

# Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e Indução de Resistência em Feijoeiro com Uso de *Trichoderma* spp.

## Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* and Induction of Resistance in Common Bean using *Trichoderma* spp.

Janaina Silva Sarzia\*<sup>a</sup>; Lucas Gracioli Savian<sup>b</sup>; Leonardo Fellipe da Silva Cruz Couto<sup>c</sup>; Luciane Almeri Tabaldi<sup>d</sup>; Júlio Carlos Pereira da Silva<sup>d</sup>; Marlove Fátima Brião Muniz<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Agronomia. RS, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Florestal. RS, Brasil

<sup>c</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biologia Vegetal. MG, Brasil

<sup>d</sup>Universidade Federal de Santa Maria. RS, Brasil.

\*E-mail: [janassarzi@gmail.com](mailto:janassarzi@gmail.com)

### Resumo

*M. phaseolina* é um dos patógenos habitantes de solo que causa grandes danos ao feijoeiro, portanto, estratégias que visam controlar o patógeno e promover maior resistência às plantas são requeridas. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito de *Trichoderma* spp., na forma de suspensão de conídios ou filtrado de cultura, no biocontrole de *M. phaseolina* e indução de resistência em feijoeiro. Para isso, foram realizados testes *in vitro* de confronto direto, metabólitos voláteis e de filtrado de cultura, utilizando cinco isolados de *Trichoderma* spp. e um isolado do patógeno. Ao final dos testes foi determinado o percentual de inibição do crescimento micelial do patógeno. Para os testes *in vivo* foram selecionados três isolados de *Trichoderma* spp., utilizando-os na forma de suspensão de conídios e filtrado de cultura para o tratamento das sementes. O patógeno foi inoculado via substrato por meio de grãos de arroz colonizados. Durante a condução do experimento foram realizadas avaliações da severidade da doença e coleta de material vegetal para as análises bioquímicas referentes à indução de resistência. Os resultados demonstram que *Trichoderma* spp. controlam *M. phaseolina* por meio dos mecanismos de parasitismo e antibiose, observados nos testes *in vitro*, bem como reduzem a severidade da podridão cinzenta do caule na cultura do feijão, pela indução de resistência e pela melhoria no enfrentamento as espécies reativas de oxigênio causadas pelo ataque do patógeno, identificado pela potencialização da atividade das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*. Superóxido Dismutase. Guaiacol Peroxidase. Peróxido de Hidrogênio.

### Abstract

*M. phaseolina* is one of soil-inhabiting pathogens that cause great damage to bean plants, therefore, strategies that aim to control the pathogen and promote greater plant resistance are necessary. Therefore, the objective of the study was to evaluate the effect of *Trichoderma* spp., in the form of conidial suspension or culture filtrate, on the biocontrol of *M. phaseolina* and induction of resistance in bean. For this, *in vitro* tests of direct confrontation, volatile metabolites and culture filtrate tests were carried out, using five isolates of *Trichoderma* spp. and an isolate of the pathogen. At the end of the tests, the percentage of inhibition of mycelial growth of the pathogen was determined. For *in vivo* tests, three isolates of *Trichoderma* spp. were selected, using them in the form of conidial suspension and culture filtrate for seed treatment. The pathogen was inoculated via substrate through colonized rice grains. During the experiment, assessments of the severity of the disease were carried out and plant material was collected for biochemical analyzes related to the induction of resistance. The results demonstrate that *Trichoderma* spp. control *M. phaseolina* through the mechanisms of parasitism and antibiosis, observed in *in vitro* tests, as well as reduce the severity of gray stem rot in bean crops, by inducing resistance and improving the fight against reactive species of toxicity caused by the pathogen attack, identified by the activity potentiation of the enzymes superoxide dismutase and guaiacol peroxidase.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. Superoxide Dismutase. Guaiacol Peroxidase. Hydrogen Peroxide.

### 1 Introdução

A podridão cinzenta do caule no feijoeiro causada por *Macrophomina phaseolina* está entre as doenças mais destrutivas da cultura. Os sintomas variam de cancrs pretos até lesões que podem se estender por todo o caule, resultando em murcha, clorose sistêmica e, por fim, no tombamento e morte da planta (Wendland *et al.*, 2016). O controle do patógeno é um desafio decorrente de sua agressividade e a capacidade de sobreviver sob diversas condições (Lodha; Mawar, 2020). Dessa forma, o controle biológico se torna uma medida promissora de controle que, integrada a outras, garante melhores resultados.

*Trichoderma* é um gênero fúngico amplamente utilizado

no controle de fitopatógenos (Ngo *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2016). Sua utilização no tratamento de plantas de feijão levou a uma ativação dos mecanismos de proteção, evidenciado pela maior atividade de enzimas de defesa e maior expressão de genes relacionados à defesa (Eslahi *et al.*, 2021). Formulações baseadas em metabólitos microbianos também podem ser uma alternativa eficaz no controle e, ao mesmo tempo, reparar as dificuldades associadas ao uso de cepas de micro-organismos vivos, tais como sensibilidade a variações das condições ambientais e de armazenamento (Woo *et al.*, 2014).

A interação com o antagonista resulta em efeitos benéficos para a planta, incluindo proteção direta contra o ataque de patógenos. Essa interação desencadeia respostas bioquímicas,

como a geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que atua como agente antimicrobiano, molécula sinalizadora e substrato para enzimas antioxidantes (Eslahi *et al.*, 2021). Há evidências de que *Trichoderma* spp. precisa ativar as defesas da planta desde os estágios iniciais da interação, mesmo antes que a resposta inicial de resistência sistêmica adquirida (SAR) atinja sua máxima intensidade (Monte; Bettiol; Hermosa, 2019).

Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito de *Trichoderma* spp., na forma de suspensão de conídios ou filtrado de cultura, no biocontrole de *M. phaseolina* e indução de resistência em feijoeiro.

## 2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia Elocy Minussi e na casa de vegetação do Departamento de Defesa Fitossanitária e as análises bioquímicas realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal

do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Santa Maria, município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Para a condução dos experimentos foram utilizados um isolado de *Macrophomina phaseolina* (PEL) proveniente da Coleção de Micro-organismos Multifuncionais e Fitopatogênicos da Embrapa Arroz e Feijão, e cinco isolados de *Trichoderma*: *Trichoderma virens* (TF1), proveniente de solo rizosférico de feijoeiro, *Trichoderma asperellum* (TR1) e *Trichoderma asperellum* (TR4), provenientes de solo rizosférico de nogueira-pecã, os quais pertencem à coleção de micro-organismos do laboratório de fitopatologia Elocy Minussi, *Trichoderma harzianum* (ECO), proveniente de produto comercial Ecotrich® e *Trichoderma harzianum* (SC), proveniente de produto comercial Stimu Control® (Quadro 1). Os isolados foram cultivados previamente em meio batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias.

**Quadro 1** - Descrição dos isolados de *M. phaseolina* e *Trichoderma* spp. quanto à espécie e codificação do isolado, coordenadas (GMS) do local de coleta, registro no GenBank/produto, acesso SMDB e código do Sisgen

Espécie e codificação do isolado	Coordenadas (GMS) do local de coleta	Registro GenBank/ Produto	Código SMDB	Código Sisgen
<i>Macrophomina phaseolina</i> -PEL	-	MK450343	18.319	-
<i>Trichoderma virens</i> - TF1	28°6'31" S – 55°0'18" O	MK450344	18.320	A28E445
<i>Trichoderma harzianum</i> - SC	-	22516	-	-
<i>Trichoderma harzianum</i> – ECO	-	04213	-	-
<i>Trichoderma asperellum</i> - TR1	29°43'29"S – 53°43'0,51"O	MK982653	18.371	A32646D
<i>Trichoderma asperellum</i> – TR4	29°43'29"S – 53°43'0,51"O	MN082152	18.372	A32646D

Fonte: dados da pesquisa.

### 2.1 Preparo dos filtrados de cultura de *Trichoderma* spp.

Para a produção do filtrado de cultura dos isolados de *Trichoderma* spp. utilizou-se Erlenmeyers de 250 mL contendo meio de cultura líquido, composto por 100 mL de água destilada, 7,5 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 20 g.L<sup>-1</sup> de água de maceração de milho (proveniente de resíduo industrial), 100 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5 (Sarzi, 2019). Em seguida, foram autoclavados a 120 °C por 20 min e, após atingir temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL da suspensão de conídios de cada isolado na concentração de 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. Após, os Erlenmeyers foram incubados em Shaker (Tecnal® shakermodel TE-4200) a 28 °C e fotoperíodo de 12h, por 96 horas sob agitação constante de 180 rpm. Após o período de fermentação, os caldos fermentados foram filtrados, primeiramente em membrana Milipore® de 11 micras com auxílio de bomba de vácuo, removendo a biomassa microbiana. Em seguida, foi realizada uma segunda filtragem dos meios em membrana milipore® de 0,22 micras, para remoção das células fúngicas.

## 2.2 Ensaio *in vitro*

### 2.2.1 Teste de confronto direto

Para avaliar o potencial dos isolados de *Trichoderma*

spp. na inibição do crescimento micelial do patógeno, foi utilizada a técnica de confrontação direta. Para tanto, discos de micélio do fitopatógeno + BDA (batata-dextrose-ágar) foram retirados de placas em que esse foi cultivado por sete dias e, posteriormente, estes foram depositados a 1,0 cm da borda interna de outra placa de Petri contendo meio de cultura BDA. Após, foi realizada a transferência individual de discos de mesmo diâmetro dos isolados de *Trichoderma*, previamente cultivados em meio de cultura BDA por sete dias, colocando-o de forma oposta ao disco do patógeno. Para testemunha, colocou-se somente um disco do patógeno em uma das extremidades da placa. As placas foram mantidas a temperatura de 25 ±2 °C e fotoperíodo de 12 h, até o patógeno colonizar toda a superfície do meio nas placas do tratamento testemunha.

### 2.2.2 Teste de metabólitos voláteis

O efeito inibidor de metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp. foi testado por meio da utilização de duas bases de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo BDA, sendo transferido para o centro de uma placa, um disco (5mm) da cultura do patógeno e no centro de outra placa um disco (5 mm) da cultura do antagonista. Após as bases das placas foram sobrepostas e unidas com plástico filme.

Como tratamento testemunha, foram sobrepostas duas bases, uma contendo o patógeno e a outra somente meio BDA. As placas foram incubadas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 h até o patógeno colonizar toda a superfície do meio nas placas do tratamento testemunha.

### 2.2.3 Teste de filtrado de cultura

Baseando-se no estudo de Cruz *et al.* (2012) com modificações, os filtrados de cultura dos isolados de *Trichoderma* spp. foram colocados no centro de placas de Petri (90 mm) contendo meio de cultura BDA, na proporção de 100  $\mu\text{L}$  por placa, nas concentrações de 100% (filtrado de cultura puro) e 50% (filtrado diluído com água destilada e esterilizada). Após, o filtrado foi distribuído sobre a superfície do meio com auxílio de alça de Drigalsky e, em seguida, um disco de 5 mm de diâmetro, contendo meio BDA + patógeno foi transferido para o centro das placas.

### 2.2.4 Avaliações e análise estatística

Para cada teste foram utilizadas quatro repetições por tratamento e, ao final de cada um desses, foi mensurado o crescimento micelial do patógeno em dois sentidos opostos, obtendo-se a média do crescimento micelial que foi utilizada para determinar o percentual de inibição do crescimento micelial calculado por meio da fórmula:  $((\text{Crescimento micelial da testemunha} - \text{crescimento micelial do tratamento}) / (\text{Crescimento micelial da testemunha})) \times 100$ . Após os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), utilizando o software Sisvar 5.3 (Ferreira, 2011).

### 2.2.5 Microscopia eletrônica de varredura

Ao final dos testes *in vitro* foram retirados discos de micélio do fitopatógeno mais meio BDA, para analisar o efeito dos isolados do antagonista sobre as estruturas do patógeno. O material retirado foi colocado em dessecador por 48h para posterior análise em microscópio eletrônico de varredura.

A morfologia das estruturas fúngicas foi caracterizada usando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Tescan, VEGA-3G, República Tcheca), acoplado com um detector de elétrons secundários (SE) para obtenção das imagens. Para estas análises, as amostras foram recobertas com ouro (processo de metalização via *sputtering*, usando uma corrente de 30 mA por 120 segundos - Desk V da Denton Vacuum).

## 2.3 Ensaios *in vivo*

Para os testes *in vivo* foram selecionados três isolados de *Trichoderma* spp., um de cada espécie, que se apresentaram promissores nos testes *in vitro*, sendo esses: *T. virens* (TF1), *T. harzianum* (SC) e *T. asperellum* (TR1). Como substrato foi utilizada areia esterilizada em vasos de 700 mL. Foram utilizadas sementes da cultivar Fepagro Triunfo, semeadas quatro sementes por vaso, sendo realizado o desbaste 10

dias após a semeadura, mantendo-se uma planta por vaso. Foram realizadas irrigações controladas com solução nutritiva (16g.40L<sup>-1</sup> de Nitrato de potássio; 5,4 g.40L<sup>-1</sup> de MKP; 15,2g.40L<sup>-1</sup> Sulfato de magnésio; 37,16g.40L<sup>-1</sup> de Nitrato de cálcio; 0,8g.40L<sup>-1</sup> de ferro e 1,2g.40L<sup>-1</sup> de micronutrientes), mantida em pH entre 5,5 e 6 e condutividade elétrica (CE) de 1,5 mS.cm<sup>-1</sup> baseando-se no estudo de Basso *et al.* (2012).

### 2.3.1 Preparo da suspensão de conídios

Após o crescimento dos isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura BDA, foi adicionada água destilada e esterilizada na placa de Petri e com auxílio de uma alça de Drigalski, raspada a colônia, a fim de obter uma suspensão de conídios. Em seguida, essa suspensão de conídios foi filtrada com dupla camada de gaze para retirar os fragmentos de micélio. Por fim, quantificou-se a concentração em câmara de Neubauer, calibrando-a posteriormente para 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup>.

### 2.3.2 Tratamento das sementes

Para o tratamento das sementes com filtrado de cultura dos isolados de *Trichoderma* spp., utilizou-se 1 mL do filtrado para cada 200 sementes de feijão. Já para o tratamento das sementes com a suspensão de conídios dos isolados foi utilizado 1 mL da suspensão na concentração de 10<sup>7</sup> conídios mL<sup>-1</sup> para cada 200 sementes de feijão. Após a homogeneização das sementes tratadas, estas foram imediatamente semeadas.

### 2.3.3 Inoculação de *M. phaseolina*

O inóculo de *M. phaseolina* foi preparado em Erlenmeyers, contendo grãos de arroz sem casca, previamente umedecidos com água destilada (100 mL de água/ 50 g de arroz) por 10 min e, posteriormente, esterilizados em autoclave por 20 minutos a 120 °C. Após o resfriamento dos grãos, foram adicionados 20 discos de 5 mm contendo micélio, provenientes de culturas puras de *M. phaseolina* e transferidos para BOD, permanecendo por dez dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente,  $\pm$  três grãos de arroz colonizados foram depositados no substrato a uma profundidade de 5 cm e, sobre esses foram colocadas as sementes de feijão, de acordo com a metodologia de Cruciol e Costa (2018) com modificações.

### 2.3.4 Avaliações e análise estatística

A severidade da doença foi avaliada aos 33 dias após a semeadura (DAS) utilizando uma escala de notas de Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987) que consiste: 1- ausência de sintomas visíveis da doença; 3- sintomas da doença restritos aos cotilédones ou o ponto de inoculação; 5- aproximadamente, 10% do hipocótilo e ramos inferiores cobertos de lesões e, muitas vezes, combinado com estruturas de frutificação do fungo; 7- aproximadamente 25% do hipocótilo e ramos inferiores coberto de lesões e, muitas vezes, combinado com estruturas de frutificação do fungo;

9- Aproximadamente 50% ou mais do hipocótilo e ramos inferiores cobertos de lesões e com um grande número de estruturas frutíferas do fungo; considerando também os sintomas no epicótilo.

As avaliações de indução de resistência foram realizadas por meio de coletas de plantas aos 42 dias após a sementeira e aplicação dos tratamentos com os antagonistas. O material vegetal coletado para as análises bioquímicas foi colocado em papel alumínio e mantido em nitrogênio líquido até o final da coleta, posteriormente, foi congelado em ultrafreezer (-80 °C) para conservar as amostras até as análises. As análises bioquímicas compreenderam a determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de acordo com a metodologia de Loreto e Velikova (2001); a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Giannopolitis e Ries (1977); a atividade da enzima guaiacol peroxidase (POD), segundo Zeraik *et al.* (2008), utilizando o guaiacol como substrato; a concentração total de proteínas solúveis foi medida utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina de acordo com o Método de Bradford (Bradford, 1976) e; a peroxidação de lipídios de membrana, estimada pelo método de El-Moshaty *et al.* (1993).

O delineamento experimental para os testes *in vivo* foi o inteiramente casualizado, em bifatorial 2 (inoculado e não inoculado pelo patógeno) x 7 (controle (sem nenhum tratamento à base de *Trichoderma* spp.); suspensão de conídios de TF1; filtrado de cultura de TF1; suspensão de conídios de SC; filtrado de cultura de SC; suspensão de conídios de TR1; filtrado de cultura de TR1), em que cada tratamento foi composto por quatro repetições e cada vaso constituiu uma unidade experimental. O conjunto de dados foi submetido à análise de variância em bifatorial, exceto para as análises de severidade da doença, e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott (P < 0,05) utilizando o software Sisvar 5.3 (Ferreira, 2011).

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Ensaios *in vitro*

Em relação aos testes *in vitro* (Quadro 2), no confronto direto, o isolado ECO (*T. harzianum*) foi o que obteve maior percentual de inibição (43,19%) diferindo estatisticamente dos demais. Corroborando com os resultados encontrados, Broetto *et al.* (2014) também observaram que no teste de confronto direto, *T. harzianum* foi o que apresentou maior inibição no crescimento micelial de *M. phaseolina*.

No teste de metabólitos voláteis, a maior inibição foi de 29,65% no tratamento com o isolado TR1 (*T. asperellum*) o que também já foi demonstrado frente a *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum dematium* var. *truncata* (Gabardo *et al.*, 2020). Nos testes com filtrado de cultura na concentração de 100%, as maiores inibições foram observadas nos tratamentos TR1 e TR4, ambos isolados de *T. asperellum*.

Na concentração de 50% do filtrado de cultura, o tratamento TR1 também apresentou maior inibição do crescimento micelial do patógeno. *Trichoderma* spp. é um gênero fúngico com potencial para produção de metabólitos secundários bioativos, com ação antibacteriana, nematocida (Khan *et al.*, 2020) e antifúngica (Ngo *et al.*, 2021).

**Quadro 2** - Percentual de inibição do crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* nos testes de confronto direto (CD), metabólitos voláteis (MV) e filtrado de cultura (FC) 100% e 50% de *Trichoderma* spp.

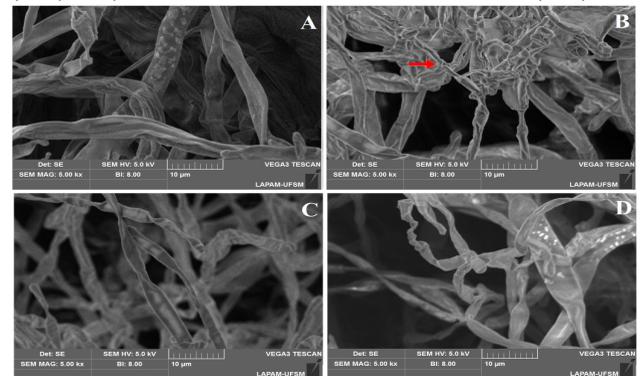
Tratamentos/ isolados	CD	MV	FC 100	FC 50
TF1	40,12 b*	0,00 b	0,00 b	0,08 d
TR1	38,50 b	29,65 a	4,20 a	15,46 a
TR4	34,43 c	0,73 b	6,35 a	1,73 c
SC	35,99 c	3,43 b	1,21 b	3,12 c
ECO	43,19 a	0,00 b	0,00 b	11,92 b
CV (%)	3,73	44,71	73,24	17,84

\*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott (P ≤ 0,05). TF1: isolado de *T. virens*; TR1: isolado de *T. asperellum*; TR4: isolado de *T. asperellum*; SC: isolado de *T. harzianum*; ECO: isolado de *T. harzianum*.

Fonte: dados da pesquisa.

As hifas do antagonista envoltas nas hifas do patógeno está indicada na seta vermelha na Figura 1. O efeito de *Trichoderma* spp., na morfologia das estruturas fúngicas de *M. phaseolina*, foi observado por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados mostram no teste de confronto direto com *T. virens*, as hifas do antagonista envoltas nas do patógeno (Figura 1B). Nos testes de metabólitos voláteis e filtrado de cultura, é possível observar deformação das hifas do patógeno quando submetido ao tratamento com *T. virens* (Figura 1C e D).

**Figura 1** - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *M. phaseolina* A) sem tratamento; B) em confronto direto com *T. virens* (TF1); C) em teste de metabólitos voláteis com *T. virens* (TF1) e; D) em teste de filtrado de cultura de *T. virens* (TF1)



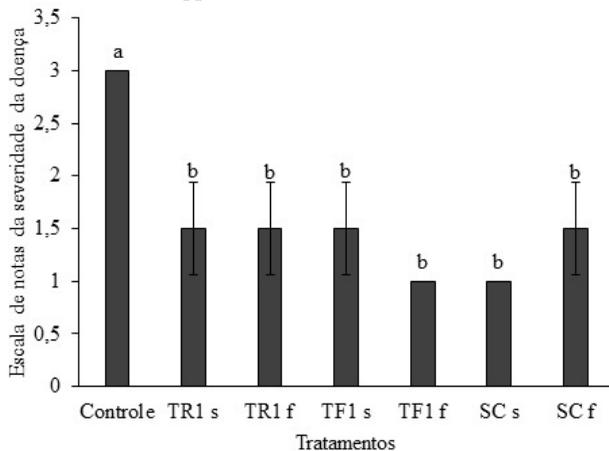
Fonte: dados da pesquisa.

#### 3.2 Ensaios *in vivo*

Na severidade da doença (Figura 2) foi observado que os tratamentos com *Trichoderma* spp., na forma de suspensão de conídios ou filtrado de cultura, foram eficientes em reduzir os danos causados por *M. phaseolina*, não apresentando diferença estatística entre si, no entanto, foram significativamente

diferentes em relação ao tratamento controle. Em média, os tratamentos com *Trichoderma* spp. apresentaram uma redução na severidade da doença de 55%.

**Figura 2** - Severidade da podridão cinzenta do caule causada por *Macrophomina phaseolina* em plantas de feijoeiro sob tratamento com *Trichoderma* spp.



Para cada coluna, os valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ). As barras verticais representam o erro padrão da média. Controle: sem nenhum tratamento à base de *Trichoderma* spp.; TR1 s: suspensão de conídios de *T. asperellum*; TR1 f: filtrado de cultura de *T. asperellum*; TF1 s: suspensão de conídios de *T. vires*; TF1 f: filtrado de cultura de *T. vires*; SC s: suspensão de conídios de *T. harzianum*; SC f: filtrado de cultura de *T. harzianum*.

Fonte: dados da pesquisa.

O efeito de *Trichoderma* spp. sobre a severidade da doença ocorre devido ao controle direto do patógeno por meio de mecanismos de antibiose, micoparasitismo, competição (Mukhopadhyay; Kumar, 2020), ou induzindo resistência às plantas. A estimulação de mecanismos de defesa das plantas pode ocorrer por moléculas liberadas pelas hifas e não necessariamente pelo fungo vivo, e é por meio do reconhecimento dessas moléculas por receptores vegetais que ocorre a indução de resistência em plantas (Nawrocka; Malolepsza, 2013).

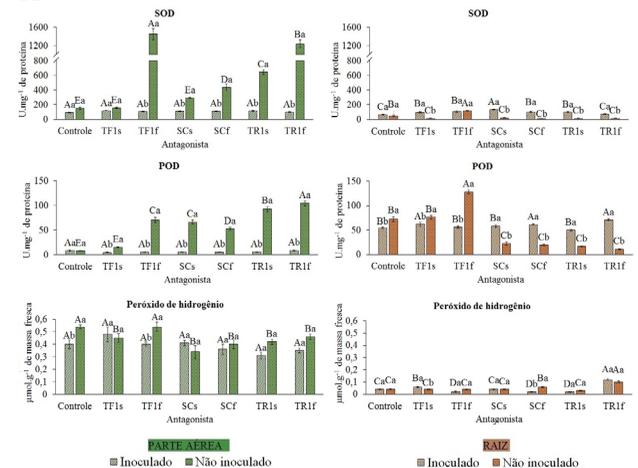
Estresses bióticos, como a infecção por fitopatógenos, causam estresse oxidativo que induz a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, sendo  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  as mais importantes e produzidas que se acumulam rapidamente após um estresse (Zhang *et al.*, 2016). Algumas cepas de *Trichoderma*, ao suportarem o estresse oxidativo, apresentam vantagem na rizosfera das plantas, pois é onde são produzidas e liberadas espécies reativas de oxigênio (EROs) como consequência das respostas de imunidade emitidas pelas plantas, em função do reconhecimento dos efetores dos patógenos (Monte; Bettiol; Hermosa, 2019).

Quanto às análises das enzimas antioxidantes, pôde-se observar que a atividade da superóxido dismutase (SOD) na parte aérea das plantas foi superior à das raízes, com destaque para os tratamentos TF1 f e TR1 f sem a inoculação do patógeno (Figura 3). Como a SOD é responsável pela dismutação do  $O_2^-$  e  $HO_2^+$  a  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio), maiores níveis

de  $H_2O_2$  também foram observados nas análises da parte aérea das plantas. No presente estudo, os principais sintomas da doença se concentraram na região dos cotilédones, podendo ter contribuído para o estresse da planta nessa região e a maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Várias enzimas estão relacionadas ao estresse oxidativo, a superóxido dismutase (SOD) transforma os radicais superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), a guaiacol peroxidase (POD) reduz o  $H_2O_2$  a água, utilizando vários substratos como doadores de elétrons, a ascorbato peroxidase (APX) utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir o  $H_2O_2$  a água, e a catalase (CAT) dismuta o  $H_2O_2$  em água e oxigênio (Wang *et al.*, 2009). Dessa forma, é importante o funcionamento e a relação dessas enzimas, pois o  $H_2O_2$  também apresenta toxicidade para as células, tornando necessária a sua remoção (Gutierrez-Martinez *et al.*, 2020).

**Figura 3** - Atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (POD) e peróxido de hidrogênio em plantas de feijoeiro inoculadas ou não com *Macrophomina phaseolina* e sob tratamento com *Trichoderma* spp



Médias seguidas por letra maiúscula diferente entre os níveis do fator antagonista e minúscula entre a presença e ausência do patógeno do mesmo nível do fator antagonista, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ( $P < 0,05$ ). As barras verticais representam o erro padrão da média. TR1 s: suspensão de conídios de *T. asperellum*; TR1 f: filtrado de cultura de *T. asperellum*; TF1 s: suspensão de conídios de *T. vires*; TF1 f: filtrado de cultura de *T. vires*; SC s: suspensão de conídios de *T. harzianum*; SC f: filtrado de cultura de *T. harzianum*.

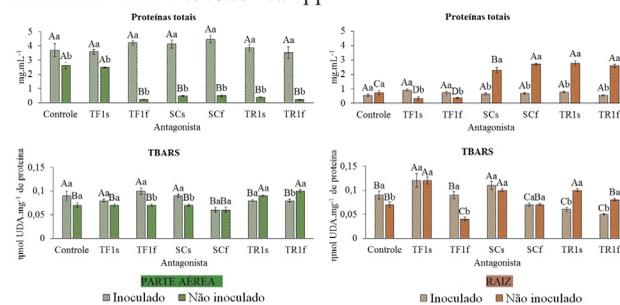
Fonte: dados da pesquisa.

Na parte aérea, a atividade das enzimas foi maior especialmente nos tratamentos com *Trichoderma* spp. sem a inoculação do patógeno. Já na raiz, a maior atividade ocorreu nos tratamentos com inoculação do patógeno. A produção de peróxido de hidrogênio, tanto na parte aérea quanto na raiz, na grande maioria dos tratamentos não diferiu com ou sem a inoculação do patógeno, mas entre os tratamentos com *Trichoderma* spp. O  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  na presença de metais de transição, podem dar origem ao radical hidroxila (OH) altamente tóxico, portanto, a rápida desintoxicação desses elementos é essencial para prevenir danos oxidativos (Wang *et al.*, 2009). As EROs são altamente tóxicas, podendo oxidar

macromoléculas biológicas, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, causando peroxidação lipídica, danos à membrana e inativação de enzimas (Zhang *et al.*, 2009).

Em relação às proteínas totais, na parte aérea a concentração foi maior nos tratamentos sob inoculação dos patógenos, enquanto nas raízes a maior concentração ocorreu na maioria dos tratamentos sem inoculação do patógeno (Figura 4). Pesquisas identificaram em filtrados de cultura de *Trichoderma* spp. a atividade de enzimas degradadoras de parede celular, como a  $\beta$ -1,3-glucanase, que atuaram na restrição do crescimento fúngico (Wonglom *et al.*, 2019). Além disso, *T. asperellum* demonstrou capacidade de induzir respostas de defesa ao aumentar a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase (Baiyee; Ito; Sunpapao, 2019). A habilidade dos micro-organismos antagonistas em produzir enzimas degradadoras da parede celular e a capacidade de induzir as plantas a produzirem essas enzimas, demonstra que a utilização de um agente de controle biológico pode ser de grande interesse para o manejo de doenças de plantas (Intana *et al.*, 2022).

**Figura 4** - Concentração de proteínas totais e peroxidação de lipídeos de membrana (TBARS) em plantas de feijoeiro inoculadas ou não com *Macrophomina phaseolina* e sob tratamento com *Trichoderma* spp



Médias seguidas por letra maiúscula diferente entre os níveis do fator antagonista e minúscula entre a presença e ausência do patógeno do mesmo nível do fator antagonista, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ( $P < 0,05$ ). As barras verticais representam o erro padrão da média. TR1 s: suspensão de conídios de *T. asperellum*; TR1 f: filtrado de cultura de *T. asperellum*; TF1 s: suspensão de conídios de *T. virens*; TF1 f: filtrado de cultura de *T. virens*; SC s: suspensão de conídios de *T. harzianum*; SC f: filtrado de cultura de *T. harzianum*.

**Fonte:** dados da pesquisa.

Nas análises de peroxidação de lipídeos de membrana na parte aérea e na raiz, observou-se que os resultados da inoculação ou não do patógeno não seguiram um padrão, variando de acordo com os tratamentos à base de *Trichoderma* spp. No entanto, pôde-se observar que o tratamento SC f, além de não apresentar diferença entre as plantas inoculadas ou não pelo patógeno, também foi um dos tratamentos que apresentou menores danos aos lipídeos de membrana (Figura 4).

#### 4 Conclusão

*Trichoderma* spp. controlam *M. phaseolina* por meio dos mecanismos de parasitismo e antibiose, observados nos testes *in vitro*, bem como reduzem a severidade da podridão cinzenta do caule na cultura do feijão, pela indução de resistência e

pela melhoria no enfrentamento das espécies reativas de oxigênio causadas pelo ataque do patógeno, identificado pela potencialização da atividade das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase.

#### Referências

- 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.). *Phys. Mol. Plant Pathol.*, v.106, p.96-101, 2019. doi: 10.1016/j.pmp.2018.12.009.
- BASSO, J.M.; TAKAHASHI, H.W.; FREGONEZI, G.A.F. Cultivo de feijão-vagem em vaso em diferentes substratos e condutividades elétricas da solução nutritiva. *Semina: Ciênc. Agrár.*, v.33, n.6, p.2149-2162, 2012. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n6p2149.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-254, 1976. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- BROETTO, L. *et al.* Crescimento micelial e produção de microescleródios de *Macrophomina phaseolina* confrontado com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. *Sci. Agr. Paran.*, v.13, n.4, p.310-317, 2014. doi: 10.18188/sap.v13i4.7893.
- CRUCIOL, G.C.D.; COSTA, M.L.N. Influência de metodologias de inoculação de *Macrophomina phaseolina* no desempenho de cultivares de soja. *Summa Phytopathol.*, v.44, n.1, p.32-37, 2018. doi: 10.1590/0100-5405/2185.
- CRUZ, T.P. *et al.* Composição química e avaliação do potencial fungicida do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* sobre *Fusarium solani* UENF/163 da goiabeira. *Enciclopédia Biosfera*, v. 8, n. 15, 2012.
- EL-MOSHATY, F.I.B.; PIKE, S.M.; NOVACKY, A.J.; SEHGAL, O.P. Lipid peroxidation and superoxide productions in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco rings virus or southern bean mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v.43, p.109-119, 1993. doi: 10.1006/pmp.1993.1044.
- ESLAHI, N. *et al.* The profile change of defense pathways in *Phaseolus vulgaris* L. by biochemical and molecular interactions of *Trichoderma harzianum* transformants overexpressing a chimeric chitinase. *Biol. Control*, v.152, p.104304, 2021. doi: 10.1016/j.biocontrol.2020.104304.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. Agrotecnol. (UFLA)*, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011. doi: 10.1590/S1413-70542011000600001.
- GABARDO, G. *et al.* *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. *Braz. J. Develop.*, v.6, n.8, p.55870-55885, 2020. doi: 10.34117/bjdv6n8-123.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiol.*, v.48, n.59, p.315-318, 1977. doi: 10.1104/pp.59.2.315.
- GUTIÉRREZ-MARTÍNEZ, P. B. *et al.* Assessment of antioxidant enzymes in leaves and roots of *Phaseolus vulgaris* plants under cadmium stress. *Biotechnia*, v.22, n.2, p.110-118, 2020. doi: 10.18633/biotechnia.v22i2.1252.
- INTANA, W. *et al.* *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 induced expression of pathogenesis-related protein genes against gummy stem blight of muskmelon (*Cucumis melo*) in field evaluation. *J. Fungi*, v.8, n.2, p.156, 2022. Doi: 10.3390/jof8020156.

- KHAN, R.A.A. *et al.* Bioactive secondary metabolites from *Trichoderma* spp. against phytopathogenic bacteria and root-knot nematode. *Microorganisms*, v.8, n.3, p.401, 2020. doi: 10.3390/microorganisms8030401.
- LODHA, S.; MAWAR, R. Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease management: a review. *J. Phytopathol.*, v.168, n.1, p.1-17, 2020. doi: 10.1111/jph.12854.
- LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.*, v.127, p.1781-1787, 2001. doi: 10.1104/pp.010497.
- MONTE, E.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R. *Trichoderma* e seus mecanismos de ação para o controle de doenças de plantas. In: MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J. C. (Ed.) *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília: Embrapa, 2019. p.181-199.
- MUKHOPADHYAY, R.; KUMAR, D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egy. J. Biol. Pest Control*, v.30, n.1, p.1-8, 2020. doi: 10.1186/s41938-020-00333-x.
- NAWROCKA, J.; MAŁOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biol. Control*, v.67, n.2, p.149-156, 2013. doi: 10.1016/j.biocontrol.2013.07.005.
- NGO, M.T. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of sorbicillinoids produced by *Trichoderma longibrachiatum*. *J. Fungi*, v.7, n.6, p. 428, 2021. doi: 10.3390/jof7060428.
- SARZI, J.S. *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Macrophomina phaseolina* e no crescimento de feijoeiro. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2019.
- SCHOONHOVEN, A.V.; PASTOR-CORRALES, M.A. Standard system for the evaluation of bean germplasm. Cali: CIAT, 1987.
- ZERAIK, A.E. *et al.* Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. *Quím. Nova*, v.31, p.731-734, 2008. doi: 10.1590/S0100-40422008000400003.
- ZHANG, F. *et al.* Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiol. Biochem.*, v.100, p.64-74, 2016. doi: 10.1016/j.plaphy.2015.12.017.
- ZHANG, F. *et al.* Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *J. Hazardous Mat.*, v.168, n.1, p.76-84, 2009. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.02.002.
- WANG, W.-B. *et al.* Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 47, n. 7, p. 570-577, 2009. doi: 10.1016/j.plaphy.2009.02.009.
- WENDLAND A. *et al.* Doenças do Feijoeiro. In: AMORIM, L. et al. (Ed.) *Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016. p.383-396.
- WONGLOM, P. *et al.* Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, v. 107, p.1-7, 2019. doi: 10.1016/j.pmpp.2019.04.007.
- WOO, S.L. *et al.* *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycol. J.*, v. 8, n. 1, 2014. doi: 10.2174/1874437001408010071.