane, assim como o método utilizado na execução do presente experimento.

Utilizando também o método do papel celofane, Christmann (2019) também obteve resultados positivos quanto à redução do crescimento de *C. lindemuntianum* exposto à metabólitos produzidos por *T. viride* e *T. tomentosum*.

De um modo geral, nos três experimentos *in vitro*, o método de crescimento pareado, a produção de metabólitos voláteis e não voláteis, as espécies de *Trichoderma* foram capazes de reduzir significativamente os índices de crescimento de *P. griseola*. As testemunhas, ou seja, o patógeno sem a adição de antagonistas, tiveram crescimento positivo e ascendente durante os dias avaliados.

A esporulação das colônias de *P. griseola* também foi comprometida com o antagonismo e metabólitos voláteis e não voláteis produzidos pelos tratamentos (Tabela 7). As espécies de *Trichoderma* avaliadas reduziram a produção de esporos em relação ao tratamento controle em valores a partir de 92%.

Quanto à contagem de esporos após o contato das colônias aos metabólitos voláteis produzidos pelas espécies de *Trichoderma*, houve reduções a partir de 94% quando comparadas ao tratamento controle (Tabela 7) . Por fim, para a contagem em colônias submetidas aos metabólitos não voláteis secretados pelas espécies de *Trichoderma*, a redução em relação ao tratamento controle ocorreu em níveis a partir de 75%.

A esporulação do patógeno teve redução significativa nos três experimentos realizados quando exposta às espécies de antagonista e seus metabólitos. Dessa forma, concluiu-se que os fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de reduzir a esporulação do fungo *P. griseola* em condições *in vitro*.

Com relação a quantificação da esporulação de *C. truncatum* exposto à *Trichoderma* spp *in vitro*, Farias; Cruz; Duarte (2020) tiveram resultados semelhantes. O antagonismo de

*Trichoderma* spp e a produção de metabólitos pelas espécies apresentou efeito positivo na redução de esporos pelas colônias dos patógenos.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são aptos ao biocontrole de *P. griseola* através da redução do crescimento e esporulação das colônias do patógeno pela utilização de espaço e nutrientes e produção de metabólitos voláteis e não voláteis em condições *in vitro*. Tais resultados são importantes para a continuidade da pesquisa, uma vez que demonstram potencial de controle do patógeno e viabilizam a continuidade dos estudos para condições de casa de vegetação e campo.

### 6.3 TESTES EM CASA DE VEGETAÇÃO

Com objetivo de avaliar o potencial de controle dos tratamentos em plantas de feijão inoculadas com *P. griseola*, realizaram-se aplicações foliares dos produtos em condições de casa de vegetação. Utilizaram-se duas cultivares de feijão, IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, e os experimentos foram repetidos duas vezes em momentos distintos, em outubro de 2021 e janeiro de 2022.

Com a severidade obtida nas avaliações, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (Tabela 8). A severidade da mancha angular foi maior no experimento realizado em outubro (1ª repetição) do que no segundo experimento de janeiro (2ª repetição), para as duas cultivares (Tabela 8). Esse resultado pode ser explicado pela condição térmica durante esse período, potencializadas pelas condições internas da casa de vegetação, como a circulação de ar deficitária, que favorecia temperaturas ainda mais altas internamente.

Sabe-se que o desenvolvimento da mancha angular ocorre principalmente em temperatura média de 24°C e condições de alternância entre períodos secos e úmidos (WENDLAND *et al.*, 2016). As altas temperaturas e os turnos de irrigação frequentes podem ter desfavorecido o desenvolvimento da mancha angular no 2º experimento.

De acordo com as AACPD obtidos na primeira repetição do experimento (Tabela 8), para a cultivar IPR-Tuiuiú, os tratamentos contendo *Trichoderma* não diferiram estatisticamente entre si.

Assunção *et al.* (2020) estudaram o potencial de controle de produtos alternativos, dentre eles espécies de *Trichoderma* e ASM, sobre a antracnose do feijão. Para a cultivar IPR-Tuiuiú, os autores não observaram diferença estatística entre o tratamento controle e os produtos alternativos para a variável AACPD. Na primeira repetição desta pesquisa, no entanto, o tratamento contendo *T. endophyticum* apresentou diferença estatística quando comparado ao controle.

TABELA 8 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivadas em casa de vegetação. Ponta Grossa – PR, 2022.

Tratamento	IPR-Tuiuiú		IPR-Quero-Quero	
	1ª Repetição	2ª Repetição	1ª Repetição	2ª Repetição
<i>Trichoderma asperellum</i>	22,30ab*	1,34ab	10,21 <sup>ns</sup>	1,47 <sup>ns</sup>
<i>Trichoderma endophyticum</i>	28,79a	1,48ab	10,17	1,11
<i>Trichoderma harzianum</i>	22,87ab	1,02ab	4,60	1,10
<i>Trichoderma lentiforme</i>	22,68ab	1,27ab	6,67	1,29
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	18,61ab	0,80ab	6,85	0,82
<i>Trichoderma tomentosum</i>	20,70ab	0,77b	6,90	1,07
<i>Trichoderma viride</i>	17,09ab	0,86b	12,01	1,03
Acibenzolar-S-metilico (Bion®)	14,24ab	0,83b	10,20	1,31
Fungicida - hidróxido de fentina (Mertin®)	20,13ab	1,02ab	7,44	1,05
Água destilada e esterilizada (Controle)	9,89b	1,76a	7,17	1,49
Coefficiente de variação	33,36%	28,14%	39,19%	32,03%

\* Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância; ns: não significativo. Fonte: a autora.

Christmann *et al.* (2019) também avaliando a AACPD para a antracnose na cultura do feijão e utilizando tratamentos de suspensões de esporos de *Trichoderma*, ASM, ácido salicílico e fungicida azoxistrobina+difenoconazole, não obtiveram redução da doença quando comparados à testemunha na primeira repetição do experimento. O mesmo pôde ser observado nos resultados da primeira repetição para a cultivar IPR-Quero-Quero.

Os tratamentos compostos por *T. tomentosum*, *T. viride* e ASM diferiram-se estatisticamente da testemunha, promovendo melhor controle da mancha angular (Tabela 8). O resultado obtido é semelhante aos obtidos por Christmann *et al.* (2019), no qual, na segunda repetição, os tratamentos foram eficientes em reduzir a severidade da antracnose, tendo destaque *T. viride* e *T. tomentosum*, os quais diferiram do controle, do fungicida e do ASM.

Para a cultivar IPR-Quero-Quero (Tabela 8), não houve diferença estatística da AACPD com a aplicação tratamentos e a testemunha em nenhuma das repetições dos experimentos. Assunção *et al.* (2020) também não tiveram diferença estatística entre os tratamentos baseados em *Trichoderma*, ASM fungicida e a testemunha, corroborando os resultados observados.

Utilizando *T. asperellum* como biocontrole para *Ralstonia solanacearum* em batata, Mohamed *et al.* (2020) observaram redução na severidade da doença em condições de casa de vegetação. Logo, pode-se considerar que os tratamentos com esporos de fungos do gênero *Trichoderma* e ASM têm potencial de controle de doenças em condições de casa de vegetação.

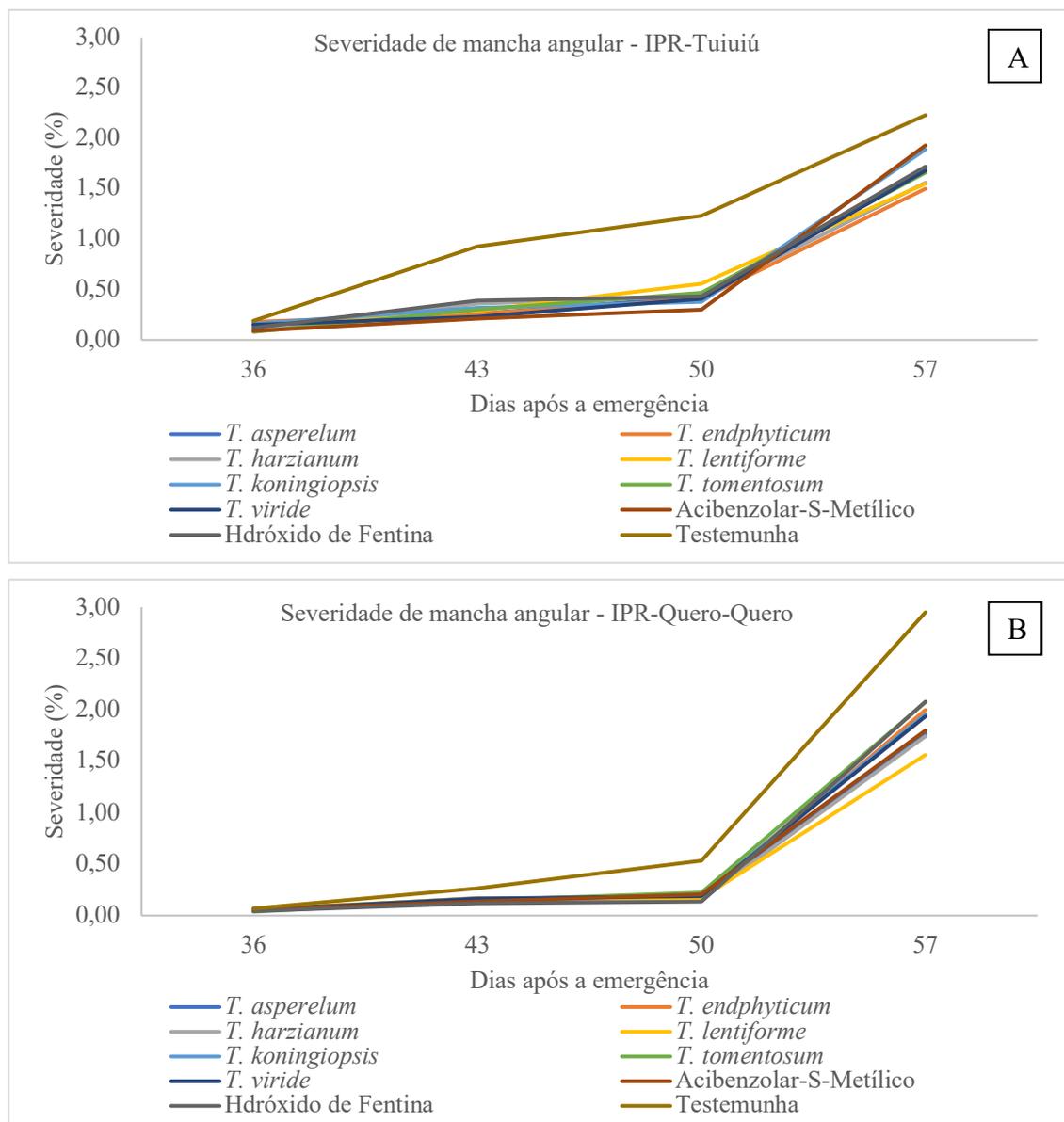
Os tratamentos alternativos utilizados em condições de casa de vegetação foram capazes de reduzir a severidade de mancha angular quando comparados à testemunha, e não diferiram do tratamento químico com fungicida. Tais tratamentos podem, portanto, serem testados em

condições de campo e comparados a outros fungicidas, de modo que possam se tornar um substituto economicamente e ambientalmente viável.

#### 6.4 TESTES EM CAMPO

Buscando averiguar a eficácia das espécies de *Trichoderma* em condições de campo, realizaram-se as aplicações dos tratamentos e posteriormente as análises da severidade de mancha angular em plantas de feijão das cultivares IPR-Tuiuiú (Figura 13A) e IPR-Quero-Quero (Figura 13B).

FIGURA 13 – Curvas de severidade de mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) nas cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) IPR-Tuiuiú (A) e IPR-Quero-Quero (B).



Fonte: a autora.

O experimento, realizado entre os meses de dezembro de 2020 e fevereiro de 2021, teve baixos níveis de severidade da mancha angular para ambas as cultivares (Figura 13A e 13B), resultando em baixos índices de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Tabela 9). Esse resultado pode ser explicado pela condição hídrica durante esse período, com o índice de precipitações inferior à média histórica e por consequência, com o déficit de molhamento em vários momentos do ciclo da cultura (Figura 9).

TABELA 9 – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivadas em condições de campo na Fazenda Escola Capão da Onça. Ponta Grossa – PR, safra 2020/2021.

Tratamento	IPR-Tuiuiú	IPR-Quero-Quero
<i>Trichoderma asperellum</i>	12,20b*	8,89b
<i>Trichoderma endophyticum</i>	11,46b	9,39b
<i>Trichoderma harzianum</i>	11,89b	8,75b
<i>Trichoderma lentiforme</i>	12,49b	8,31b
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	12,88b	9,73b
<i>Trichoderma tomentosum</i>	11,81b	10,21b
<i>Trichoderma viride</i>	11,62b	9,71b
Acibenzolar-S-metílico (Bion®)	11,07b	8,18b
Fungicida - hidróxido de fentina (Mertin®)	12,79b	9,71b
Água destilada e esterilizada (Controle)	24,52a	16,46a
Coefficiente de variação	14,09%	15,88%

\* Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: a autora.

A mancha angular tem melhor desenvolvimento na safra da seca (semeadura de janeiro à março) uma vez que apresenta maiores níveis de inóculo em campo e melhores condições climáticas para a disseminação e o desenvolvimento da doença. O desenvolvimento da mancha angular ocorre em temperatura média de 24°C e condições de alternância entre períodos secos e úmidos, o que não foi observado nesse período (WENDLAND *et al.*, 2016).

Para ambas as cultivares, IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, houve diferença estatística entre os tratamentos e a testemunha (Tabela 9). Os tratamentos baseados em suspensões de esporos das espécies de *Trichoderma* foram eficazes em controlar a mancha angular, tanto quanto os tratamentos com fungicida ou ASM, utilizados comercialmente.

Em pesquisa realizada também em condições de campo, Bhusal *et al.* (2018), avaliando o potencial de controle da brusone do arroz com o uso de *T. viride*, obtiveram redução da severidade da doença. Realizaram-se nesse estudo duas repetições do experimento, e em ambas, os tratamentos de suspensões de esporos diferiram da testemunha (apenas água). Tais resultados corroboram com os obtidos no presente estudo.

Avaliando em campo o controle de antracnose por *T. viride*, *T. tomentosum*, ácido salicílico, fosfito de cobre, ASM e fungicida (azoxistrobina+difenoconazol), Christmann

(2019) obteve redução da AACPD após o uso destes produtos quando comparados a testemunha. Os tratamentos compostos por *Trichoderma* e ASM não diferiram do tratamento com fungicida, assim como os aqui observados (Tabela 9).

Gabardo *et al.* (2020c), testando tratamentos alternativos para a redução da severidade de míldio (*Peronospora manshurica* (Naumov) Syd.) em soja, observaram que uso de ASM reduziu a AACPD quando comparado ao fungicida e a testemunha. No presente estudo, no entanto, o ASM não diferiu do tratamento com fungicida ou *Trichoderma*.

Avaliando a AACPD de oídio do trigo, Santos *et al.* (2018) observaram que o acibenzolar também foi eficiente no controle de oídio na cultura. Por sua vez, sobre o fungo *Fusarium oxysporum*, Melo; Serra; Nascimento (2021) determinaram que o ASM também foi eficaz na redução da severidade da fusariose em plantas de quiabo.

Os tratamentos baseados em *Trichoderma* e ASM são eficientes no controle de doenças em condições de campo, incluindo a mancha angular (Tabela 9). Esses tratamentos foram capazes de reduzir a área abaixo da curva de progresso da doença em condições de campo, não diferindo do tratamento químico com fungicida, podendo se tornar um substituto a este.

Devido a impossibilidade de colheita e avaliação final da cultivar IPR-Quero-Quero, em decorrência da alta população de daninhas na gleba, avaliaram-se somente os componentes de rendimento e produtividade da cultivar IPR-Tuiuiú (Tabela 10).

TABELA 10 – Componentes de rendimento e produtividade de feijão (*Phaseolus vulgaris*) da cultivar IPR-Tuiuiú, cultivada em condições de campo na Fazenda Escola Capão da Onça. Ponta Grossa – PR, safra 2020/2021.

Tratamento	Plantas por metro	Vagens por planta	Grãos por vagem	Peso de mil grãos (g)	Produtividade (kg.ha <sup>-1</sup> )
<i>Trichoderma asperellum</i>	10,53 <sup>ns</sup>	11,06 <sup>ns</sup>	6,53 <sup>ns</sup>	114,27 <sup>ns</sup>	1641,32 <sup>ns</sup>
<i>Trichoderma endophyticum</i>	8,93	9,06	6,00	163,85	1772,06
<i>Trichoderma harzianum</i>	8,53	8,73	6,00	190,74	1931,13
<i>Trichoderma lentiforme</i>	9,06	8,13	6,00	165,85	1603,51
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	10,13	10,26	5,86	162,63	2208,73
<i>Trichoderma tomentosum</i>	8,13	10,40	6,20	190,14	2096,20
<i>Trichoderma viride</i>	8,20	8,20	6,40	158,73	1563,27
Acibenzolar-S-metílico (Bion <sup>®</sup> )	9,53	10,60	6,26	180,95	2503,61
Fungicida - hidróxido de fentina (Mertin <sup>®</sup> )	9,93	9,26	5,93	188,64	2395,26
Água destilada e esterilizada (Controle)	10,26	9,33	6,00	164,86	2194,24
Coefficiente de variação	14,88%	14,00%	8,21%	19,76%	27,14%

ns: não significativo pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: a autora.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos para nenhuma das variáveis avaliadas (plantas por metro, vagens por planta, grãos por vagem, peso de mil grãos e produtividade) (Tabela 10).

O uso de *T. harzianum* via inoculação em sementes proporcionou incremento na produtividade de milho híbrido em estudo realizado por Steffen *et al.* (2021). O mesmo foi observado em trabalho realizado por Pereira *et al.* (2019), no qual, a mesma espécie foi capaz de aumentar a produtividade de alface da cv. Astra em relação à testemunha.

No entanto, com os resultados obtidos, os tratamentos alternativos com *Trichoderma* ou ASM não influenciaram os componentes de rendimento, não diferindo também do tratamento com fungicida ou a testemunha.

## 6.5 ANÁLISES ENZIMÁTICAS

Realizaram-se análises enzimáticas para se estabelecer os níveis de enzimas produzidas e acumuladas em resposta à aplicação dos tratamentos em plantas de feijão cultivadas em casa de vegetação para indução de resistência.

Houve a necessidade de transformação para os dados obtidos nas três enzimas avaliadas. Utilizou-se o método de transformação de potência ótima Box-Cox para atender as pressuposições de normalidade dos dados e reduzir o coeficiente de variação. A fim de verificar o acúmulo das enzimas peroxidase e polifenoloxidase em relação ao tempo, realizaram-se análises de regressão, considerando-se apenas a regressão quadrática para análises, uma vez que nos modelos significativos o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) possuía valores superiores aos encontrados na regressão linear.

Para as avaliações de peroxidases (Tabela 11) e polifenoloxidase (Tabela 12), estabeleceram-se três tempos de coleta de material vegetativo para avaliação: 24 horas antes da aplicação dos tratamentos e 24 e 48 horas após a aplicação dos tratamentos.

Com relação aos níveis de peroxidase 24 horas antes da aplicação dos tratamentos (Tabela 11), para a cultivar IPR-Tuiuiú, observou-se que o *T. lentiforme* se diferenciou estatisticamente da testemunha, apresentando maior quantia de peroxidase. Tal índice pode ser resultado da ativação de mecanismos de defesa das plantas coletadas, por conta de alguma injúria por insetos e/ou início do desenvolvimento de uma doença. Para a IPR-Quero-Quero não houve diferença significativa entre os tratamentos. Resultado esse esperado, uma vez que as plantas estavam em condições semelhantes de cultivo, sem a influência de indutores.

TABELA 11 – Acúmulo de peroxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), em folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivadas em casa de vegetação. Ponta Grossa – PR, 2022.

Tratamento	IPR-Tuiuiú			IPR-Quero-Quero		
	24h A <sup>1</sup>	24h D <sup>2</sup>	48h D <sup>3</sup>	24h A <sup>1</sup>	24h D <sup>4</sup>	48h D <sup>5</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i>	1,07ab*	0,82ab	1,16ab	1,13 <sup>ns</sup>	0,76bc	1,19a
<i>Trichoderma endophyticum</i>	1,18ab	0,82ab	1,11abc	1,21	1,03ab	1,28a
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,19ab	0,82ab	0,85abcd	1,05	0,91ab	1,03ab
<i>Trichoderma lentiforme</i>	1,26a	0,70b	1,13abc	1,13	0,91ab	0,91abc
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	1,08ab	1,10a	1,22ab	1,08	1,14a	1,02abc
<i>Trichoderma tomentosum</i>	1,12ab	0,70b	1,29a	1,07	0,68bc	0,72abc
<i>Trichoderma viride</i>	1,13ab	0,95ab	0,72bcd	1,12	0,98ab	1,15a
Acibenzolar-S-metílico (Bion <sup>®</sup> )	1,13ab	0,92ab	0,98abc	1,11	0,88ab	0,95abc
Fungicida - hidróxido de fentina (Mertin <sup>®</sup> )	1,13ab	0,62b	0,29d	1,17	0,51c	0,45c
Água destilada e esterilizada (Controle)	1,06b	0,86ab	0,59cd	1,11	0,71bc	0,52bc
Coefficiente de variação	7,19%	16,57%	24,76%	7,46%	17,37%	25,68%

<sup>1</sup>Dados transformados por Box-Cox, onde  $\lambda = -0,1$ ; <sup>2</sup> $\lambda = 0,3$ ; <sup>3</sup> $\lambda = 0,7$ ; <sup>4</sup> $\lambda = 0,4$ ; <sup>5</sup> $\lambda = 0,6$ ; \* Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância; ns: não significativo. Fonte: a autora.

A coleta 24 horas após a aplicação demonstrou diferença estatística entre o *T. koningiopsis*, com maior acúmulo de peroxidase nos tratamentos *T. lentiforme*, *T. tomentosum* e fungicida para a cultivar IPR-Tuiuiú. Na cultivar IPR-Quero-Quero, o *T. koningiopsis* também apresentou maior acúmulo 24 horas após os tratamentos (Tabela 11).

No tempo de 48 horas após as aplicações, o *T. tomentosum* teve o maior nível da enzima, seguido pelos tratamentos com *T. koningiopsis* e *T. asperellum* na cultivar IPR-Tuiuiú (Tabela 11). Estes tratamentos diferiram do controle, demonstrando que o uso de *Trichoderma* leva ao acúmulo de enzimas relacionadas à indução de resistência.

A análise de regressão da cultivar IPR-Tuiuiú para a enzima peroxidase (Figura 13) apresentou modelo significativo para os tratamentos *T. endophyticum*, *T. harzianum*, *T. lentiforme*, *T. koningiopsis* e *T. tomentosum*. Notou-se incremento no acúmulo da peroxidase, entre o tempo 1 e o tempo 2, atingindo o ponto máximo analisado no tempo 3 para os modelos significativos, exceto o modelo do tratamento com *T. koningiopsis*. Os tratamentos *T. endophyticum*, *T. lentiforme* e *T. tomentosum* apresentam a curva de tendência ascendente, com o aumento da enzima ao passar do tempo.

Para a cultivar IPR-Quero-Quero, a análise de peroxidase das plantas coletadas 48 horas após os tratamentos demonstra que o *T. asperellum*, *T. endophyticum* e *T. viride* diferiram estatisticamente da testemunha (Tabela 11). A regressão obtida para essa cultivar e enzima teve modelo significativo para os tratamentos *T. asperellum*, *T. endophyticum*, *T. viride* e ASM (Figura 14). Pela curva de tendência, observou-se aumento progressivo no acúmulo de peroxidase para o *T. asperellum*.

Os tratamentos *T. endophyticum*, *T. viride* e ASM apresentam crescimento nas quantidades de peroxidase até o terceiro tempo avaliado, porém apresentam tendência de queda a partir desse período. O tratamento *T. koningiopsis* apresentou o ponto máximo de acúmulo de peroxidase no tempo 2, tendo queda na curva de tendência em diante (Figura 14).

Considerando-se o acúmulo de polifenoloxidase, em ambas as cultivares e em todos os tempos de coleta, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 12). Analisando-se a regressão quadrática realizada individualmente por tratamento, para a cultivar IPR-Tuiuiú (Figura 15), apenas o tratamento com ASM teve modelo significativo, apresentando o ponto máximo de acúmulo da enzima no tempo 3 e curva de tendência ascendente.

Nas regressões quadráticas realizadas para o acúmulo de polifenoloxidase na cultivar IPR-Quero-Quero (Figura 16) o tratamento com *T. harzianum* apresentou modelo significativo, com o ponto máximo de acúmulo para o tempo 3, ou seja, 48 horas após os tratamentos. A curva de tendência demonstrou redução no acúmulo da enzima a partir de 72 horas.

Buscando o biocontrole de *R. solanacearum* em batata, Mohamed *et al.* (2020) testaram *T. asperellum* e *Enterobacter cloacae* visando a indução de resistência. O tratamento com *T. asperellum* foi capaz de incrementar a atividade de peroxidase a partir do segundo dia de avaliação, alcançando o pico da atividade no oitavo dia. Nas avaliações realizadas para a cultivar IPR-Quero-Quero (Figura 14), o tratamento de *T. asperellum* também apresentou curva de tendência ascendente para a enzima peroxidase. Na cultivar IPR-Tuiuiú (Figura 13), foram os tratamentos compostos por *T. endophyticum*, *T. lentiforme* e *T. tomentosum* que apresentaram a curva de tendência ascendente com o aumento da enzima ao passar do tempo.

Com relação à polifenoloxidase, Mohamed *et al.* (2020) tiveram para o tratamento baseado em *Trichoderma* o pico no acúmulo da enzima no oitavo dia de avaliação, superior estatisticamente aos demais tratamentos. Para a cultivar IPR-Tuiuiú (Figura 15), no entanto, os tratamentos utilizados não levaram ao acúmulo de polifenoloxidase, havendo modelo significativo de regressão apenas para a curva do tratamento com ASM. Considerando-se a cultivar IPR-Quero-Quero, observou-se acúmulo de polifenoloxidase para o tratamento *T. harzianum*, porém com tendência de decréscimo na curva a partir do tempo 3 (Figura 16).

Em estudos realizados acerca da proteção da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum falcatum*, Singh *et al.* (2018) testaram elicitores provenientes de fungos do gênero *Trichoderma* e obtiveram resultados positivos quanto ao incremento na síntese e atividade de enzimas. A atividade de polifenoloxidase foi incrementada em 68,14 e 25,98% com a inoculação de dois elicitores provenientes de *Trichoderma*. A atividade de peroxidase, por sua vez, teve incremento de 89,63 e 50,26% a partir dos elicitores

quando comparada ao controle. Pôde-se observar ainda um incremento na atividade de peroxidase e polifenoloxidase com o passar do tempo nos tratamentos contendo elicitores provenientes de *Trichoderma*.

TABELA 12 – Acúmulo de polifenoloxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), em folhas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivadas em casa de vegetação. Ponta Grossa – PR, 2022.

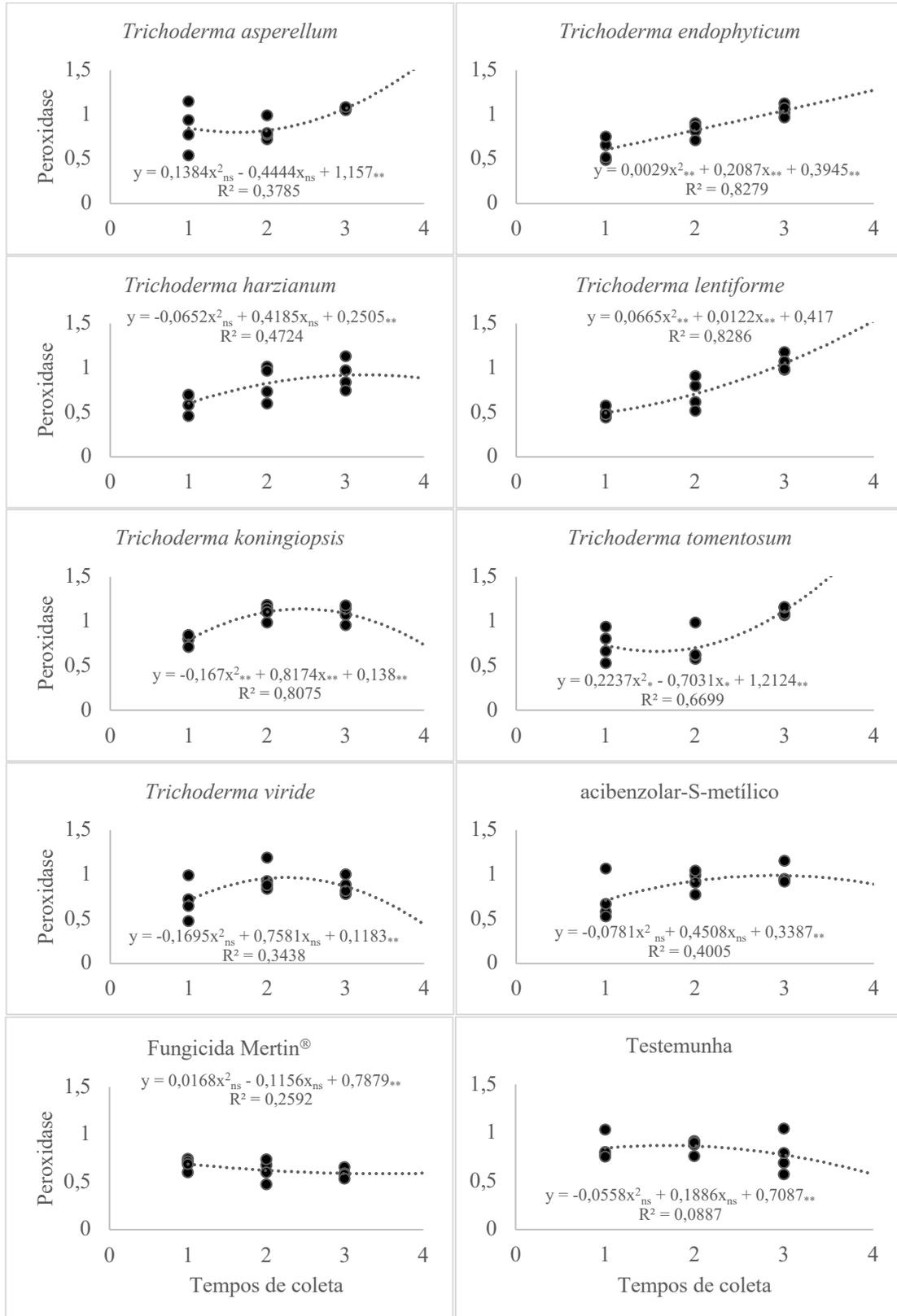
Tratamento	IPR-Tuiuiú			IPR-Quero-Quero		
	24h A <sup>1</sup>	24h D <sup>1</sup>	48h D <sup>1</sup>	24h A <sup>1</sup>	24h D <sup>1</sup>	48h D <sup>2</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i>	7,92 <sup>ns</sup>	7,05 <sup>ns</sup>	7,47 <sup>ns</sup>	7,90 <sup>ns</sup>	7,41 <sup>ns</sup>	5,53 <sup>ns</sup>
<i>Trichoderma endophyticum</i>	7,84	7,46	7,46	7,63	7,85	5,51
<i>Trichoderma harzianum</i>	7,90	7,84	7,68	7,94	7,88	5,77
<i>Trichoderma lentiforme</i>	7,87	7,90	7,54	7,89	7,80	5,96
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	7,81	7,86	7,82	7,78	7,90	4,80
<i>Trichoderma tomentosum</i>	7,89	7,35	7,83	7,82	7,84	4,55
<i>Trichoderma viride</i>	7,91	7,82	7,84	7,77	7,41	5,18
Acibenzolar-S-metilico (Bion <sup>®</sup> )	7,95	7,83	7,66	7,89	7,86	6,45
Fungicida - hidróxido de fentina (Mertin <sup>®</sup> )	7,92	7,86	7,91	7,78	7,75	6,08
Água destilada e esterilizada (Controle)	7,91	7,89	7,91	7,91	7,59	4,92
Coeficiente de variação	0,95%	4,84%	3,73%	2,39%	3,97%	28,15%

<sup>1</sup> Dados transformados por Box-Cox, onde  $\lambda = -3$ ; <sup>2</sup>  $\lambda = -0,3$ ; ns: não significativo pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: a autora.

Utilizando *T. asperellum* visando a indução de resistência em plantas de cebola, Luna *et al.* (2021) não observaram diferença estatística entre o uso de *T. asperellum* e o tratamento controle para o acúmulo de peroxidase. No entanto, concluíram com base nas análises realizadas, que os tratamentos com *T. asperellum*, *T. endophyticum*, *T. lentiforme* e *T. tomentosum* foram capazes de promover um acúmulo ascendente nos níveis da enzima peroxidase quando comparados à testemunha e ao ASM.

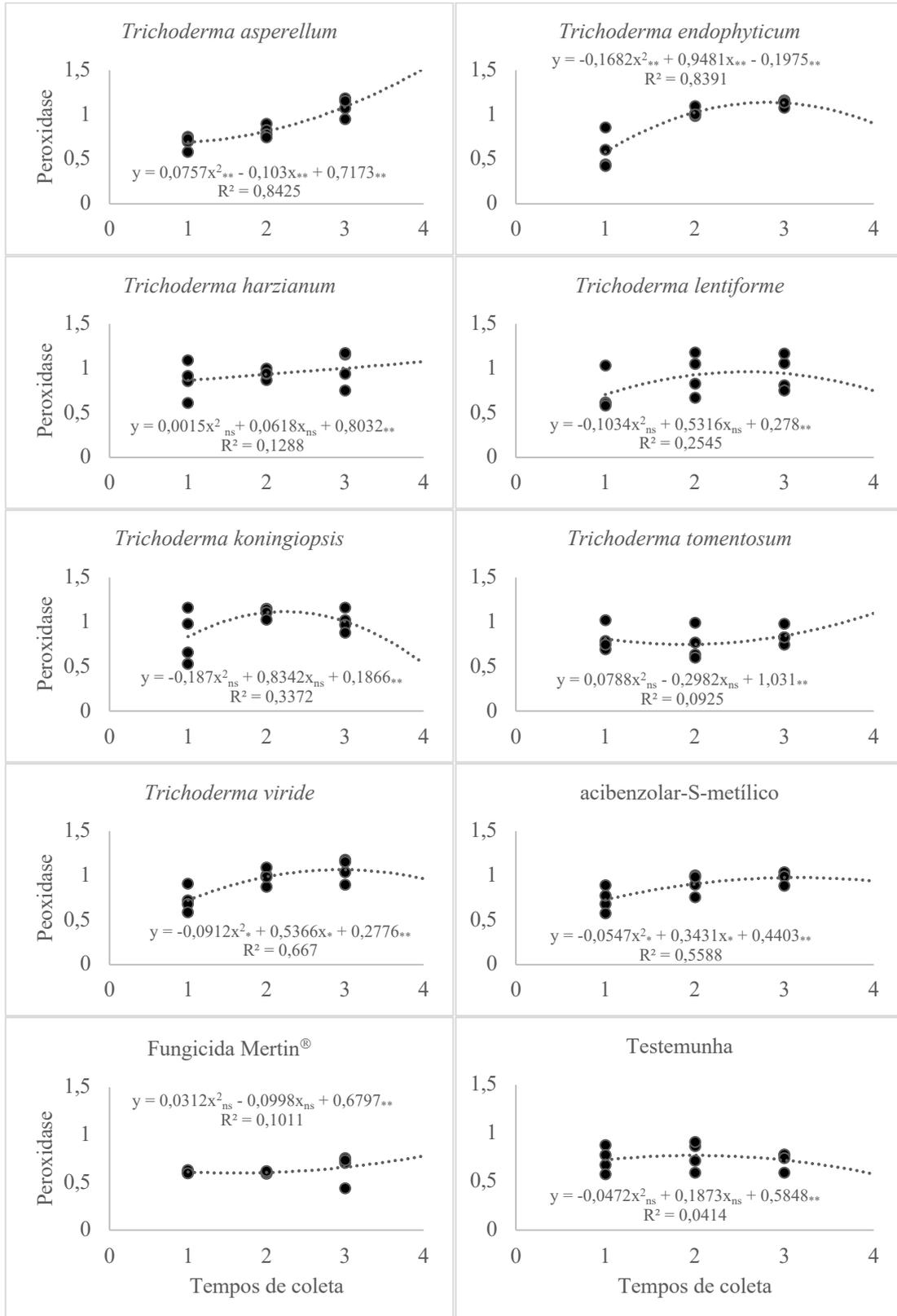
Avaliando a indução de resistência promovida por *T. asperellum* na alface contra *Corynespora cassicola* e *Curvularia aerea*, Baiyee, Ito e Sunpapao (2020) observaram incremento na atividade da enzima polifenoloxidase. A aplicação via foliar e tratamento de sementes com *T. asperellum* 24h após a inoculação foi capaz de incrementar a atividade de polifenoloxidase quando comparados ao tratamento controle e aos demais tratamentos (Tabela ???). No entanto, para a cultivar IPR-Tuiuiú os tratamentos com *Trichoderma* não influenciaram o acúmulo dessa enzima. Na cultivar IPR-Quero-Quero, houve um acúmulo de polifenoloxidase 48 horas após o tratamento com *T. harzianum*, mas apresentando tendência de decréscimo.

FIGURA 14 – Regressão quadrática do acúmulo de peroxidase nos três tempos de coleta para a cultivar IPR-Tuiuiu de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Eixo x: tempo 1 – 24 horas antes dos tratamentos; 2 – 24 horas após os tratamentos; 3 – 48 horas após os tratamentos; Eixo y: acúmulo de peroxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ). Dados transformados (Box-Cox) em  $(x)^{0,3}$ ; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; ns: não significativo. Ponta Grossa – PR, 2022.



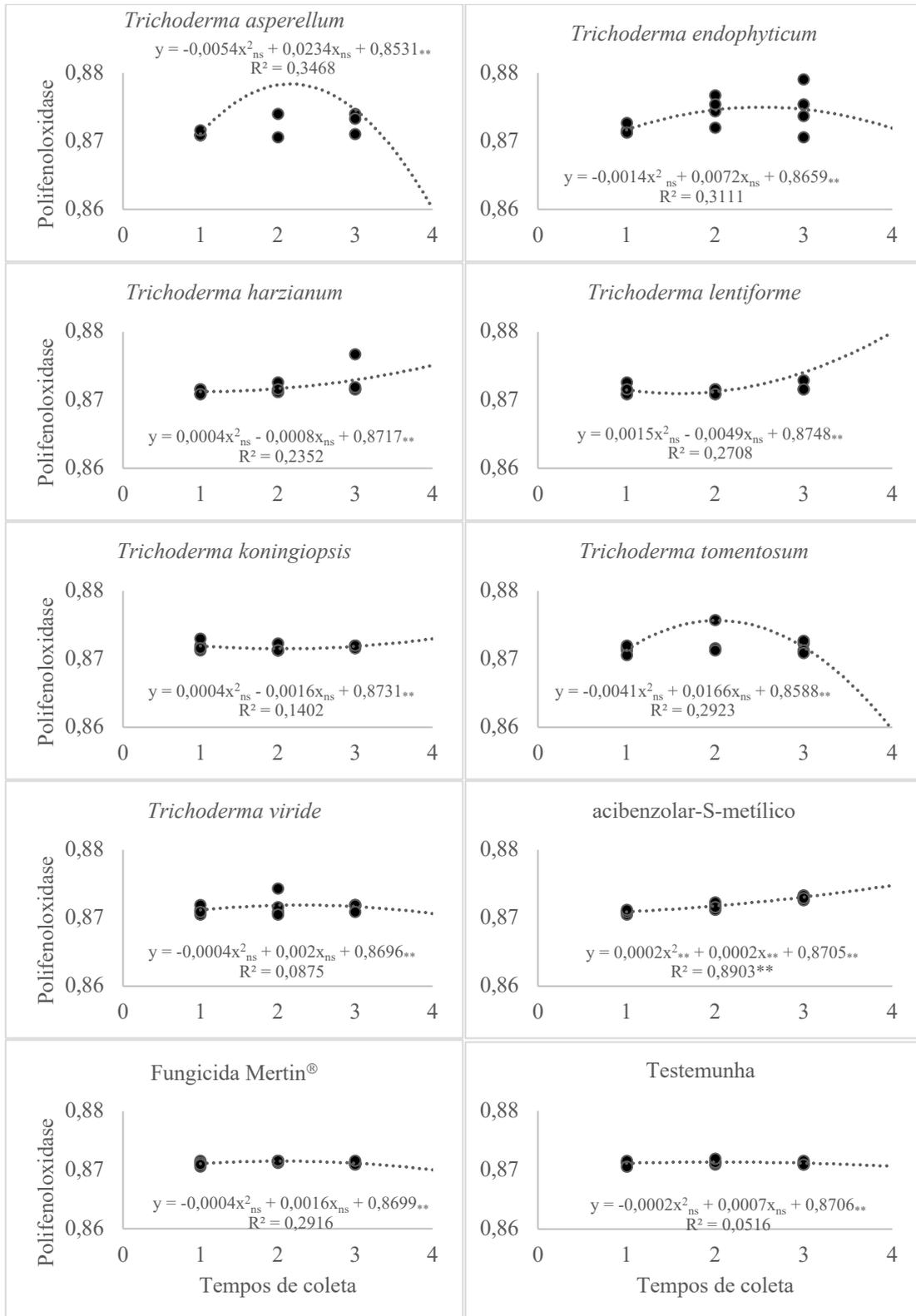
Fonte: a autora.

FIGURA 15 – Regressão quadrática do acúmulo de peroxidase nos três tempos de coleta para a cultivar IPR-Quero-Quero de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Eixo x: tempo 1 – 24 horas antes dos tratamentos; 2 – 24 horas após os tratamentos; 3 – 48 horas após os tratamentos; Eixo y: acúmulo de peroxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ). Dados transformados (Box-Cox) em  $(x)^{0,3}$ ; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; ns: não significativo. Ponta Grossa – PR, 2022.



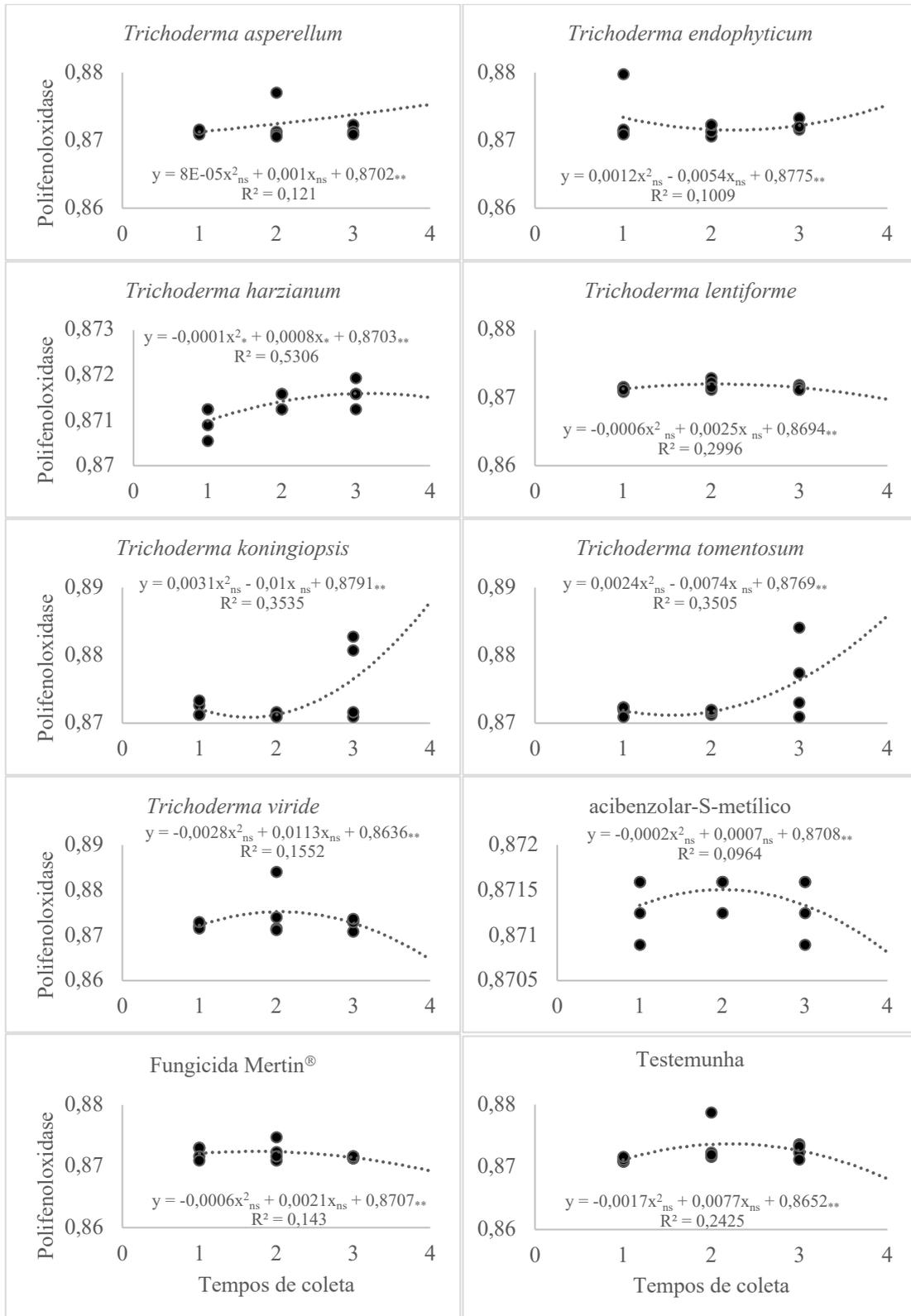
Fonte: a autora.

FIGURA 16 – Regressão quadrática do acúmulo de polifenoloxidação nos três tempos de coleta para a cultivar IPR-Tuiuiú de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Eixo x: tempo 1 – 24 horas antes dos tratamentos; 2 – 24 horas após os tratamentos; 3 – 48 horas após os tratamentos; Eixo y: acúmulo de polifenoloxidação, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ). Dados transformados (Box-Cox) em  $(x + 0,5)^{0,2}$ ; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; ns: não significativo. Ponta Grossa – PR, 2022.



Fonte: a autora.

FIGURA 17 – Regressão quadrática do acúmulo de polifenoloxidase nos três tempos de coleta para a cultivar IPR-Quero-Quero de feijão (*Phaseolus vulgaris*). Eixo x: tempo 1 – 24 horas antes dos tratamentos; 2 – 24 horas após os tratamentos; 3 – 48 horas após os tratamentos; Eixo y: acúmulo de polifenoloxidase, expresso em unidades de absorvância ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$ ). Dados transformados (Box-Cox) em  $(x + 0,5)^{0,2}$ ; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; ns: não significativo. Ponta Grossa – PR, 2022.



Fonte: a autora.

A partir da metodologia de extração de faseolina de hipocótilos estiolados, realizaram-se as medições em espectrofotômetro e os resultados foram expressos em unidades de absorvância (Tabela 13).

TABELA 13 – Acúmulo de faseolina, expresso em unidades de absorvância por grama de peso fresco ( $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  proteína), em hipocótilos estiolados de feijão de feijão (*Phaseolus vulgaris*) das cultivares IPR-Tuiuiú e IPR-Quero-Quero, cultivados câmara de germinação, na ausência de luz. Ponta Grossa – PR, 2022.

Tratamento	IPR-Tuiuiú <sup>1</sup>	IPR-Quero-Quero <sup>2</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i>	1,27 <sup>ns</sup>	0,94abc*
<i>Trichoderma endophyticum</i>	1,10	0,79c
<i>Trichoderma harzianum</i>	1,01	0,85bc
<i>Trichoderma lentiforme</i>	1,00	0,93bc
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	0,93	1,04abc
<i>Trichoderma tomentosum</i>	1,10	1,21ab
<i>Trichoderma viride</i>	1,26	1,20ab
Acibenzolar-S-metílico (Bion <sup>®</sup> )	1,27	0,93bc
Fungicida - hidróxido de fentina (Mertin <sup>®</sup> )	1,27	1,30a
Água destilada e esterilizada (Controle)	1,00	0,94bc
Coeficiente de variação	15,27%	14,63%

<sup>1</sup>Dados transformados por Box-Cox, onde  $\lambda = 0,4$ ; <sup>2</sup> $\lambda = 0,5$ ; ns: não significativo. \* Médias seguidas da mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância. Fonte: a autora.

Para a cultivar IPR-Tuiuiú, não houve diferença estatística entre os tratamentos no acúmulo de faseolina (Tabela 13). Já para a cultivar IPR-Quero-Quero, o tratamento com fungicida apresentou diferença quando comparado à testemunha e ao *T. harzianum*, *T. lentiforme* e ASM, bem como ao *T. endophyticum*, o qual apresentou o menor nível de acúmulo da fitoalexina.

Os autores Solino *et al.* (2017) avaliaram o acúmulo de fitoalexinas em feijão, soja e sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) após o uso de filtrados dos fungos *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn, *Pseudobitritis terrestres*, *Memnomiella echinata* e *Curvularia eragrostidis* (Henn) Meyer. Em feijão, os filtrados de fungos promoveram acúmulo de faseolina superiores ao tratamento controle e ao ASM.

Avaliando a eficiência de indutores baseados em espécies de *Trichoderma*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus turigiensis*, ácido salicílico, tratamento fungicida e ASM, Schafranski (2020) teve resultados de incremento da faseolina. Para a cultivar IPR-Quero-Quero, o isolado de *Trichoderma* proporcionaram o melhor resultado no acúmulo desta fitoalexina quando comparado aos demais tratamentos. Na cultivar IPR-Tuiuiú, também os melhores resultados foram observados com tratamentos baseados em espécies de *Trichoderma* e *B. subtilis*.

O tratamento fungicida na cultivar IPR-Quero-Quero (Tabela 13) teve os melhores resultados de acúmulo de fitoalexinas. Os demais tratamentos contendo suspensões de esporos de *Trichoderma* e também o ASM não diferiram estatisticamente da testemunha.

## 7 CONCLUSÃO

Nos testes *in vitro*, *P. griseola* teve redução de crescimento e da esporulação quando submetido ao crescimento micelial e aos metabólitos voláteis e não voláteis dos fungos do gênero *Trichoderma*.

Em condições de casa de vegetação, para a cultivar IPR-Quero-Quero, as espécies de *Trichoderma* testadas não reduziram a severidade de mancha angular. Para a cultivar IPR-Tuiuiú, no segundo experimento, os tratamentos com *T. tomentosum*, *T. viride* e ASM foram eficientes em reduzir a severidade de mancha angular.

Os produtos alternativos baseados em esporos de fungos do gênero *Trichoderma* e acibenzolar-S-metil (ASM), aplicados na cultura do feijão em condições de campo, foram tão eficientes quando o fungicida na redução da severidade da mancha angular.

O uso dos produtos alternativos baseados em *Trichoderma* e ASM não afetou os componentes de rendimento e produtividade de feijão cultivado em condições de campo.

Os tratamentos contendo *T. asperellum* (IPR-Quero-Quero) e *T. endophyticum*, *T. lentiforme* e *T. tomentosum* (IPR-Tuiuiú) foram capazes de promover acúmulo ascendente nos níveis da enzima peroxidase quando comparados à testemunha e ao ASM.

Para a polifenoloxidase, na cultivar IPR-Tuiuiú os tratamentos com *Trichoderma* não influenciaram o acúmulo dessa enzima. O ASM apresentou acúmulo ascendente com o passar do tempo. Na cultivar IPR-Quero-Quero, houve acúmulo de polifenoloxidase no tratamento com *T. harzianum*, mas apresentando tendência de decréscimo após 48 horas.

O tratamento com o fungicida na cultivar IPR-Quero-Quero teve os melhores resultados de acúmulo de fitoalexinas.

## REFERÊNCIAS

- ADAPAR. Mertin® 400. Bula. Curitiba, 2020. Disponível em: [https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos\\_restritos/files/documento/202010/mertin400070218.pdf](https://www.adapar.pr.gov.br/sites/adapar/arquivos_restritos/files/documento/202010/mertin400070218.pdf). Acesso em: 10.abr.2022.
- ADNAN, M. *et al.* Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. **Microbial Pathogenesis**, v. 129, p. 7-18, 2019.
- AGRIOS, G. N. Genetics of plant Disease. In: **Plant Pathology**. 5.ed. London, UK: Elsevier Academic Press, p. 125-170, 2005.
- AHUJA, I.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 2, p. 73-90, 2012.
- ALIZADEH, H. *et al.* Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 14-23, 2013.
- ASSUNÇÃO, A. T. S.; DALLA PRIA, M.; CHRISTMANN, P. E. T.; SCHAFRANSKI, T. Controle de antracnose na cultura do feijão com produtos alternativos em casa de vegetação. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 9971-9982, 2020.
- ATANASOVA, L. *et al.* Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2013.
- AZEVEDO, J. A. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. In: KHARWAR, RN *et al.* (eds.). **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**, Springer India, 17-22p, 2014.
- BAIYEE, B.; ITO, S.; SUNPAPAO, A. *Trichoderma asperellum* T1 mediated antifungal activity and induced defense response against leaf spot fungi in lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 106, p. 96-101, 2019.
- BARBOSA, G. G. *et al.* Avaliação do potencial de isolados de *Trichoderma* spp. nativos do estado de Mato Grosso do Sul contra o fungo *Colletotrichum musae*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 29484-29502, 2021.
- BARROS, F. C. *et al.* Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.
- BHUSAL, N. R.; ACHARYA, B.; DEVKOTA, A. R.; SHRESTHA, J. Field evaluation of *Trichoderma viride* for the management of Rice Leaf Blast Disease in Pyuthan District, Nepal. **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**, v. 35, n. 1, p. 259-266, 2018.
- BITOCCHI, E. *et al.* Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. E788-E796, 2012.

BONETT, L. P. *et al.* Biocontrole *in vitro* de *Colletotrichum musae* por isolados de *Trichoderma* spp. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 5-10, dez., 2013.

BONETT, L. P. *et al.* Divergência genética em germoplasma de feijoeiro comum coletado no estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 547-560, out./dez., 2006.

BOX, George EP; COX, David R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 26, n. 2, p. 211-243, 1964.

BRESSAN, D. F. **Uso dos eliciadores acibenzolar-s-metilico e harpina na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum ao cretamento bacteriano**. 2011. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2011.

CALDERÓN, A. A.; ZAPATA, J. M.; BARCELO, A. R. Peroxidase-mediated formation of resveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 44, n. 4, p. 289-299, 1994.

CAMPOS, I.A.; FUCIKOVSKY, L.Z. Estudio de algunas características de *Isariopsis griseola* Sacc., agente causal de la mancha angular del frijol. **Agrociencia**, Chapingo, v.39, p.41-48, 1980.

CANO, E. F. R. *et al.* Crescimento micelial de *Colletotrichum* spp. Em diferentes meios de cultura. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 3119-3126, 2020.

CANTERI, M. G. *et al.* SASM-Agri: sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, v. 1, n. 2, p. 18-24, 2001.

CARNEIRO, J. E. *et al.*; **Feijão do Plantio à Colheita**. 1. ed. Viçosa, MG. Editora UFV, 2014. 384 p.

CONAB (Companhia Brasileira de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – décimo levantamento, safra 2020/21**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em: 02.abr.2022.

CHRISTMANN, P. E. T. P. **Produtos alternativos aplicados na cultura do feijão para controle da antracnose**. 2019. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2019.

CHRISTMANN, P. E. T. P.; DALLA PRIA, M.; HENNIPMAN, H. S.; GODOY, A. R. *In vitro* control of *Colletotrichum lindemuthianum* by *Trichoderma* spp. and *in vivo* with Alternative Products. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, Jaipur, India, v. 6, n. 10, p. 74-80, 2019.

DALLA PRIA, M. *et al.* Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola* e *Alternaria* sp. **Summa**

**Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, n. 2, p. 181-183, 1997.

DAROLT, J. C. **Expressão gênica em laranja doce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) em resposta à aplicação de acibenzolar-S-metílico e à infecção por *Candidatus liberibacter asiaticus***. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2016.

DEGANI, O.; DOR, S. *Trichoderma* biological control to protect sensitive maize hybrids against Late Wilt disease in the field. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 4, p. 315, 2021.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*: hyphal interactions. **Transactions of the British Mycological Society**, Londres, v. 57, n. 3, p. 363-369. 1971.

DIAS NETO, J. *et al.* Influência do meio de cultura na esporulação de *Magnaporthe grisea* e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 173-179, 2010.

DILDEY, O. D. F. **Indução de resistência à antracnose do feijoeiro por frações de filtrado de cultura e extrato de micélio de *Trichoderma longibrachiatum***. 2017. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Cândido Rondon, 2017.

DIXON, R. A. *et al.* Phytoalexin induction in French bean: intercellular transmission of elicitation in cell suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 71, n. 2, p. 251–256, 1983.

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

DUTTA, D. *et al.* Endophytes: exploitation as a tool in plant protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 621-629, sep./oct., 2014.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Manual de Identificação das principais doenças do feijoeiro-comum**. Brasília, DF: EMBRAPA Arroz e Feijão, 2018. 49 p.

FAO. **Countries of commodity: top 10 country productions of beans, dry 2020**. Roma: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2020a. Disponível em: [http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries\\_by\\_commodity](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity). Acesso em 28 fev. 2022.

FAO. **Commodities by country: top 10 commodities production in Brazil 2020**. Roma: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2020b. Disponível em: [http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities\\_by\\_country](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country). Acesso em: 28 fev. 2022.

FARIAS, O. R.; CRUZ, J. M. F. L.; DUARTE, I. G. Controle in vitro de *Colletotrichum truncatum* do feijão fava (*Phaseolus lunatus*) por *Trichoderma* spp. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 12, p. 1-6, 2020.

FIGUEIRA, E. P. P. *et al.* Histochemical changes induced by *Trichoderma* spp. and potassium phosphite in common bean (*Phaseolus vulgaris*) in response to the attack by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 3, p. 811-828, 2020.

FIRÁKOVÁ, S.; STURDÍKOVÁ, M.; MÚCKOVÁ, M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. **Biologia**, v. 62, n.3, p. 251-257, 2007.

FURLAN, M. R. *et al.* Eugenol na indução de fitoalexina no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Fitos**, v. 15, n.1, p. 53-59, 2020.

GABARDO, G.; DALLA PRIA, M.; PRESTES, A. M. C.; SILVA, H. L. Disease control in pod bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with *Trichoderma asperellum*, milk in natura and fungicides. **International Journal of Development Research**, v. 10, n. 08, p. 39506-39513, 2020a.

GABARDO, G.; DALLA PRIA, M.; PRESTES, A. M. C.; SILVA, H. L. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 08, p. 55870-55885, 2020b.

GABARDO, G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, H. L.; HARMS, M. G. Alternative Products to Control Soybean Downy Mildew in the Field. **Journal of Agricultural Science**, v. 12, n. 8, p. 160-170, 2020c.

GAJERA, H.; *et al.* Molecular mechanism of *Trichoderma* as biocontrol agents against phytopathogen system – a review. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 133-142, jul., 2013.

GODOY, C. V. *et al.* Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 104, n. 4, p. 336-345, 1996.

GOES, L. B. O. **Efeitos de fontes de carbono e nitrogênio na produção de secretoma de *Colletotrichum* spp.** 2017. Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) – Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2017.

HUANG, C. H. *et al.* Effect of application frequency and reduced rates of acibenzolar-S-methyl on the field efficacy of induced resistance against bacterial spot on tomato. **Plant Disease**, v. 96, n. 2, p. 221–227, 2012.

IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná). **Cultivares de feijão do IAPAR: proposta para a safra de 2013/14.** Disponível em: [http://www.asbraer.org.br/index.php/consulta/item/download/560\\_893d3e5b805df5c8f9eefd880a4319ff+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://www.asbraer.org.br/index.php/consulta/item/download/560_893d3e5b805df5c8f9eefd880a4319ff+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br). Acesso em: 01.jun.2020.

IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná). **Principais características das cultivares de feijão com sementes disponíveis no mercado.** Disponível em: <http://www.iapar.br/pagina-1363.html>. Acesso em: 01.jun.2020.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Estatística da Produção Agrícola.** Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e>

pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=resultados>Acesso em: 02.jan. 2021.

JIA, M.; *et al.* Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants. **Journal Frontier's in Microbiology**. v.7, p 907, 2016.

KRUGNER, T. L. Natureza da Doença. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Org.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Volume 1. 3.ed. São Paulo: Agronomica Ceres, 1995. p. 34-44.

KESSMANN, H.; OOSTENDORP, M.; STAUB, T. Mode of action of a new plant activator. **Brighton Crop Protection Conference – Pests & Diseases**, p. 961-966. 1996.

LORENZETTI, E. *et al.* Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

LUCON, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp (em linha). **Infobibos, Informações Tecnológicas**. 2009. Disponível em: [http://www.infobibos.com/Artigos/2009\\_1/trichoderma/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm). Acesso em: 10 jan. 2021.

LUNA, V. C.; MOCTEZUMA, H. E. F.; BELMONT, R. M.; JIMÉNEZ, G. S. Induction of the defense response of onion plants in interaction with *Trichoderma asperellum* and *Alternaria porri*. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 12, n. 4, p. 685-698, 2021.

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

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. 1. ed. Brasília: Binagri, 2009. 201 p.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, n. 1, p. 369-409. 1993.

MARZLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.61, p.17-32, 1997.

MAUCH, F.; *et al.* Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. **Plant Journal**, Oxford, n. 25, v.1, p. 67-77, 2001.

MBARGA, J. B. *et al.* *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. **Crop Protection**, v. 36, p. 18-22, 2012.

MEI, L. I. *et al.* The effects of *Trichoderma* on preventing cucumber fusarium wilt and regulating cucumber physiology. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 18, n. 3, p. 607-617, 2019.

MELETIADIS, J., *et al.* Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 478-484, 2001.

- MELO, T. A.; SERRA, I. M. R. S.; NASCIMENTO, I. T. V. S. Efeito do extrato hidroalcoólico e do óleo de nim (*Azadirachta indica*) sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e na resistência induzida de quiabeiros à fusariose. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e7110212357- e7110212357, 2021.
- MENEZES, M.; SILVA-HANLIN, D.M.W. **Guia prático para fungos fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, p. 106, 1997.
- MOHAMED, B. F. F. *et al.* Approving the biocontrol method of potato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) using *Enterobacter cloacae* PS14 and *Trichoderma asperellum* T34. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, n. 1, p. 1-13, 2020.
- MONDA, E. T.; SENDERS, F. E.; HICK, A. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 50, n. 1, p. 103-110, Jan. 2001.
- MONTE, E. Understanding Trichoderma: between biotechnology and microbial ecology. **International Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 1-4, 2001.
- MUKHERJEE, P. K.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M. Secondary metabolism in Trichoderma – a genomic perspective. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 35-45, 2012.
- MYRESIOTIS, C. K.; VRYZAS, Z.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Enhanced root uptake of acibenzolar-S-methyl (ASM) by tomato plants inoculated with selected *Bacillus* plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Applied Soil Ecology**, v. 77, p. 26-33. 2014.
- OLIVEIRA, J.A. **Efeito do tombamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1991.
- OLIVEIRA, L. F. C. *et al.* Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos. Embrapa Arroz e Feijão – **Livro Técnico (INFOTECA-E)**, 61p. 2018a.
- OLIVEIRA, D. L. **Microfungos da Amazônia meridional: efeito no desenvolvimento de *Colletotrichum musae* e indução de fitoalexinas**. 2018. Monografia (Bacharelado em Agronomia) – Universidade Federal de Mato Grosso. Sinop, 2018b.
- OOSTENDORP, M. KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v.107, p. 19-28, 2001.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. São Paulo: Ed. Agrônômica Ceres, 1995. v. 1, p. 417-454.
- PEREIRA, F. T. *et al.* Promoção do crescimento e da produtividade de alface pelo emprego de cepas comerciais de *Trichoderma* spp. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 69-74, 2019.
- RABEA, E. I. *et al.* Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

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

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

RIBEIRO, M.J. **Caracteres morfofisiológicos de *Isariopsis griseola* e fontes de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**, 1991. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1991.

SÁNCHEZ-MONTESINOS, B. *et al.* Biological control of fungal diseases by *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* and its compatibility with fungicides. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 8, p. 598, 2021.

SANTOS, H. A. A.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C.; MAY-DE-MIO; L. L. Phosphites and acibenzolar-S-methyl alone and combined with fungicides for the control of biotrophic pathogens of wheat. **Summa Phytopathologica**, v. 44, p. 132-136, 2018.

SANTOS FILHO, H.P.; FERRAZ, S.; SEDIYAMA, C.S. Isolamento e esporulação "*in vitro*" de *Isariopsis griseola* Sacc. **Experientiae**, Viçosa, v. 22, p. 175-193, 1976.

SARTORATO, A. Controle químico da mancha angular do feijoeiro comum. **Comunicado Técnico**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 4 p.

SARTORATO, A.; RAVA, C. A. Mancha Angular. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Org). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 41-68.

SARZI, J. S. ***Trichoderma* spp. no biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e no crescimento de feijoeiro**. 2019. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2019.

SCHAFRANSKI, T. **Eficiência de indutores de resistência na produção de faseolina em cultivares de feijão**. 2020. Monografia (Bacharelado em Agronomia) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2020.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, n. 8, p. 1051-1056. 1977.

SILVA, N. P.; FILIPPI, M. C. C.; GONÇALVES, F. J.; ALVES, A. C. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e promoção do crescimento na cultura do girassol com o uso de *Trichoderma* sp. e rizobactérias. **Ipê Agronomic Journal**, v.5, n.1, p.1-14, 2021.

SILVA, H. T. **Caracterização morfológica, agrônômica e fenológica de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Goiânia, GO: Centro Nacional de Pesquisa – Arroz e Feijão, 1981. 52 p.

SILVEIRA, G.A. **Evaluación de la resistencia de fríjol a la mancha angular: algunos aspectos fisiológicos de *Isariopsis griseola* Sacc.y patogenicidad de algunas cepas**

**colectadas en Costa Rica.** 1967. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Universidad de Costa Rica, Turrialba, 1967.

SINDHAN, G. S.; BOSE, S. K. Effect of temperature and relative humidity on the development of angular leaf spot of French bean. **Progressive Horticulture**, Chaubattia, v.12, n.1, p. 5-14, 1980.

SINGH, S. P.; SCHWATZ, H. F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, Madison, v. 50, n.6, p. 2199-2223, Nov. 2010.

SHARMA, V. *et al.* Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: universal yet host specific response. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, n. 1, p. 72-79, 2017.

SOLINO, A. J. S. *et al.* Accumulation of phytoalexins in beans, soybeans and sorghum by fungal filtrates. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 1073-1078, out./dez., 2017.

STEFFEN, G. P. K. *et al.* Incremento da produtividade de milho pela inoculação de *Trichoderma harzianum*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 4455-4468, 2021.

TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

TUITE, J. **Plant Pathological Methods – Fungi and bacterial**. Department os Botany and Plant Pathology. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1969.

VIECELLI, C. A. *et al.* Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2010.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280. 2013.

WEINDLING, R. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. **Phytopathology**, v. 24, p. 1140- 1153, 1964.

WENDLAND, A. *et al.* **Doenças do feijoeiro**. In: AMORIM, L. *et al.* Manual de Fitopatologia: doenças de plantas cultivadas. 5. ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres. p. 383-396. 2016.

XUE, R. F.; WU, J.; WANG, L. F.; BLAIR; M. W. Salicylic Acid Enhances Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 470-476, 2014.

**ANEXO A - COMPOSIÇÃO DOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS PARA O TESTE DE CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DE *Pseudocercospora griseola*.**

<b>Nome</b>	<b>Sigla</b>	<b>Composição</b>	<b>Fonte</b>
Meio de batata-ágar	BA	0,2 L de extrato filtrado de batatas cozidas <sup>1</sup> ; 4 g de ágar.	Adaptado de: Riker; Riker, 1936. In: Menezes; Silva-Hanlin, 1997.
Meio de batata-dextrose-ágar	BDA	0,2 L de extrato filtrado de batatas cozidas <sup>1</sup> ; 4 g de dextrose; 4 g de ágar.	Riker; Riker, 1936. In: Menezes e Silva-Hanlin, 1997.
Meio de suco de tomate	ST	0,2 L de água destilada; 0,047 L de suco de tomate <sup>2</sup> ; 0,33 g de carbonato de cálcio; 1,6 g de ágar.	Dalla Pria; Bergamin Filho; Amorim, 1997.
Meio de extrato de tomate	ET	0,2 L de água destilada; 35 g de extrato de tomate; 0,5 g de carbonato de cálcio; 2,4 g de ágar.	Dalla Pria; Bergamin Filho; Amorim, 1997.
Meio de alimento infantil	AI	0,2 L de água destilada; 40 g de alimento infantil <sup>3</sup> ; 0,8 g de carbonato de cálcio; 8 g de ágar.	Santos Filho et al., 1976. Adaptado por Dalla Pria; Bergamin Filho; Amorim, 1997.
Meio de extrato de folhas de feijoeiro-ágar	FFA	Extrato filtrado de folhas de feijoeiro <sup>4</sup> ; 4 g de ágar; água destilada até completar o volume de 0,2 L.	Adaptado de: Silveira, 1967.
Meio de extrato de folhas de feijoeiro-dextrose-ágar	FFD	Extrato filtrado de folhas de feijoeiro <sup>4</sup> ; 2 g de dextrose; 4 g de ágar; água destilada até completar o volume de 0,2 L.	Silveira, 1967.
Meio de suco de vegetais V8	V8	0,04 L de suco de vegetais V8 <sup>5</sup> ; 0,6 g de carbonato de cálcio; 3 g de ágar; água destilada até completar o volume de 0,2 L.	Campos; Fucikovskyy, 1980.
Meio de aveia-ágar	AA	0,2 L de água destilada; 10 g de farinha de aveia; 3 g de ágar.	Adaptado de: Dias Neto, 2010.
Meio de aveia-dextrose-ágar	AD	0,2 L de água destilada; 10 g de farinha de aveia; 4 g de dextrose; 3 g de ágar.	Dias Neto, 2010.
Meio de banana-ágar	BAG	0,2 L de água destilada; 120 g de banana; 4 g de ágar.	Adaptado de: Cano <i>et al.</i> , 2020.
Meio Czapek Ágar	CZ	0,2 L de água destilada; 0,6 g de NaNO <sub>3</sub> ; 0,2 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 0,1 g de MgSO <sub>4</sub> ; 0,1 g de KCL; 0,002 g de FeSO <sub>4</sub> ; 6 g de sacarose; 3 g de ágar.	Tuite, 1969.

<sup>1</sup> Extrato preparado com 200 g de batatas cozidas durante 20 minutos em 1 L de água destilada;

<sup>2</sup> Suco de tomate integral, sem conservantes, Superbom®;

<sup>3</sup> Alimento infantil à base de carne, legumes e macarrão, Nestlé®;

<sup>4</sup> Extrato preparado com 60 g de folhas de feijoeiro, trituradas em liquidificador com 0,1 L de água destilada e posteriormente fervidas em banho-maria por 45 minutos;

<sup>5</sup> Suco de vegetais V8 Campbell's®.