

**UniRV - UNIVERSIDADE DE RIO VERDE**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**INDUÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE SOJA A**  
**ANTRACNOSE EM FUNÇÃO DA INOCULAÇÃO DE SEMENTES COM**  
**AGENTES DE BIOCONTROLE**

**NEILSON DE OLIVEIRA BORGES**

*Magister Scientiae*

**RIO VERDE**  
**GOIÁS - BRASIL**  
**2020**

**NEILSON DE OLIVEIRA BORGES**

**INDUÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE SOJA A ANTRACNOSE EM  
FUNÇÃO DA INOCULAÇÃO DE SEMENTES COM AGENTES DE BIOCONTROLE**

**Dissertação apresentada à UniRV – Universidade de Rio Verde, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae***

**RIO VERDE  
GOIÁS - BRASIL  
2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação-- (CIP)

Borges, Neilson de Oliveira

Indução de mecanismos de resistência de soja a antracnose em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole e / Neilson de Oliveira Borges. — 2020.

46f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos

Co-orientador: Prof. Dr. Antônio Jussê da Silva Solino

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) — Universidade de Rio Verde - UniRV, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Faculdade de Agronomia, 2020.

Inclui índice de tabelas e figuras.

1. *Colletotrichum truncatum*. 2. *Glycine max*. 3. Indução de resistência. I. Campos, Hercules Diniz. II. Solino, Antônio Jussê da Silva.

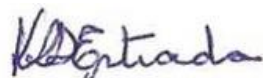
CDD:

NEILSON DE OLIVEIRA BORGES

**INDUÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE SOJA A ANTRACNOSE EM  
FUNÇÃO DA INOCULAÇÃO DE SEMENTES COM AGENTES DE BIOCONTROLE**

Dissertação apresentada à UniRV – Universidade de Rio Verde, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

APROVAÇÃO: 03 de dezembro de 2020



---

Profa. Dra. Kátia Regina de Freitas Schwan-Estrada  
Membro - FA/UEM - Universidade Federal de Maringá



---

Prof. Dr. Guilherme Braga Pereira Braz  
Membro - FA/UniRV



---

Prof. Dr. Antônio Jussê da Silva Solino  
Membro - De Lollo Pesquisa e Experimentação  
Agrícola



---

Prof. Dr. Hercules Diniz Campos  
Presidente da Banca Examinadora  
Membro - FA/UniRV

## DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente nas horas de angústia. Ao meu pai Lorenci Borges de Macedo, a minha mãe Jusonia Silvany de Oliveira Borges e aos meus irmãos.”

“Aos meus pais, irmãos, minha esposa Isanara Beatriz Balke Gomes de Oliveira, meus filhos e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços, para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.”

“Dedico este trabalho aos meus avós paternos e maternos, “In Memoriam”, pela existência de meus pais, pois sem eles este trabalho e muitos dos meus sonhos não se realizariam.”

“Ao Curso de Produção Vegetal da UniRV, e às pessoas com as quais convivi, ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos nesses espaços foram a melhor experiência de minha formação acadêmica.

Dedico e ofereço!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder a vida e a força para cumprir mais esta etapa profissional, pois nada me sobreveio se não pela tua misericórdia, que manteve minha mente e coração firmes, nos momentos de angústia, fornecendo a sua consolação.

A meus pais, Lorenci Borges de Macedo e Jusônia Silvany de Oliveira Borges, pelo amor, paciência e o apoio, por todos estes anos da minha carreira acadêmica. A vocês serei eternamente grato!

Aos meus irmãos, pela força e o entusiasmo, me estimulando sempre a buscar e conquistar o que antes não imaginaria que seria possível.

A minha esposa Isanara Beatriz, que sempre esteve ao meu lado independentemente da situação, em que encontrava meu emocional. A você, o meu eterno amor incondicional!

Ao meu grande irmão Ricardo Francischini, que não somente acreditou, mas que amparou-me por todo o período, em que passamos na cidade de Rio Verde.

A minha família Rioverdense, que posso citar alguns como; Humberto José da Silva e família, Izael Antônio do Nascimento e família. Serei eternamente grato pela recepção e a hospitalidade, por estes longos anos.

Ao professor Dr. Antônio Jussê da Silva Solino, pela Co-orientação deste trabalho, pela paciência e a enorme contribuição, na condução e na conclusão deste trabalho. Ao Sr. meus sinceros agradecimentos!

Ao professor Dr. Hercules Diniz Campos do laboratório de Fitopatologia da UniRV- Universidade de Rio Verde, por disponibilizar o seu tempo na revisão deste trabalho e pela paciência pelos percalços encontrados.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1 Cultura da soja.....	2
2.2 Doenças da soja.....	3
2.3 Antracnose.....	4
2.4 Métodos de controle da antracnose.....	6
2.5 Indução de resistência de planta à patógenos.....	8
2.6 Metabólitos secundários e enzimas relacionadas à defesa de plantas contra patógenos.....	9
2.6.1 Peroxidase.....	9
2.6.2 Catalase.....	10
2.6.3 Fenilalanina Amônia Liase.....	11
2.6.4 Fitoalexinas.....	11
2.6.5 Gliceolina.....	12
2.7 Agentes elicitores.....	12
2.7.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	13
2.7.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> .....	13
2.7.3 <i>Trichoderma asperellum</i> BV10.....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	18
5 CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	25

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Sintomas de antracnose em sementes (a) tombamento (b) e lesão no cotilédone (c), na haste (d), lesões nas haste (e;f), lesões nas nervuras das folhas (g) e na vagem (h) causado pelo *C. truncatum* na cultura da soja..... 5
- FIGURA 2 Características morfológicas de *Colletotrichum truncatum* cultivadas em meio PDA. a) Acérvulos; b) acervos e conídios; c) cerdas e conídios; (d, e) conídios; f) apressório..... 6
- FIGURA 3 Diâmetro da lesão de antracnose em cotilédones de soja no ensaio I e ensaio II em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole. *T. asperellum* *Trichoderma asperellum* BV10 (Tricho-Turbo®); *B. subtilis* BV02 (Bio-Imune®); *Bacillus amyloliquefaciens* BV03 (No-Nema®); NS=não significativo; Médias seguidas da mesma letra minúscula, na barra, não diferem entre si, pelo teste Fisher ( $p < 0,5$ ). 18



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Atividade específica de catalase (CAT) em cotilédones de soja em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole nos ensaios I e II	19
TABELA 2	Atividade específica de peroxidase do guaiacol (POX) em cotilédone de soja m função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole no ensaio I e ensaio II.....	20
TABELA 3	Atividade específica de fenilalanina amônia liase (FAL) em cotilédone de soja m função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole no ensaio I e ensaio II.....	21
TABELA 4	Acúmulo de gliceolina (GLI) em cotilédone de soja em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole no ensaio I e ensaio II.....	21
TABELA 5	Frequência de resultados das variáveis analisadas catalase (CAT), peroxidase do guaiacol (POX), fenilalanina amônia liase (FAL), gliceolina (GLI) e diâmetro da lesão de antracnose (DLA) em cotilédones de soja, em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole no ensaio I e ensaio II.....	22

## RESUMO

BORGES, Neilson de Oliveira. M.S., UniRV – Universidade de Rio Verde, dezembro de 2020. **Indução de mecanismos de resistência de soja a antracnose em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole.** Orientador: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos, Co-orientador: Dr. Antônio Jussie da Silva Solino.

A cultura da soja é acometida pela antracnose, que reduz a quantidade e a qualidade da produção do grão. O controle biológico, pensando no manejo integrado, tem sido inserido junto a outras técnicas, como à aplicação de fungicidas. O objetivo deste trabalho foi verificar a ação de isolados de *Trichoderma* e *Bacillus*, na indução de mecanismos de resistência da soja à antracnose, em função da inoculação de sementes. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, esquema fatorial 5 x 2 com cinco repetições. Sementes de soja foram tratadas com *Trichoderma asperellum* BV10, *Bacillus subtilis* BV02 e *B. amyloliquefaciens* BV03, Carbendazim + Thiram e testemunha (água destilada). Após o tratamento as sementes foram semeadas em substrato esterilizado e sete dias após a emergência foi realizada a inoculação de 2 µL de suspensão contendo  $1 \times 10^4$  esporos de *Colletotrichum truncatum* sobre os cotilédones. A atividade de catalase (CAT), peroxidase (POX), fenilalanina amônia liase (FAL), acúmulo da fitoalexina gliceolina (GLI) antes e após a inoculação do patógeno foram avaliadas bem como o diâmetro da lesão de antracnose em cotilédones. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos as médias comparadas pelo teste de Fisher ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos não influenciaram o primeiro horário de coleta antes da inoculação. O *T. asperellum* BV10 incrementou a atividade de POX e FAL em até 173% após a inoculação, assim o *B. amyloliquefaciens* BV03 aumentou a atividade de POX. A GLI não foi influenciada pelos tratamentos em nenhum horário de coleta e ensaio. O *T. asperellum* BV10 reduziu até 61% do diâmetro da lesão de antracnose. Assim, *T. asperellum* BV10 possui potencial no controle da antracnose da soja, aumentando a resposta defesa de plântulas à *C. truncatum*, quando realizado o tratamento de sementes. Qual o resultado do tratamento com fungicida e o controle?

Palavras chaves: *Colletotrichum truncatum*, *Glycine max*, indução de resistência.

## ABSTRACT

BORGES, Neilson de Oliveira. M.S., UniRV – Universidade de Rio Verde, julho de 2020. **Induction of soybean resistance mechanisms to anthracnose as a function of seed inoculation with biocontrol agents.** Adviser: Prof. Dr. Hercules Diniz Campos. Co-Adviser: Dr. Antônio Jussie da Silva Solino.

A soybean crop is affected by anthracnose, quantity and quality of grain production. The biological control, thinking about the integrated management, was inserted together with other techniques, such as fungicide application. The aims of this work were to verify the action of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates in the induction of soybean resistance mechanisms to anthracnose as a function of seed inoculation. The statistical design was entirely randomised, in a 5 x 2 factorial scheme with five replicates. Soybean seeds were treated with *B. amyloliquefaciens* BV03, *Bacillus subtilis* BV02, *Trichoderma asperellum* BV10, Carbendazim + Thiram and distilled water (control). After treatment, seeds were sown on sterile substrate. Seven days after seedling emergence, 2 µL of 1 x 10<sup>-4</sup> *Colletotrichum truncatum* spores were inoculated on the cotyledons. Catalase (CAT), peroxidase (POX), phenylalanine ammonia lyase (PAL) and glyceollin (GLY) activities before and after pathogen inoculation, as well as the diameter of the anthracnose lesion on the cotyledons, were evaluated. Data were submitted to analysis of variance and, when significant, the mean values were compared by Fisher's test ( $p < 0.05$ ). The treatments did not influence the first sampling time before inoculation. *Trichoderma asperellum* BV10 increased POX and PAL activities up to 173%, while *B. amyloliquefaciens* BV03 increased POX activity. Glyceollin was not influenced by the treatments. The *T. asperellum* BV10 reduces the diameter of the anthracnose lesion by up to 61%. Thus, *T. asperellum* BV10 has the potential to control soy anthracnose, improved the response defense against *C. truncatum*, when performed or seed treatment.

Keywords: *Colletotrichum truncatum*, *Glycine max*, resistance induction.

# 1 INTRODUÇÃO

A soja, rica em proteínas, é a cultura de maior importância do agronegócio mundial, transformando o Brasil, em um dos dois maiores produtores da oleaginosa, junto com os Estados Unidos da América, gerando empregos e renda nas regiões produtoras, por meio da cadeia produtiva longa e organizada (FAO, 2018; CONAB, 2019; CONTESSA, 2020).

Dentre os fatores limitantes de produção de soja, as perdas de origem fitopatológica são consideradas importantes, sendo causada por: vírus, bactérias, nematoides e fungos, que juntos podem comprometer até 32% da produtividade da cultura (ALMEIDA et al., 2005; SAVARY et al., 2019; YADAV et al., 2020). Dentre as doenças cita-se a antracnose, causada pelo fungo *C. truncatum*, como uma das mais frequentes e prejudiciais, principalmente, no Cerrado brasileiro, podendo chegar a perda de até 100% quando as medidas de controle não são adotadas (DIAS et al., 2016; DIAS et al., 2019; ROGÉRIO et al., 2019).

Sob condições de alta temperatura e umidade, principalmente, em anos chuvosos, o patógeno causa falhas na germinação de sementes ou reduz o seu vigor, promovendo morte de plântulas e comprometendo o estande final. Também pode afetar pecíolos e nervuras por meio da necrose, além da presença de manchas nas folhas, hastes e vagens em qualquer fase fenológica da cultura. O acentuado abortamento, queda das vagens e deterioração dos grãos são responsáveis pelos maiores prejuízos na cultura quando as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (ALMEIDA et al., 2005; SHARMA, et al. 2011; DIAS et al., 2016; ROGÉRIO et al., 2016; BORAH, 2019; NATARAJ et al., 2020).

As principais medidas de controle da antracnose da soja são: o uso de sementes saudáveis, a rotação de culturas, o tratamento de sementes, adequação da população de plantas para reduzir a formação de microclima, o manejo adequado do solo, adubação equilibrada, o tratamento químico com fungicidas e o controle biológico (SHARMA, et al. 2011; GODOY et al., 2014; SILVA et al., 2020).

O tratamento de sementes e a pulverização da parte aérea com fungicidas são as principais medidas de controle da antracnose da soja (PEREIRA et al., 2009; PESQUEIRA et al., 2016). Assim, nas medidas como o controle isoladas, com eficiência, a curto ou longo prazo, como o controle químico, já foram registrados o aparecimento de populações de *C. truncatum*, resistentes, ao fungicida com princípio ativo como, carbendazim, também utilizado em tratamento de sementes (GODOY et al., 2015; POTI et al., 2020). Em corroboração com os tratamentos convencionais, os métodos de controle de doenças alternativo são recomendados, como o uso de agentes de

biocontrole, se tratam daqueles que realizam o controle biológico, que é "a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem" (Cook & Baker, 1983). Controle biológico natural é o controle por meio de outro microrganismo que entre os mecanismos de ação, também podem atuar como indutores de resistência de planta, aos patógenos.

A resistência imune inata de plantas tem sido relatada como importante mecanismo de defesa contra doenças, e pode ser acionada, durante a interação patógeno-hospedeiro e/ou por meio de agentes elicitores, que podem ser de origem microbiana, como os agentes de biocontrole (DUBERY et al., 2012; KUSHALAPPA et al., 2016; LOLLE et al., 2020; WANG et al., 2020). Assim, a indução de resistência explora o potencial das próprias plantas para combater fitopatógenos, podendo ser incorporado ao manejo integrado de doenças. Dentre os mecanismos de defesa das plantas pode-se citar o incremento na atividade das: enzimas peroxidase, catalase, polifenoloxidase,  $\beta$ -1,3-glucanase e fenilalanina amônia-liase e de fitoalexinas, como a gliceolina, na cultura da soja (DUBERY et al., 2012; YANG et al., 2017).

Na indução de resistência, o elicitor possui papel chave neste tipo de ferramenta de controle de doenças de plantas, sendo classificados como bióticos ou abióticos (WALTERS et al., 2005; THAKUR; SOHAL, 2013; MALIK et al., 2020). Dentre os bióticos, estão os elicitores, derivados de extratos vegetais, microrganismos, como fungos, bactérias e algas (BETTIOL; MORANDI, 2009; DUBERY et al., 2012; XING et al., 2015; SOLINO et al., 2016). Ao tratar-se de bactérias e fungos, os gêneros de microrganismos *Bacillus* e *Trichoderma* são usados para o biocontrole de doenças de plantas, assim como, para aumentar a produtividade de culturas agrícolas (BETTIOL; MORANDI, 2009; TAHIR et al., 2017; GLICK, 2020; PENHA et al., 2020). Com tudo isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a indução de mecanismo de resistência de plantas de soja à antracnose, em função das aplicações de agentes de biocontrole, na parte aérea.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Cultura da soja**

A soja é proveniente do continente asiático, sendo disseminada para o continente europeu em, 1730. Já em território americano, a soja chegou em 1765, sendo utilizada como

alimento humano, como a margarina. Em 1917, a produção de grãos aumentou, em função da capacidade do seu uso na alimentação de animais e a extração do óleo (HARTMAN et al., 2011).

A CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil), em 2018 apontou a importância do agronegócio para o PIB brasileiro, com impacto de 1,44 trilhão de reais. A maior parcela é do ramo agrícola, que corresponde 74% deste valor. Para o valor bruto da produção (VBP), o setor agrícola alcançou 395,23 bilhões reais no ano de 2018, sendo a cultura da soja responsável, por 146,9 bilhões (CNA, 2019).

A produção de soja é de suma importância para o crescimento socioeconômico do país. A commodity é amplamente empregada na alimentação humana e animal sendo fonte de óleo e proteína que gera renda para grandes, médios e pequenos produtores. Na região Centro-Oeste, a demanda pela oleaginosa tem se elevado significativamente pelo seu emprego nos complexos de carne de suínos, aves e bovinos (OLIVEIRA; SCHLINDWEIN, 2015).

Entre os fatores que interferem na produtividade e lucratividade da cultura da soja, estão; as doenças, causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, que podem chegar a 100% de perda, caso não seja realizado o controle, e ainda podem comprometer até 32% da produção final, dependendo da doença ou complexo e dos métodos de controle disponíveis (SAVARY et al., 2019; YADAV et al., 2020).

## 2.2 Doenças da soja

Podem ser encontradas diversas doenças na cultura da soja, tanto na parte aérea, quanto na raiz. Elas praticamente ocorrem em todos os estágios de desenvolvimento da cultura (ALMEIDA et al., 2005).

Entre as doenças da cultura no Brasil, destacam-se: podridão vermelha da raiz (*Fusarium solani*), podridão preta da raiz (*Macrophomina phaseolina*), podridão radicular por *Corynespora cassiicola* e nematose, agente causal nematoide de cisto (*Heterodera glycine*), nematoide das galhas (*Meloidogyne* spp.), nematoides das lesões radiculares (*Pratylenchus brachyurus*), cretamento foliar (*Cercospora kikuchii*), míldio (*Peronospora manshurica*), oídio (*Microsphaera difusa*), ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*), mancha parda (*Septoria glycines*), mancha alvo (*Corynespora cassiicola*), mancha olho-de-rã (*Cercospora sojina*), seca da haste e da vagem (*Phomopsis sojiae*), cancro da haste (*Phomopsis phaseoli*), mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) e antracnose (*Colletotrichum truncatum*) (ALMEIDA

et al., 2005; HENNING et al., 2014; HAMAWAKI et al., 2019; JULIATTI et al., 2019; MACHADO et al., 2019; ROGÉRIO et al., 2019; CIAMPI-GUILLARDI et al., 2020).

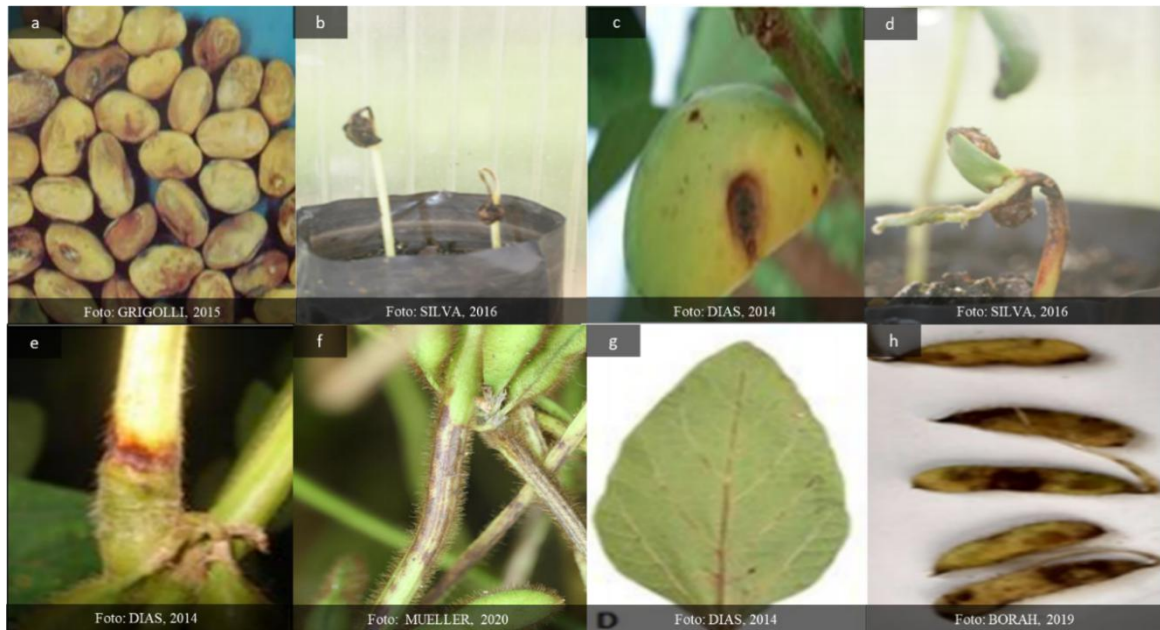
A antracnose é uma doença que vem crescendo no país, e já é indicada, como uma das principais doenças no Brasil, causando redução na população de plantas, na qualidade de semente e no rendimento de grãos (BARBIERI et al., 2017).

### 2.3 Antracnose

A antracnose é uma doença de grande importância no Brasil, principalmente no Cerrado, em função das condições climáticas favoráveis, à perpetuação e disseminação do patógeno, pois em período de safra a temperatura ficam acima de 25 °C, com período de molhamento superior a 24 horas, que são condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (ALMEIDA et al., 2005; DIAS et al., 2016; DIAS et al., 2019; ROGÉRIO et al., 2019).

O ciclo da doença inicia-se com a infecção do patógeno em sementes ou restos culturais. Ao infectar as plântulas, este se desenvolve de forma sistêmica no interior do tecido cortical onde pode ficar latente até que haja condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento ou até que a planta atinja fase fenológica de reprodução. De forma geral, o *C. truncatum* pode atacar a cultura em todas as fases fenológicas, causando morte de plântulas (tombamento), necrose do pecíolo e manchas nas folhas, hastes e vagens (Figura 1). De 60 a 65 horas após o iniciado o processo de infecção pode observar os primeiros sintomas (SHARMA et al. 2011; ROGÉRIO et al., 2016; BORAH, 2019; NATARAJ et al., 2020).

Em sementes, o patógeno causa manchas deprimidas, de coloração castanho escura, podendo reduzir a germinação desta em até 46%, além de reduzir seu vigor. Nas plântulas, a infecção formada a partir do inóculo inicial (restos culturais ou via semente contaminada), pode causar a necrose dos cotilédones e se estender para hipocótilo, culminando em tombamento, com perdas de até 48% do estande nos primeiros 14 dias. Na parte aérea de plantas, o patógeno pode infectar ramos laterais, pecíolos, e vagens, como manchas deprimidas de coloração castanho avermelhada. Quando ataca as vagens, pode causar queda total destas e/ou abortamento e deterioração dos grãos, resultando em perdas de até 90 kg ha<sup>-1</sup> para cada 1% das doenças registradas (ALMEIDA et al., 2005; GALLI et al. 2007; SHARMA, et al. 2011; DIAS et al., 2016; ROGÉRIO et al., 2016; BORAH, 2019; NATARAJ et al., 2020).



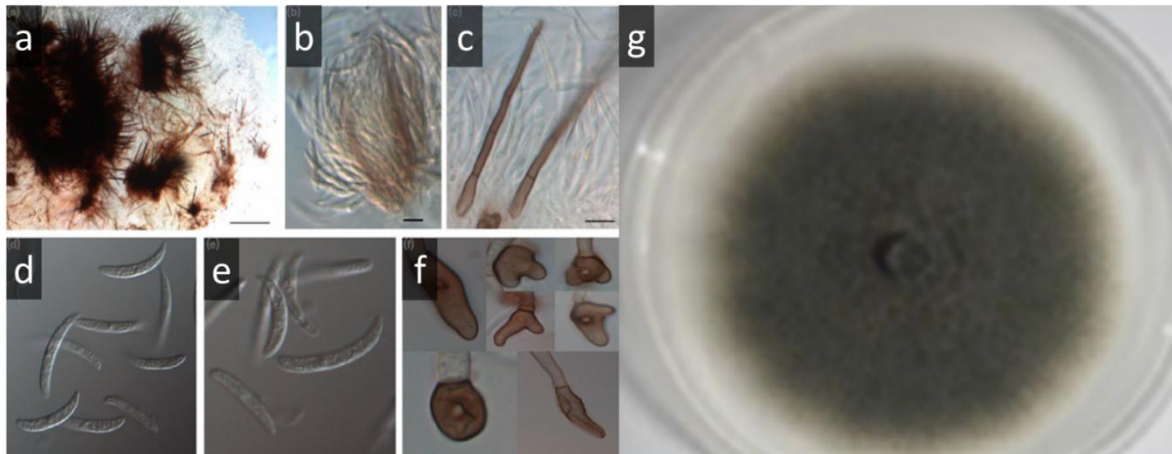
Fonte: Colônias (Fotos: ROGÉRIO et al., 2016).

Figura 1- Sintomas de antracnose em sementes (a) tombamento (b) e lesão no cotilédone (c), na haste (d), lesões nas haste (e;f), lesões nas nervuras das folhas (g) e na vagem (h) causado pelo *C. truncatum* na cultura da soja.

A disseminação do *C. truncatum* ocorre principalmente via semente, devido a característica do órgão de perpetuação do fungo, capaz de aderir ao tegumento da semente ficando quiescente e posteriormente infectando a cultura, quando esta estiver estabelecida no campo (GALLI et al. 2007).

As colônias de *C. truncatum* possuem coloração cinza escuro com esporos em uma massa mucilaginosa, podendo ser alaranjadas. Os conídios são falcados, afilados em direção ao ápice, hialinos unicelulares e assépticos, com dimensões variáveis, formados nos acérvulos, geralmente produzidos no topo do estroma marrom escuro a preto. Os apressórios são únicos, em cadeias ou grupos, predominantemente truncados, elipsoidais ou ovóides, com bordas inteiras ou onduladas, marrom médio e paredes lisas (Figura 2) (ROGÉRIO et al., 2016).





Fonte: Colônias (Fotos: ROGÉRIO et al., 2016).

Figura 2 - Características morfológicas de *Colletotrichum truncatum* cultivadas em meio PDA. a) Acérvulos; b) acervos e conídios; c) cerdas e conídios; (d, e) conídios; f) apressório.

Entre as medidas recomendadas para reduzir a incidência de antracnose estão o uso de; sementes saudáveis, rotação de culturas, aumento do espaçamento entre linhas densidade apropriada das plantas, tratamento de sementes, adubação adequada do solo, controle químico e biológico (SHARMA, et al. 2011; GODOY et. al., 2014).and N.S. Massola Jr

#### 2.4 Métodos de controle da antracnose

A sementes são a fonte primária de inóculo de *C. truncatum* em áreas, sem histórico da doença e início do processo de infecção sistêmica na plântula e posterior, na planta adulta, portanto, a aquisição deste material com certificação de qualidade sanitária é uma das medidas mais recomendadas (GODOY et. al., 2014; BEDENDO et a., 2018). Em complemento e a medida de controle contra patógenos, como o *C. truncatum*, pode ser empregado também, o uso de tratamentos de semente com fungicidas ou agentes de biocontrole (ALMEIDA et al., 2005; AMORIM et al., 2018).

O controle químico é um dos métodos mais importantes e utilizados, no controle de fitopatógenos, visto que este é eficiente e economicamente viável (SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018). Segundo Jagtap et al. (2012), com exceção do clorotalonil, fungicidas Carbendazim, Mancozeb, Carbendazim + Mancozeb, Propiconazol, Hexaconazol, Difenconazol, Propineb, Focetil AL, testados em várias concentrações inibiram significativamente o crescimento micelial de *C. truncatum in vitro*. O tratamento de sementes com fungicidas sistêmicos possuem melhor eficiência, visto que no trabalho de

Pereira et al. (2009), os princípios ativos Fludioxonil + Mefenoxan e Thiabendazol + Thiram, Carboxin + Thiram, podem reduzir até 82%, a ocorrência de antracnose em sementes, aumentando a germinação destas e vigor fisiológico de plântulas. Assim, o uso de fungicidas, sistêmicos ou de contato, são indicados como importante método de controle da antracnose (ALMEIDA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013).

O controle da antracnose na parte aérea da soja, pecíolo, haste, nervura das folhas e vagens é realizado, por meio de pulverização de fungicidas multisítio, sítio específico ou associação, entre os princípios ativos. Segundo Subedi et al., (2015), ao testar fungicidas de contato, a associação entre o princípio ativo Mancozeb + Carbendazim promoveu menor porcentagem de antracnose. Dias et al. (2016), ao testar trifloxystrobin + tebuconazole; trifloxystrobin + tebuconazole + carbendazim; azoxystrobin + cyproconazole; picoxystrobin + cyproconazole; pyraclostrobin + epoxiconazole; trifloxystrobin + cyproconazole; chlorothalonil; trifloxystrobin + prothioconazole; picoxystrobin + tebuconazole + Carbendazim; picoxystrobin + cyproconazole; picoxystrobin + tebuconazole + carbendazim, verificou um incremento de 90 kg ha<sup>-1</sup> de soja para cada 1% de antracnose controlada pelos fungicidas.

A concentração do emprego de produtos químicos no controle de doenças é responsável pelo aparecimento de patógenos resistentes e pela permanência de resíduos tóxicos no meio (BRENT, 2007; FONSECA et al., 2007; AMORIM et al., 2018). O aparecimento de populações de *C. truncatum* resistente ao fungicida com princípio ativo como Carbendazim já foi registrado (GODOY et al., 2015; POTI et al., 2020). Assim, como o uso de cultivares resistentes não é recomendada isoladamente, o controle químico também precisa ser associado a outras medidas, como o controle cultural, genético e biológico (AMORIM et al., 2018)

A forma mais econômica e eficiente de controle de doenças, como antracnose na soja, é pelo uso de cultivares resistentes, pois pode ser aplicável em largas áreas e possui baixo impacto ambiental, quando comparados aos defensivos (CAMARGO, 2018; NATARAJ et al., 2020). Entretanto, as informações quanto a essa característica, em relação a antracnose são escassas, e/ou as cultivares desenvolvidas, para a região considerando as características agrônomicas, como; a produtividade, além da durabilidade da resistência em questão, que exige a adoção de cuidados, como uso de multilinhas e mistura, rotação de cultivares, além da associação de outros métodos como controle químico, biológico, cultural e outros, principalmente, em região com clima favorável, ao desenvolvimento do patógeno (AMORIM et al., 2018).

A densidade de plantio também deve ser observada, respeitando o espaçamento entre linhas e entre plantas, conforme a recomendação da cultivar, para evitar a formação de microclimas favorável ao patógeno (BEDENDO et al., 2018). A nutrição mineral, em excesso ou deficiência, pode favorecer a doença, por comprometer o desenvolvimento normal da planta e consequente à redução da sua resistência, ao agente causal (BEDENDO et al., 2018).

A ampla utilização do controle biológico, no manejo de doenças de plantas, na última década deve-se a eficiência deste contra patógenos e a disponibilidade de produtos; comerciais, a percepção e a necessidade de novas ferramentas, que atuassem em sinergia, com as já existentes, (MEDEIROS et al., 2018). O controle biológico trata-se do controle de fitopatógeno utilizando um microrganismo não patogênico, que pode interferir no: crescimento, infectividade, virulência, agressividade, reprodução e outros fatores, bem como, induzir a planta a ativar mecanismos de defesa, contra patógenos (MEDEIROS et al., 2018; TAHIR et al., 2017).

## **2.5 Indução de resistência de planta à patógenos**

No curso de seu desenvolvimento, as plantas têm que enfrentar uma ampla gama de potenciais agentes patogênicos, incluindo; os vírus, bactérias, fungos, oomicetos e nematoides (AMORIM et al., 2018). Para isto elas utilizam estratégias de proteção, tais como; a lignificação de paredes celulares e produção de compostos antimicrobianos capazes de restringirem a maioria das tentativas de invasões, por fitopatógenos, seja por interferir na infecção/colonização e/ou reprodução (GARCIA-BRUGGER et al., 2006; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018). Esta resistência do hospedeiro a uma doença pode ser definida, sob o aspecto fisiológico, como a capacidade da planta, em atrasar ou evitar a entrada e/ou a subsequente atividade de um patógeno nos tecidos desta (CAMARGO, 2018). Os mecanismos estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos, atuam através da produção de substâncias tóxicas ao patógeno ou criando condições adversas ao estabelecimento deste, na planta (HEIL; BOSTOCK, 2002; BRENT et al., 2005; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018).

A resistência de plantas ao patógenos ocorre porque elas são capazes de reconhecer padrões moleculares relacionados a patógenos, a microrganismos não patogênicos e danos (DUBERY et al., 2012; KUSHALAPPA et al., 2016; LOLLE; COAKER et al., 2020; WANG et al., 2020). Ao reconhecer estes padrões, por meio de proteínas presentes na membrana celular, as plantas acionam o maquinário de defesa primária, como o acúmulo de ácido salicílico, jasmônico e ou etileno, explosão oxidativa e outros, gerando uma cascata de

sinalização, envolvendo mitógenos acionadoras de proteínas quinases, que culminará na ativação de genes, no aumento da atividade de proteínas relacionadas à defesa, produção de compostos secundários, entre outros (BITTEL; ROBATZEK, 2007; DE VLEESSCHAUWER; HOFTE, 2009; DUBERY et al., 2012; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018).

A resistência inata de planta a patógenos pode ocorrer de forma local e sistemicamente. Após o reconhecimento dos padrões moleculares oriundos do agente elicitador, pode haver a translocação do sinal por meio de moléculas sinalizadoras para partes da planta que não receberam o elicitador (CHOYDHANRY; JOHRI, 2007; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018).

Os indutores aumentam o nível de resistência da planta, sem alterar o seu genoma. Ocorrem por meio da ativação de genes, de maneira inespecífica e específica, que codificam diversas respostas de defesa, incluindo compostos fenólicos e enzimas como peroxidase, catalase, fenilalanina amônia liase, entre outras (YANG et al., 2017; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018).

## **2.6 Metabólitos secundários e enzimas relacionadas à defesa de plantas contra patógenos**

A quantidade de proteínas presentes ou inativas no tecido vegetal pode sofrer grandes alterações, quando desafiadas, por patógenos ou agentes elicitores, insinuando a dinamização dos mecanismos de defesa da planta e a importância de se estudar o metabolismo secundário envolvido na defesa da planta como as fitoalexinas e as enzimas chaves (catalase, fenilalanina amônia-liase, peroxidases, polifenoxidase e outras) na indução de resistência (YANG et al., 2017; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018).

### **2.6.1 Peroxidase**

As peroxidases são hemoproteínas pertencentes a família PR-9 (VIDHYASAKARAN, 2008), que catalisam a oxidação de substratos concomitantemente à redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (CAVERZAN et al., 2012; YANG et al., 2017). Estas enzimas estão envolvidas em vários processos metabólicos essenciais, que incluem a lignificação e a suberização (RALPH et al., 2004), além da síntese de glicoproteínas, ricas em hidroxiprolina e polissacarídeos ferulicolados (BROWNLEADER et al., 1995; SMALLWOOD, et al., 1995) atuando na oxidação e polimerização de fenóis solúveis (HIGARA et al., 2001).

A peroxidase é considerada uma proteína chave na defesa de vegetais contra o  $H_2O_2$  formado naturalmente no citosol, vacúolos, parede celular e espaços extracelulares, quando a

planta é exposta a algum tipo de estresse (ASADA, 1999; JEBARA et al., 2005). As peroxidases são largamente estudadas, por participarem efetivamente no processo de defesa das plantas, aumentando a sua atividade na presença de patógenos causadores de infecções e agentes elicitores, o que está diretamente relacionada à redução da severidade de doenças (KUHN, 2007). A parede celular de plantas é a primeira linha de defesa contra a invasão de fitopatógenos e as peroxidases são as enzimas chaves no processo de sua construção (UPADHYAY et al., 2014). Esse envolvimento na lignificação da parede celular de plantas pelas peroxidases acionadas por moléculas elicitoras tem correlação direta, com a resistência do hospedeiro, durante a interação patógeno-hospedeiro, impedindo o ingresso ou reduzindo a colonização (AHUJA et al., 2012; UNDERWOOD, 2012; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018).

### **2.6.2 Catalase**

A catalase é uma hemoenzima que catalisa a dismutação de  $H_2O_2$  e  $O_2$ . Essa enzima ocorre em todos os eucariotos e atua removendo o peróxido de hidrogênio gerado no peroxissomo por oxidases envolvendo a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração, catabolismo de purina durante o estresse oxidativo (MITTLER, 2002; VELLOSILO et al., 2010). A catalase converte o  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular sendo sua principal função prevenir os efeitos potencialmente danosos destes. Além da dismutação de  $H_2O_2$ , a enzima catalase também oxida substratos tais como: metanol, etanol, formaldeído e ácido fórmico (VAN BREUSEGEM et al., 2001).

As plantas apresentam múltiplas isoformas de catalase. Willekens et al. (1994) dividiram as catalases em três classes: 1 são mais comuns em tecidos fotossintéticos e estão envolvidas na remoção de  $H_2O_2$  produzido na fotorrespiração; 2 são produzidas em grande quantidade nos tecidos vasculares e podem estar relacionadas com a lignificação; 3 são muito abundantes em sementes e plantas jovens e sua atividade está ligada à remoção do excesso de  $H_2O_2$  produzido durante a degradação de ácidos graxos no ciclo do glioxilato nos glioxisomas.

Por estar envolvida na detoxificação de peróxido de hidrogênio, a catalase representa uma importante proteína, no processo de estudo de indução de resistência, que com frequência relata a explosão oxidativa e o aumento da atividade da enzima, após a aplicação de um agente elicitor (SARWAR et al., 2003; MENEZES, 2009).

### 2.6.3 Fenilalanina Amônia Liase

A fenilalanina amônia-liase é a primeira enzima do metabolismo de fenilpropanoide na maioria das plantas e tem sido indicada, por seu importante papel, no controle do acúmulo de compostos fenólicos em resposta às infecções (STRACK, 1997). Essa enzima é responsável pela degradação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-amônico e amônia, produto incorporado em diferentes compostos, como ácidos cumárico, cafeico, ferúlico, clorogênico, pigmentos antocianinas, flavonoides, chalconas, lignina, entre outros, que estão envolvidos na formação de ésteres (CAVALCANTI et al., 2005; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

A fenilalanina amônia-liase é amplamente pesquisada por sua importância no metabolismo secundário dos vegetais e atuação, sobre um substrato específico, a fenilalanina. Entretanto, a codificação da fenilalanina amônia-liase é feita por múltiplos genes, indicando o grau de importância para planta, pela variada combinação entre os monômeros da enzima, cuja combinação está relacionada ao estímulo por eliciadores, que direciona o estímulo para a produção de um produto específico (DIXON; PAIVA, 1995).

### 2.6.4 Fitoalexinas

A ideia de que as plantas alteram e sintetizam substâncias capazes de protegê-las contra fitopatógenos vem sendo estudada e elucidada (DUBERY et al., 2012). Dentre as respostas de defesa acionadas pelas plantas estão as fitoalexinas, que desde a caracterização química da pisatina, isolada de plantas de ervilha (CRUIOKSHANK; PERRIN, 1961) inúmeras outras tem sido relatada em estudo de proteção de plantas à patógenos (AHUJA et al., 2012).

Diversas classes de produtos naturais sintetizados por plantas são descritas como fitoalexinas, tais como; os alcalóides, compostos fenólicos e flavonóides, dentre outros (EICHHORN et al., 2014) e usualmente utilizados como marcadores químicos para desvendar a resposta de indução de resistência quando a planta é tratada com um agente elicitador, pois, atuam, conjuntamente com outros mecanismos de resposta, na restrição do agente patogênico (JEANDET ET AL., 2013). Esta ação antimicrobiana ocorre porque as fitoalexinas se acumulam ao redor de sítios de infecção e podem inibir o crescimento de bactérias e fungos *in vitro*, por conseguinte, é lógico considerar como possíveis compostos de defesa das plantas contra doenças causadas por fungos e bactérias. Embora não haja evidência de que as fitoalexinas sejam translocadas, os fitopatógenos encontram concentrações muito superiores a letal, em fases iniciais do processo de infecção local (MERT-TÜRK, 2002).

### 2.6.5 Gliceolina

A soja (*Glycine max*) tem como fitoalexina a gliceolina, sendo um pterocarpanóide (flavonóide), molécula importante para a defesa desta leguminosa contra fitopatógenos, causando a inibição da ativação de enzimas fúngicas, granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares e ruptura da membrana plasmática (GOUVEA et al., 2011). Sua síntese se inicia em parte na via dos fenilpropanóides que, durante a infecção da planta hidrolisam isoflavonas pré-formadas (malonilglucosil-daidzeína e malonilglucosilgenisteína) liberando a daidzeína (molécula precursora da gliceolina) e genisteína (molécula inibidora de crescimento). Durante a produção desta fitoalexina, é possível obter a formação de quatro estruturas isômeras da gliceolina (Figura 1), que possuem a mesma função (SIMÕES, 2004).

### 2.7 Agentes elicitores

O termo elicitador foi inicialmente proposto por Keen (1975) para denominar moléculas que estimulavam a síntese de fitoalexinas. Posteriormente, o termo passou a definir moléculas específicas que estimulam resposta sistêmica de defesa em plantas (SMITH, 1996). Vários agentes podem induzir a produção de sinais no vegetal, disparando reações que protegeram a planta de forma mais curta ou duradoura contra uma ampla gama de fitopatógenos (LLORENS et al., 2017; MALIK et al., 2020).

Na indução de resistência o elicitador possui papel chave neste tipo de ferramenta de controle de doenças de plantas. Estes agentes podem ser classificados como bióticos ou abióticos (WALTERS et al., 2005; THAKUR; SOHAL, 2013; LLORENS et al., 2017; MALIK et al., 2020). Dentre os abióticos citam-se: acibenzolar-s-metil, ácido 2,6-Dichloroisonicotinic, ácido salicílico, lantânio, cálcio, prata, cádmio, fosfito e outros (TERRY, L. 2004; ANGELOVA et al., 2006; PINTO et al., 2012). Já entre os bióticos, estão os elicitores derivados de extratos vegetais, microrganismos, como fungos, bactérias e algas (AZIZ et al., 2003; ANGELOVA et al., 2006; BETTIOL; MORANDI, 2009; DUBERY et al., 2012; XING et al., 2015; SOLINO et al., 2016). Ao tratar-se de fungos e bactérias, os gêneros de microrganismos *Bacillus* e *Trichoderma* têm sido usados para o biocontrole de doenças de plantas, assim como para aumentar a produtividade de culturas (BETTIOL; MORANDI, 2009; TAHIR et al., 2017; GLICK, 2020; PENHA et al., 2020).

### 2.7.1 *Bacillus subtilis*

O solo é um ambiente complexo e habitat de milhares de microrganismos, como *B. subtilis*, tanto em números, quanto em biodiversidade (GLICK, 2020). O procarioto *B. subtilis*, é uma bactéria que faz diversas associações com plantas, podendo ser observada: rizosfera, rizoplano, filoplano e nos tecidos internos, multiplicando, e se protegendo de ações antagonistas do restante da microflora, ali existentes (GLICK, 2020; KHANNA et al., 2020; ZHANG et al., 2020).

O *B. subtilis* tem sido amplamente empregado para promoção de crescimento de plantas, além de controlar enfermidades e consequentemente aumentar a produtividade das culturas (NGUGIA et al., 2005; KUSHWAHA et al., 2020; TAVANTI et al., 2020). A ascensão do crescimento de plantas mediadas por *B. subtilis*, é resultado da otimização da fixação de nitrogênio, solubilização dos nutrientes (fosforo, potássio e zinco), biossíntese de fitohormônios, restabelecimento e supressão de microrganismos fitopatogênicos do solo (GLICK, 2020; WANG et al., 2020).

O *B. subtilis* é considerado um agente de biocontrole na agricultura, visto que foi relatado no controle de patógenos como; *Bipolaris sorokiniana*, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Fusarium* spp, *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, por de ação antagonista, antibiose, biossíntese de compostos antimicrobianos, substâncias voláteis, competição por espaço e nutrientes e de forma indireta pela ativação de mecanismos de defesa de plantas, contra patógenos (LEELASUPHAKUL et al., 2008; TAHIR et al., 2017; HASHEM et al., 2019; MILJAKOVIĆ et al., 2020).

### 2.7.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

O *B. amyloliquefaciens* é uma bactéria gram-positiva que possui forma de bastonete, móvel, feito por flagelos peritricos e esporogênicos, ocorrendo naturalmente no solo (SABATÉ et al., 2017). Este microrganismo ao interagir com o sistema radicular de plantas, sintetizam auxinas, o que pode corroborar com a capacidade desse em aumentar a porcentagem de germinação, comprimento de raiz e altura de planta do feijão preto no solo (SABATÉ et al., 2017).

O *B. amyloliquefaciens* é utilizado na agricultura como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, visto que incrementa o crescimento desta, em função de captação e



solubilização de micro e macronutrientes, por meio de compostos como: prolina, glutamina, ácido linolênico, ácido málico, ribitol, ácido propanóico e serina (BISHT et al., 2019).

Isolados ativos de *B. amyloliquefaciens*, além de promotores de crescimento, também produzem compostos tensoativos e lipopeptídeos de ação antimicrobiana, sendo considerado agentes de biocontrole (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011; CHOWDHURY et al., 2015; MILJAKOVIĆ et al., 2020). Estes metabólitos possuem atividades antifúngicas e antimicrobianas atuando na motilidade bacteriana e na formação do biofilme, agindo como elicitores na indução de resistência sistêmica (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011; MILJAKOVIĆ et al., 2020).

Quando utilizado no tratamento de sementes, *B. amyloliquefaciens* proporciona a diminuição de doenças nas plântulas de sementes de soja devido a antibiose direta contra patógenos de solo, por meio da formação de filme bioativo protegendo o sistema radicular (MILJAKOVIĆ et al., 2020). O agente de biocontrole tem a capacidade de controlar patógenos como: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. falcatum*, *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum* e *S. rolfsii* em função da produção de lipopeptídeos (por exemplo, bacilomicina, fengicina e surfactina), compostos voláteis, enzimas hidrolíticas, e sideróforos, como a bacilibactina, que interferem em componentes da membrana celular, principalmente, o esterol de moléculas fosfolípídicas, alterando a sua estrutura e afetando a permeabilidade da membrana, inibindo a biossíntese de DNA fúngico e promovendo a lise da célula e consequente a morte do patógeno (YUAN et al., 2012; SABATÉ et al., 2017; SUR et al., 2018; HANIF et al., 2019; RASHAD et al., 2020).

### **2.7.3 *Trichoderma asperellum* BV10**

*T. asperellum* são fungos de solo com importância agrônômica, considerado um microrganismo promotor de crescimento e agente de biocontrole contra fitopatógenos, que podem ser encontrados interagindo com os sistemas radiculares e/ou foliares (SOOD et al., 2020; TIAN et al., 2020). O microrganismo promove rápido desenvolvimento e produtividade vegetal por meio da incremento da fotossíntese, atrasando a senescência, melhorando a retenção de água, regulando o nível hormonais (auxina, etileno, ácido abscísico e outros) e regulando a condutância dos estômatos, melhorando a absorção de nutrientes, modificando e aprofundando o sistema radicular e induzindo a planta a ativar mecanismo de defesa contra patógenos ao interagir com solo próximos a sistema radicular e fazer simbiose com a planta

(CONTRERAS-CORNEJO et al., 2020; SOOD et al., 2020; VINALE; SIVASITHAMPARAM et al., 2020).

A inoculação com *Trichoderma* na rizosfera de uma planta promove a defesa das plantas contra fitopatogênicos, como; vírus, bactérias, nematoides e fungos. Entre os conhecidos estão *Colletotrichum lindemuthianum*, *Corynespora cassiicola*, Cucumber Mosaic Vírus, *Curvularia aeria*, *Erysiphe cruciferarum*, *S. sclerotiorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *P. syringae* pv. *tomato*, *R. solani*, *Xanthomona perforans* (AGUIAR et al., 2014; RAI et al., 2019; CHIEN; HUANG et al., 2020). Ação de controle de fitopatógenos observado em isolados de *Trichoderma* se deve a antibiose, micoparasitismo, competição de nutrientes, de espaço e estimulação da defesa das plantas, como sintetizar quitinase, -glucanases, N-acetilglucosaminidase e protease desempenham papel de importante antagonismo, além da produção de metabólitos tóxicos voláteis e não voláteis, que dificultam colonização do patógeno, como; 6-pentil- $\alpha$ -pirona, alameticinas, antibióticos, gliovirina, glisopreninas, ácido harzianico, ácido heptelidico, massoilactone, peptaibols, tricholin eviridian (RAI et al., 2019).

O controle de fitopatógeno observado na interação planta-*Trichoderma*, além do efeito direto deste, também se deve a ativação de enzimas relacionada a patogênese (glucanase e quitinase), enzimas do metabolismo dos fenilpropanóides (chalcona, fenilalanina amônia liase e polifenoloxidase), enzimas que desempenham papel na resposta de defesa (catalase e peroxidase), acúmulo de composto de baixo peso molecular, como fitoalexina, composto fenólicos e espécies reativas de oxigênio (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2020; GUPTA et al., 2020; SOOD et al., 2020; VINALE; SIVASITHAMPARAM et al., 2020). Moléculas fúngicas do *Trichoderma* já conhecida são glicoproteínas, carboidratos, ácidos graxos, peptídeos e enzimas microbianas extracelulares que são elicitores inespecíficos (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2020; NAKKEERAN et al., 2020).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia da UniRV – Universidade de Rio Verde.

Os ensaios foram instalados em delineamento inteiramente casualizado, em fatorial 4 x 2, com 5 repetições. O fator A representado por três espécies de agentes de biocontrole, *Trichoderma asperellum* (1 mL produto comercial -p.c. kg semente<sup>-1</sup>), *Bacillus subtilis* (2 mL

p.c. kg semente<sup>-1</sup>) e *B. amyloliquefaciens* (2 mL p.c. kg semente<sup>-1</sup>), além de um tratamento controle (água) e um padrão, fungicida Carbendazim (150 g L<sup>-1</sup>) + Thiram (350 g L<sup>-1</sup>) na concentração/dose 200 mL p.c. 100 kg<sup>-1</sup> de sementes. O fator B corresponde aos horários de coleta, com o tempo de antes e após a inoculação do patógeno. Considerando que foram avaliadas variáveis destrutivas, também foram produzidas 25 repetições por tratamentos, das quais foram utilizadas 5 repetições mensurar para gliceolina no 1º horário de coleta (antes da inoculação) e 5 repetições para 2º horário de coleta (após a inoculação). O mesmo esquema foi utilizado para quantificação enzimática e 5 repetições foram mantidas para analisar a severidade da antracnose. Explicar como tratou as sementes. Onde semeou: vaso, bandejas. Qual substrato? Qtas sementes por repetição? Fez desbaste?

A bactéria *B. subtilis* (estirpe BV-02), cedido pela empresa Biovalens, registro no Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento - MAPA: 43418, é um produto comercial (p.c.) que possui formulação superconcentrada (3×10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>). A bactéria *B. amyloliquefaciens* (estirpe BV-02 registro MAPA: 34518) é um p.c. que possui formulação superconcentrada (3×10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>). O *T. asperellum* (estirpe BV-10), registro MAPA: 34018, é um p.c. que possui formulação superconcentrada (1×10<sup>10</sup> conídios viáveis mL<sup>-1</sup>).

Os microrganismos *Bacillus subtilis* (BV-02) e *B. amyloliquefaciens* (BV-03) identificada e caracterizada Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa e depositadas, na “Diazotrophicand Plant Growth Promotion Rhizobacteria Culture Collection of Embrapa Soja”, Word Federation Culture Collection #1213 and World Data Center for Microrganismos #1054, pela Biovalens Ltda – ME (CNPJ: 19.558.896/0002-38, IE: 002777176.00-74). Foi realizado a análise de sequenciamento da região 16S RNA por BOX-PCR, sendo as estirpes BV-0 3 (CNPSO 3219) e estirpe BV-02 (CNPSO 3418), classificadas como grupo operacional *amyloliquefaciens*, dentro do complexo de espécies de *B. subtilis*.

O microrganismo *T. asperellum* (BV-10), cedido pela empresa Biovalens, foi assim identificado e caracterizado, pela Serviço de detecção e Identificação de Fungos do Laboratório de Sistemática e Ecologia de Fungos, Departamento de Fitopatologia (DFP) – da Universidade Federal de Lavras (UFLA). A amostra de fungo filamentosos, código BV-10, foi submetida a preparação microscópica e análise filogenética da região gênica RPB2 (Segunda maior subunidade da RNA polimerase), resultando em marcadores morfológicos característicos da espécie. Na análise filogenética, o isolado CML 3751 agrupou com o isolado de referência da espécie *Trichoderma asperellum* com probabilidade posterior de 100% e bootstrap de 72%. O isolado foi depositado na Instituição, com o código CML 3751.

O isolado do patógeno, *Colletotrichum truncatum*, foi fornecido pela empresa Campos Pesquisa Agrícola, e mantido em meio de crescimento de batata dextrose e ágar (BDA) a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas luz, até a esporulação.

As avaliadas foram atividades de: catalase, peroxidase, fenilalanina amônia liase, acúmulo de gliceolina e severidade da antracnose, em cotilédones de soja. Para quantificação enzimática foram realizadas coletas de cotilédones sete dias após a semeadura, antes da inoculação do *Colletotrichum truncatum* (1<sup>o</sup> horário de coleta) e vinte quatro horas após a inoculação do patógeno (2<sup>o</sup> horário de coleta). Foi mensurada a massa da amostra, acondicionando-as imediatamente em envelopes de papel alumínio e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O extrato enzimático foi obtido por meio da maceração e homogeneização das amostras do tecido vegetal em 4 mL de tampão fosfato de sódio 0,01M (pH 6,0), seguido de centrifugação a 6.500 g durante 30 min em temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi recolhido e considerando o extrato enzimático, sendo utilizados na determinação do teor de proteínas totais, da atividade específica enzimática de peroxidase, catalase, polifenoloxidase e fenilalanina amônio-liase.

A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (1976), os valores de absorvância foram plotados em curva padrão de concentrações de albumina de soro bovino (ASB) e a concentração de proteínas expressa em  $\mu\text{mg proteína mL}^{-1}$ .

A atividade da catalase (CAT) foi quantificada pelo método de Goth (1991), modificado por Tomankova et al. (2006). A determinação foi realizada utilizando o método espectrofotométrico direto no comprimento de onda 405 nm e o resultado expresso em  $\mu\text{mol min}^{-1}\text{ mg}^{-1}\text{ proteína}$ .

A atividade da peroxidase do guaiacol (POX) por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 470 nm e os resultados foram expressos em absorvância  $\text{min}^{-1}\text{ mg}^{-1}$  de proteína (LUSSO e PASCHOLATI, 1999).

A atividade de fenilalanina amônio-liase (FAL) foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido trans-cinâmico liberado do substrato fenilalanina. A absorvância foi determinada a 290 nm e a atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{g de ácido trans-cinâmico h}^{-1}\text{ mg}^{-1}$  de proteína (UMESHA, 2006; KUHN, 2007).

Para determinação do acúmulo de gliceolina (GLI), foram coletados cotilédones 7 dias após semeadura, antes da inoculação (6 plantas e 12 cotilédones), e 24 horas após a inoculação (6 plantas e 12 cotilédones). Os cotilédones foram cortados ao meio e adicionados em tubo falcon contendo 5 mL de água destilada e estes agitados por 1 hora e gliceolina extraída mensurada, por espectrofotometria usando o comprimento de onda de 285 nm

(AYERS et al., 1976; ZIEGLER; PONTZEN, 1982). Os resultados foram expressos em unidade de absorvância por grama de peso fresco (ABSgpf<sup>1</sup>).

Para avaliação da severidade da antracnose em cotilédone de soja foi mensurando o diâmetro da lesão (DLA) e os dados expressos em cm.

Os ensaios foram realizados duas vezes distintas. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e realizada a análise conjunta entre os ensaios. Para os resultados significativos na análise de variância, os dados foram rodados em esquema fatorial e comparados pelo teste de Fisher ( $p < 0,5$ ).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A severidade da antracnose em cotilédones de plântulas que receberam o tratamento de sementes com *T. asperellum* foi 61% e 24% menor, que o controle, no primeiro e segundo ensaio experimental, respectivamente. Os demais tratamentos não diferiram do controle (Figura 3).

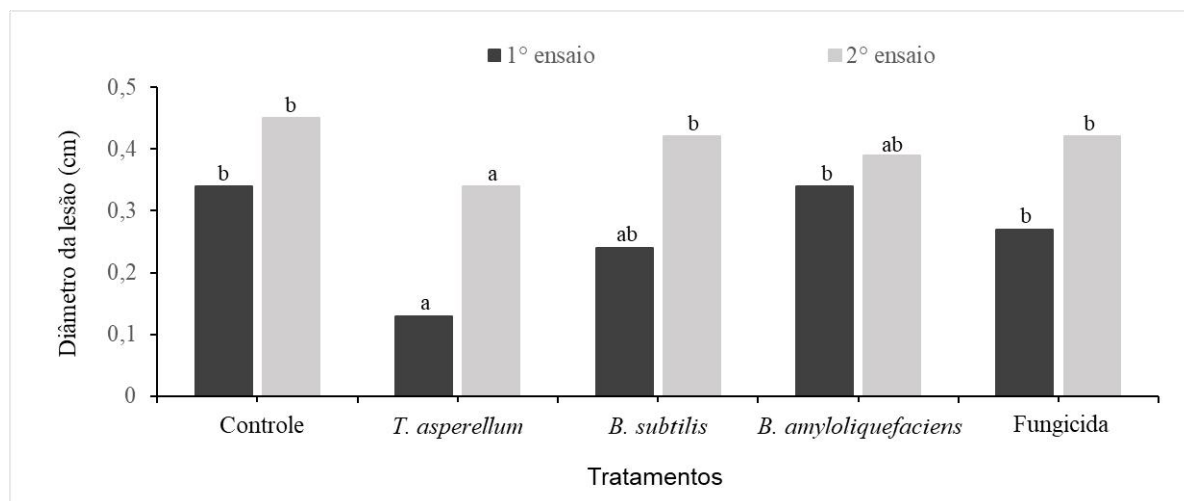


Figura 3 - Diâmetro da lesão de antracnose em cotilédones de soja no ensaio I e ensaio II em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole. *T. asperellum* *Trichoderma asperellum* BV10 (Tricho-Turbo<sup>®</sup>); *B. subtilis* BV02 (Bio-Imune<sup>®</sup>); *Bacillus amyloliquefaciens* BV03 (No-Nema<sup>®</sup>); NS=não significativo; Médias seguidas da mesma letra minúscula, na barra, não diferem entre si, pelo teste Fisher ( $p < 0,5$ ).

Ao analisar os dados de CAT (Tabela 1), nota-se que atividade da enzima não foi influenciada apenas pela presença do tratamento, fato evidenciado pela ausência de diferenças significativas entre os tratamentos e o controle no 1º horário de coleta (antes da inoculação com *C. truncatum*) para ambos os ensaios realizados (I e II). A atividade da enzima quando avaliada 24 horas após a inoculação de patógeno (2º horário), também não foi alterada no ensaio I, entretanto, no ensaio II a atividade da CAT foi menor no tratamento com *B. subtilis* BV02 quando em comparação ao controle.

Ao analisar os horários de coleta dentro dos tratamentos observou-se que o tratamento de sementes com *B. subtilis* promoveu redução da atividade da CAT no 2º horário de coleta nos ensaios I e II. No ensaio II, observou-se redução da atividade da CAT no 2º horário de coleta em comparação com o 1º horário no tratamento controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade específica de catalase (CAT) em cotilédones de soja em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole nos ensaios I e II

Tratamento	Ensaio I			Ensaio II		
	1º horário	2º horário	Média	1º horário	2º horário	Média
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{proteína}$					
Controle	0,55 aA	0,47 aA	0,51	4,85 aA	3,97 abB	4,41
<i>Trichoderma asperellum</i>	0,56 aA	0,48 aA	0,52	4,52 aA	4,48 aA	4,50
<i>Bacillus subtilis</i>	0,57 aA	0,26 aB	0,42	4,52 aA	3,57 bB	4,05
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,56 aA	0,45 aA	0,50	4,94 aA	4,16 abA	4,55
Fungicida	0,55 aA	0,48 aA	0,47	4,43 aA	3,95 abA	4,19
Média	0,56	0,41		4,65	4,03	
CV (%)	42					

*Trichoderma asperellum* BV10 (Tricho-Turbo®); *B. subtilis* BV02(Bio-Imune®); *Bacillus amyloliquefaciens* BV03 (No-Nema®); NS=não significativo; Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Fisher (p<0,5).

Na tabela 2, pode-se observar que a atividade da POX não diferiu em função dos tratamentos de sementes (1º horário) para ambos os ensaios (I e II), exceto para tratamento fungicida do ensaio II, que promoveu redução da atividade da enzima em relação ao controle. No 2º horário de coleta (após inoculação) o tratamento de sementes com *T. asperellum* BV10 promoveu 173% e 126% de incremento na atividade da POX quando comparado ao controle, nos ensaios I e II, respectivamente.

Tabela 2 - Atividade específica de peroxidase do guaiacol (POX) em cotilédono de soja m função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole no ensaio I e ensaio II

Tratamento	Ensaio I			Ensaio II		
	1º horário	2º horário	Média	1º horário	2º horário	Média
	absorbância min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> de proteína					
Controle	1,62 aA	1,85 bA	1,74	4,78 aA	5,56 bcA	5,17
<i>Trichoderma asperellum</i>	1,17 aB	3,21 aA	2,19	4,50 aB	7,03 aA	5,76
<i>Bacillus subtilis</i>	1,58 aA	1,89 bA	1,73	4,28 aA	4,40 cA	4,34
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,39 aA	2,39 bA	1,80	4,11 abB	6,68 abA	5,40
Fungicida	1,27 aA	1,75 bA	1,46	2,98 bB	5,45 bcA	4,22
Média	1,39	2,22		4,13	5,82	
CV (%)		52			19	

*Trichoderma asperellum* BV10 (Tricho-Turbo®); *B. subtilis* BV02(Bio-Imune®); *Bacillus amyloliquefaciens* BV03 (No-Nema®); NS=não significativo; Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Fisher (p<0,5).

Pelo desdobramento dos horários de coleta dentro dos tratamentos observou-se que houve aumento da atividade da POX no 2º horário de coleta comparado ao 1º horário, nos ensaios I e II, ao tratar as sementes de soja com *T. asperellum* BV10 (Tabela 2). O tratamento *B. amyloliquefaciens* BV03 promoveu incremento da POX no 2º horário de coleta em comparação com primeiro, no ensaio II.

Ao quantificar a atividade específica da FAL (Tabela 3), notou-se que o tratamento de sementes com *T. asperellum* BV10 incrementou 65% a atividade da enzima no 1º horário, em relação ao controle, no ensaio I. No ensaio II, 2º horário, a atividade da FAL foi incrementada em 137% em resposta ao tratamento das sementes de soja com *B. amyloliquefaciens* BV03, comparada ao controle, não diferindo do *T. asperellum* BV10.

Ao analisar o desdobramento dos horários de coleta dentro dos tratamentos observou-se que houve aumento da atividade de FAL no 2º horário de coleta quando comparado ao 1º horário, nos ensaios I, em todos os tratamentos (Tabela 3). No ensaio II os tratamentos *B. amyloliquefaciens* BV03 e *T. asperellum* BV10 promoveram incremento da FAL no 2º horário quando comparado ao 1º horário de coleta.

Tabela 3 - Atividade específica de fenilalanina amônia liase (FAL) em cotilédone de soja m função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole no ensaio I e ensaio II

Tratamento	Ensaio I			Ensaio II		
	1º horário	2º horário	Média	1º horário	2º horário	Média
	$\mu\text{g de ácido trans-cinâmico h}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ de proteína}$					
Controle	0,44 aB	5,12 bA	2,78	0,45 aA	0,61 bA	0,53
<i>Trichoderma asperellum</i>	0,28 aB	8,49 aA	4,38	0,39 aB	0,75 abA	0,57
<i>Bacillus subtilis</i>	0,29 aB	3,56 bA	1,92	0,0 aA	0,34 bA	0,37
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,26 aB	5,10 bA	2,68	0,45 aB	0,84 aA	0,65
Fungicida	0,20 aB	4,71 bA	2,46	0,47 aA	0,61 bA	0,54
Média	0,29	5,40		0,43	0,63	
CV (%)	69			31		

*Trichoderma asperellum* BV10 (Tricho-Turbo®); *B. subtilis* BV02(Bio-Imune®); *Bacillus amyloliquefaciens* BV03 (No-Nema®); NS=não significativo; Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Fisher ( $p < 0,5$ ).

Ao quantificar o acúmulo de gliceolina (GLI) em cotilédones de soja notou-se que o acúmulo da fitoalexina em resposta apenas ao tratamento das sementes foi inferior ao controle em resposta ao *B. amyloliquefaciens* BV03 nos 1º horário dos ensaios I e II Não houve diferença em *B. amyloliquefaciens*, que não induziu o acúmulo da gliceolina (Tabela 4). O acúmulo de GLI não foi influenciado pelo horário de coleta no ensaio I, ou seja, mesmo após a inoculação não houve estímulo para a síntese de fitoalexina, entretanto, no ensaio II observou-se redução desta no 2º horário de coleta quando comparado ao 1º horário, em todos os tratamentos, exceto para *B. amyloliquefaciens* BV03, que não foi observado diferença entre o 1º e 2º horário de coleta (Tabela 5).

Tabela 4 - Acúmulo de gliceolina (GLI) em cotilédone de soja em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole no ensaio I e ensaio II

Tratamento	Ensaio I			Ensaio II		
	1º horário	2º horário	Média	1º horário	2º horário	Média
	$\text{ABS}_{\text{gpf}}^{-1}$					
Controle	1,92 abA	1,68 aA	1,80	2,03 aA	0,90 aB	1,46
<i>Trichoderma asperellum</i>	2,11 abA	1,68 aA	1,90	2,24 aA	1,29 aB	1,76
<i>Bacillus subtilis</i>	2,29 aA	1,88 aA	2,08	1,95 aA	1,20 aB	1,58
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,61 bA	1,67 aA	1,64	1,56 bA	1,41 aA	1,48
Fungicida	1,99 abA	1,57 aA	1,78	2,13 aA	1,27 aB	1,70
Média	1,98	1,70		1,98		
CV (%)	24			17		

*Trichoderma asperellum* BV10 (Tricho-Turbo®); *B. subtilis* BV02(Bio-Imune®); *Bacillus amyloliquefaciens* BV03 (No-Nema®); NS=não significativo; Médias seguidas da mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, não diferem entre si, pelo teste Fisher ( $p < 0,5$ ).



Na tabela 5, nota-se que o *T. asperellum* BV10 foi o tratamento que se destacou quanto a indução de mecanismo de resistência e controle da antracnose, quadro em verde, que indicam resultados superiores ao controle, visto que este promoveu incremento da atividade da POX no 2° horário de coleta (24 horas após a inoculação do *C. truncatum*) nos ensaios I e II. O *T. asperellum* BV10 também promoveu incremento de FAL no 2° horário de coleta no ensaio, além de reduzir o tamanho do diâmetro da lesão da antracnose.

Tabela 5 - Frequência de resultados das variáveis analisadas catalase (CAT), peroxidase do guaiacol (POX), fenilalanina amônia liase (FAL), gliceolina (GLI) e diâmetro da lesão de antracnose (DLA) em cotilédones de soja, em função da inoculação de sementes com agentes de biocontrole no ensaio I e ensaio II

Tratamento	Ensaio I								
	Variáveis analisadas								
	CAT		POX		FAL		GLI		DLA
	1° h	2° h	1° h	2° h	1° h	2° h	1° h	2° h	
<i>Trichoderma asperellum</i>	Amarelo		Verde		Amarelo		Amarelo		Verde
<i>Bacillus subtilis</i>	Amarelo		Amarelo		Amarelo		Amarelo		Amarelo
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Amarelo		Amarelo		Amarelo		Vermelho		Amarelo
Fungicida	Amarelo		Amarelo		Amarelo		Amarelo		Amarelo
Tratamento	Ensaio II								
	Variáveis analisadas								
	CAT		POX		FAL		GLI		DLA
	1° h	2° h	1° h	2° h	1° h	2° h	1° h	2° h	
<i>Trichoderma asperellum</i>	Amarelo		Verde		Amarelo		Amarelo		Verde
<i>Bacillus subtilis</i>	Vermelho		Vermelho		Amarelo		Amarelo		Amarelo
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Amarelo		Amarelo		Amarelo		Amarelo		Amarelo
Fungicida	Amarelo		Vermelho		Amarelo		Amarelo		Amarelo

*T. asperellum* BV10= *Trichoderma asperellum* BV10 (Tricho-Turbo®); *B. subtilis* BV02(Bio-Imune®); *Bacillus amyloliquefaciens* BV03 (No-Nema®); coloração amarela = não diferiram do controle; coloração vermelha = obtiveram resultados inferiores ao controle; coloração verde = obtiveram resultados superiores ao controle.

Os tratamentos, *T. asperellum* BV10, *B. subtilis* BV02, *B. amyloliquefaciens* BV03 e Carbendazim + Thiram não influenciaram a atividade das enzimas antioxidante, CAT e POX, e a enzima do metabolismo dos fenilpropanoides, FAL, em cotilédones de plântulas aos sete dias após a germinação e ainda não inoculadas com *C. truncatum* (1° horário de coleta,). Isto indica que os agentes de biocontrole não acionam de forma contínua e sistêmica os mecanismos de defesa em cotilédones de plântulas de soja, quando realizado via tratamento de sementes. Do ponto de vista da indução o acionamento de mecanismos de defesa contínuo pode gerar um custo energético a planta na presença de microrganismos colonizadores da rizosfera e/ou endofítico, reduzindo o desenvolvimento e produtividade da cultura (MATYSSEK, et al., 2012; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018).

No segundo horário de coleta, vinte quatro horas após a inoculação do *C. truncatum*, observou-se incremento de 173% e 126% da enzima POX, no ensaio I e II, respectivamente, além do incremento de 65% da FAL, após a inoculação do patógeno, no ensaio I, ao aplicar o tratamento de sementes de soja com *T. asperellum* BV10. O aumento destas enzimas após a inoculação do patógeno, não conteve a formação da infecção inicial do *C. truncatum*, entretanto pode estar correlacionada a contenção da colonização, pois houve redução de 61% e 24% do diâmetro da lesão da antracnose nos ensaios I e II, respectivamente.

O gênero *Trichoderma* tem sido descrito como potencial agente de biocontrole aos fitopatógenos na agricultura, como o gênero *Colletotrichum* (BEGUM et al., 2008; SHO VAN et al., 2008; JAGTAPA et al., 2012; KUCHLAN et al., 2019). Este atua por meio de mecanismos de competição por espaço e nutriente, antibiose, parasitismo e indução de mecanismos de defesa da planta contra patógenos (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2020; SOOD et al., 2020; VINALE; SIVASITHAMPARAM et al., 2020).

Ao acionar a resposta de defesa de planta, contra o patógenos, o gênero *Trichoderma*, atua impedindo a formação da infecção ou retardando crescimento deste, por meio do acúmulo de ERO's, fenóis, fitoalexinas, enzimas relacionada a patogênese, enzimas do ciclo oxidativo, enzimas do fenilpropanoides, aumento da espessura, densidade e incorporação de compostos secundários, como fenóis na parede celular, ou morte programada da tecido adjacente a infecção promovida por patógenos (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2020; GUPTA et al., 2020; SOOD et al., 2020; VINALE; SIVASITHAMPARAM et al., 2020). Esta resposta pode ser intensifica visto que este agente de biocontrole pode atuar alterando o metabolismo dos carboidratos e às atividades de; fotossíntese, atividades fisiológicas em enzimas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011; JAHAN et al., 2015; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018; MILJAKOVIĆ et al., 2020).

Entre as reações bioquímicas observadas ao tratar sementes de soja com *T. asperellum* BV10 e posteriormente inocular com a *C. truncatum*, destaca-se o incremento da atividade da POX, que é um importante mecanismos bioquímico no controle de doenças (CHRISTOPHER et al., 2010; NASERINASAB et al., 2011; SINGH et al., 2011; YOUSSEF et al., 2016; MOHAPATRA; MITTRA, 2017). Estas enzimas estão envolvidas na reação de dismutação de  $H_2O_2$  em água e oxigênio, reduzindo, dessa forma, o excesso de ERO's, formadas durante o estresse oxidativo causado pelo patógeno ao ser inoculado ou durante o processo de penetração e colonização (CHEN; SCHOPFER; 1999; BHATT; TRIPATHI, 2011; KUSHALAPPA et al., 2016; YANG et al., 2020). Assim, o incremento da POX, como visto

ao tratar sementes de soja com *T. asperellum* BV10 neste trabalho, é metodologia que permite indicar, indiretamente, o aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, visto que este é o principal substrato da enzima.

O acúmulo de ERO's, como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, são relatadas em reações interações incompatíveis entre plantas-patógeno, ou seja, resistência da planta ao se acumular nos locais de infecção, programando a morte celular localizada e/ou sendo agente de indução de genes de defesa em células adjacentes (LEVINE et al., 1994; MEHDY, 1994; LOLLE et al., 2020). Além disso, a peroxidase também está envolvida na catálise e na oxidação de vários substratos como compostos fenólicos e precursores de lignina ao reduzir (COSIO; DUNAND 2009). O papel das POX na polimerização da lignina é a função mais amplamente estudada desta classe de enzimas com subsequente deposição na parede celular, que irá atuar, posteriormente, na defesa da planta contra patógenos (VANHOLME et al. 2010; THAKUR; SOHAL, 2013; KUSHALAPPA et al., 2016; BEGOVIĆ et al., 2017), o que pode explicar o retardamento do desenvolvimento da lesão de antracnose ao utilizar o tratamento de sementes com *T. asperellum* BV10, neste trabalho.

O aumento da atividade de fenilalanina amônia liase observado após a inoculação do *C. truncatum* (2º horário do ensaio I e tendência do 2º horário do ensaio II) em plântulas que receberam o tratamento de sementes com *T. asperellum* BV10, também pode ligar-se na contenção do crescimento da lesão do patógeno. O aumento transitório na atividade da fenilalanina amônia-liase está relacionado a resistência adquirida e induzida (MAUCH-MANI; SLUSARENKO, 1996; SMITH-BECKER et al., 1998; SHINE et al., 2016). A enzima é precursora da rota dos fenilpropanoides originando diversos outros compostos originados a partir do ácido benzoico, como: cumarinas, precursores de lignina, amônia e outros, utilizados pelas plantas para a sua defesa (FORMENTINI, 2012).

Considerando o aumento das POX e FAL observado após a inoculação do patógeno em plântulas oriunda de sementes tratadas com *T. asperellum* BV10 observado neste trabalho, e conseqüente redução do diâmetro da lesão de antracnose em cotilédones de soja, pode ter ocorrido em primeiro, uma resposta pela acumulo de ERO's e posterior deposição de lignina e fenóis na parede celular, principalmente nas paredes secundárias, que se tornam mais espessas e densas, conferindo resistência e impermeabilidade ao ataque por patógenos (MIEDES et al., 2014; PASCHOLATI; DALIO et al., 2018).

## 5 CONCLUSÃO

O tratamento de sementes de soja com *Trichoderma asperellum* BV10 promoveu redução do diâmetro da lesão de antracnose em condições controladas.

A aplicação de *Trichoderma asperellum* BV10 ativou os mecanismos de defesas latentes, promovendo incremento da atividade de peroxidase do guaiacol e fenilalanina amônia liase, após inoculação, com *Colletotrichum truncatum*.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, P.E.V.; BONALDO, S.M.; MORAES, S.R.G. Avaliação de *Trichoderma* spp. na cultura de feijão, em antracnose, mela e nematoide das galhas. **Scientific Electronic Archives**, v.7, n.1, p.17- 25, 2014.

ALMEIDA, A.M.R.; FERREIRA, L.P.; YORINORI, J.T.; SILVA, J.F.V. HENNING, A.A. Doenças da soja. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. CAMARGO, L. E. A. **Manual de fitopatologia** – doenças das plantas cultivadas. 4 ed. v.2, São Paulo: Agronômica Ceres Ltda, 2005. 663p.

AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos**. 5 ed. OuroFino: EditoraAgronômica Ceres, 2018. 573p.

AYERS, A.R.; EBEL, J.; FINELLI, F.; BERGER, N.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiology**, v.57, n.5, p.751-759, 1976.

BARBIERI, M.C.G., CIAMPI-GUILLARDI, M., MORAES, S.R.G., BONALDO, S.M., ROGÉRIO, F., LINHARES, R. R., & MASSOLA, N. S. *First Report of Colletotrichumcliviae* Causing Anthracnose on Soybean in Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 9, p. 1677–1677, 2017.

BEDENDO, I.P.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; AMORIM, L. Controle cultural e físico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO. **Manual de fitopatologia** – princípios e conceitos. 5 ed. v.1. OuroFino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p.229-238.

BEGOVIĆ, L.; LEPEDUS, H.; LALIĆ, A.; STOLFA, I.; JURKOVIĆ, Z.; KOVACEVIĆ, J.; CESAR, V. Involvement of peroxidases in structural changes of barley stem. **Bragantia**, v.76, n.3, p.352-359, 2017.

BEGUM, M.M.; SARIAH, M.; ZAINAL ABIDIN, M.A.; PUTEH, A.B.; RAHMAN, M.A. Antagonistic Potential of Selected Fungal and Bacterial Biocontrol Agents against *Colletotrichum truncatum* of Soybean Seeds. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science**, v.31, n.1, p.45 – 53, 2008.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxidases: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v.29, n.6, p.850-859, 2011.

BISHT, N.; KUMAR MISHRA, S.; SINGH CHAUHAN, P. *Bacillus amyloliquefaciens* inoculation alters physiology of rice (*Oryza sativa* L. var. IR-36) through modulating carbohydrate metabolism to mitigate stress induced by nutrient starvation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.15, n.143, p.937-951, 2019.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v.54, n.1, p.519-546, 2003.

BORAH, M. Identification of soybean diseases in Assam. **International Journal of Recent Scientific Research**, v.10, n.8, p.34154-34159, 2019.

BOSTOCK, R.M. Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit. Palo Alto, USA. **Annual Review of Phytopathology**, v.43, n.1, p.545-580, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

BRENT, R. J. **Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed?** 2<sup>a</sup> ed, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee, 2007. 60 p.

CAMARGO, L.E.A. Controle genético. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO. **Manual de fitopatologia – princípios e conceitos**. 5 ed. v.1. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p.229-238.

CAMARGO, L.E.A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO. **Manual de fitopatologia – princípios e conceitos**. 5 ed. v.1. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p.71-92.

CAVERZAN, A.; PASSAIA, G.; ROSA, S. B.; RIBEIRO, C. W.; LAZZROTTO, F.; MAGIR-PINHEIRO, M. Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, n.4, p.1011-1019, 2012.

CHIEN, Y.-C.; HUANG, C.-H. Biocontrol of bacterial spot on tomato by foliar spray and growth medium application of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Trichoderma asperellum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.156, n.1, p.995–1003, 2020.

CHEN, S.X.A.; SCHOPFER, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. **European Journal of Biochemistry**, v.260, n.3, p.726-735, 1999.

CHOWDHURY, S.P.; HARTMANN, A.; GOA, X.; BORRIS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: a review. **Frontiers in Microbiology**, v.6, n.780, p.11, 2015.

CHRISTOPHER, D.J.T.; RAJ, S.; RANI, S.U.; UDHAYAKUMAR, R. Role of defense enzymes activity in tomato as induced by *Trichoderma virens* against *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f sp. **lycopersici**. **Journal of Biopesticides**, v.3, n.1, p.158 – 162, 2010.

CIAMPI-GUILLARDI, M.; RAMIRO, J.; MORAES, M.H.D.; BARBIERI, M.C.G.; MASSOLA JÚNIOR, N.S. Multiplex qPCR assay for direct detection and quantification of *Colletotrichum truncatum*, *Corynespora cassicola* and *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean seeds. **PlantDisease**, v.1, n.1, p.1-43. 2020.

CONTESSA, M.A.C. A **expansão do complexo de soja no brasil**. 2020. 117 f. Dissertação (Mestrado em História) - Programa de Pós-Graduação em História da Pontifícia, Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

CNA. Panorama do Agro. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>> Acesso em: 17 de maio de 2020.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília: CONAB, v. 5, n. 8, p. 145, 2018.

CONTRERAS-CORNEJO, H.A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. Interactions of *Trichoderma* with plants, insects, and plant pathogen microorganisms: chemical and molecular bases. MÉRILLON, J.-M.; RAMAWAT, K.G. (eds.). **Co-evolution of secondary metabolites**. Cham: Springer Nature Switzerland AG, 2020. p.263-290.

COSIO, C.; DUNAND, C. Specific functions of individual class III peroxidase genes. **Journal of Experimental Botany**, v.60, n.2, p.391-408, 2009.

DIAS, M.D.; DIAS-NETO, J.J.; SANTOS, MARIA D.M.; FORMENTO, A.N.; BIZERRA, LINCOLN, V.A.S.; FONSECA, M.E.N.; BOITEUX, L.S.; CAFÉ-FILHO, A.C. Current status of soybean anthracnose associated with *Colletotrichum truncatum* in Brazil and Argentina. **Plants**, v.8, n.459, p.1-19, 2019.

DIAS, M.D.; PINHEIRO, V.F.; CAFÉ-FILHO, A.C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. **Summa Phytopathologica**, v.42, n.1, p.18-23, 2016.

DUBERY, I.A.; SANABRIA, N.M.; HUANG, J.C. Nonspecific perception in plant innate immunity. In: Lopes-LARREA, C (ed.). **Self and noself**. Johannesbug: Landes Bioscience and Springer Science, 2012.

ELFSTRAND, M.; SITBON, F.; LAPIERRE, C.; BOTTIN, A.; VON ARNOLD, S. Altered lignin structure and resistance to pathogens in spi 2 -expressing tobacco plants. **Planta**, v.214, n.5, p.708–716, 2002.

FONSECA, F.; PERES, F.; FIRMO, J. O. A.; UCHÔA, E. Percepção de risco: maneiras de pensar e agir no manejo de agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 39-50, 2007.

FORMENTINI, H.M. **Avaliação de indutores de resistência biótico e abiótico e extratos vegetais no controle de Meloidogyne incógnita em tomateiro**. 2012. 90f. Tese (Doutorado em Produção vegetal) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Marechal Cândido Rondon, 2012.

GALLI, J.A.; PANIZZI, R.C.; VIEIRA, R.D. Efeito de *Colletotrichumdematium* var. *truncata* e *Phomopsissojae* na qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja. **Summa Phytopathologica, Botucatu**, v.33, n.1, p.40-46, 2007.

GARCIA-BRUGGER, A; LMAOTTE, O.; VANDELLE, E.; BOURQUE, S.; LECOURIEUX, D.; POISSOT, B.; WENDEHENNE, D.; DUGIN, A. Early signaling events induced by elicitors of plant diseases. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**, v.19, n.7, p.711-724, 2006.

GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; SOARES, R.M.; SEIXAS, C.D.S.; DIAS, W.P.; MEYER, M.C.; COSTAMILAN, L.M.; HENNING, A. A. **Doenças da Soja**. 5. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014.

GODOY, C.V.; BUENO, A.F.; GAZZIERO, D.L.P. Brazilian Soybean Pest Management and Threats to its Sustainability. **Outlooks on Pest Management**, v.26, n.3, p.113–117, 2015.

GOTH, L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. **ClinicaChimica Acta**, v.196, n.2-3, p.143-151, 1991.

GLICK, B.R. **Beneficial plant-bacterial interactions**. Cham: Springer Nature Switzerland. 2020.

GUPTA, R.; BAR, M. Plant immunity, priming, and systemic resistance as mechanisms for *Trichoderma* spp. biocontrol. SHARMA, A. K.; SHARMA, P. (Eds.). (2020). **Trichoderma: Rhizosphere Biology**. Gateway East Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2020. p. 81-110.

GUZMÁN-VALLE, P.; BRAVO-LUNA, L.; MONTES-BELMONT, R.; GUIGÓN-LÓPEZ, C.; SEPÚLVEDA-JIMÉNEZ, G. Induction of resistance to *Sclerotium rolfsii* in different varieties of onion by inoculation with *Trichoderma asperellum*. **European Journal of Plant Pathology**, v.138, n.2, p.223–229, 2013.

HAMAWAKI, O.T.; HAMAWAKI, R.L.; NOGUEIRA, A.P.O.; GLASENAPP, J.S.; HAMAWAKI, C.D.L.; SILVA, C..O.da. Evaluation of soybean breeding lineages to new sources of root-knot nematode resistance. **Ciência e Agrotecnologia**, v.43, n.1, p.1-8, 2019.

HANIF, A.; ZHANG, F.; LI, P. LI, C.; XU, Y.; ZUBAIR, M.; ZHANG, M.; JIA, D.; ZHAO, X.; LIANG, J.; MAJID, T.; YAN, J.; FARZAND, A.; WU, H.; GU, Q.; GAO, X. Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. **Toxins**, v.11, n.5, p. 1-11, 2019.

HARTMAN, G.L.; WEST, E.D.; HERMAN, T.K. Crops that feed the World 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests. **Food Security**, v.3, n.1, p.5-17, 2011.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; FATHI ABD\_ ALLAH, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. Saudi Journal of Biological Sciences. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.26, n.1, p.1291–1297, 2019.

HEIL, M.; BOSTOCK, R.M. Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. Oxford, UK. **Annals of Botany**, v.89, n.5, p.503-512, 2002.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, Á.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 5ª edição, Londrina: Embrapa Soja, 2014. (Documentos, 256)

JAGTAPA, G.P.; GAVATEA, D.S.; DEYA, U. Control of *Colletotrichum truncatum* causing anthracnose/pod blight of soybean by aqueous leaf extracts, biocontrol agents and fungicides. **Scientific Journal of Agriculture**, v.1, n.2, p.39-52, 2012.

JAHAN, A.; JAHAN, N.; YEASMIN, F.; HOSSAIN, M.D.; HOSSAIN, M.A. Biological control of anthracnose of soybean. **Research in Agriculture Livestock and Fisheries**, v.2, n.3, p.419–426, 2015.

JULIATTI, F.C.; MESQUITA, A.C.O.; TEIXEIRA, F.G.; BELOTI, I.F.; MOTA, MOREIRA, L.C.B.; FONSECA, L.J.; SOUSA, L.A.; SOUZA, M.S.X.A.; SILVA, N.S.; ZANCAN, N.L.B.; MORAIS, T.P. Caracterização de genótipos de soja com resistência parcial à ferrugem da soja. **Summa phytopathologica**, v.45, n.3, p.313-319, 2019.

KHANNA, K.; LOPEZ-GARRIDO, J.; POGLIANO, K. (2020). Shaping an Endospore: Architectural Transformations During *Bacillus subtilis* Sporulation. **Annual Review of Microbiology**, v.74, n.1, p. 361–86, 2020.

KUCHLAN, P.; KUCHLAN, M.K.; ANSARI, M.M. Efficient application of *Trichoderma viride* on soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seed using thin layer polymer coating. **Legume Research - An International Journal**, v.42, n.2, p.260-264, 2019.

KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus***: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de produção. 2007. 138f. Tese (Doutorado em Agronomia – área de concentração fitopatologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.



KUSHWAHA, K.; KASHYAP, P.L.; SRIVASTAVA, A.K.; TIWARI, R.K. Plant growth promoting and antifungal activity in endophytic *Bacillus* strains from pearl millet (*Pennisetum glaucum*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.51, n.1, p.229–241, 2020.

KUSHALAPPA, A.C.; YOGENDRA, K.N.; SHAILESH, K. Plant Innate Immune Response: qualitative and quantitative resistance. **Critical Reviews In Plant Sciences**, v.35, n.1, p.38–55, 2016.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.48, n.1, p.113-121, 2008.

LEVINE, A.; TENHAKEN, R.; DIXON, R.; LAMB, C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v.79, n.4, p.583-593, 1994.

LOLLE, D.S.; STEVENS, D.; COAKER, G. Plant NLR-triggered immunity: from receptor activation to downstream signaling Signe. **Current Opinion in Immunology**, v.62, n.1, p.99–105, 2020.

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**, v.25, n.3, p.244-249, 1999.

MACHADO, A. C. Z.; AMARO, P. M.; SILVA, S. A. da. Two novel potential pathogens for soybean. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, p. 1-13, 2019.

MALIK, N. A. A.; KUMAR, I. S.; NADARAJAH, K. Elicitor and receptor molecules: orchestrators of plant defense and immunity. **International Journal Molecular Sciences**. v. 21, n. 3, p. 1-34, 2020.

MATYSSEK, R.; SHNYDER, H.; OBWALD, W.; ERNEST, D.; MUNCH, J.C.; PRETZSCH, H. (Eds) **Growth and defence in plants: resource allocation and multiple scales**. Springer: Berlin, 2012. 474p.

MAUCH-MANI, B.; SLUSARENKO, A. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. **PlantCell**, v.8, v.2, p.203–212, 1996.

MEDEIROS, F.H.V.; SILVA, J.C.P; PASCHOLATI, S.F. Controle biológico de doenças de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO. **Manual de fitopatologia – princípios e conceitos**. 5 ed. v.1. OuroFino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p.261-272.

MEHDY, M. C. Active oxygen species in plant defence against pathogens. **PlantPhysiology**, v.105, n. 1, p.467-472, 1994.

MENEZES, J.P.; JUNGES, E.; BLUME, E.; PEREIRA, M.E. Toxicologia do biopreparado a base de *Trichoderma* sp. (isolado UFSM T17) administrado em mamífero. **Revista da FZVA**, v.17, n.1, p.38-50, 2009.

MIEDES, E.; VANHOLME, R.; BOERJAN, W.; MOLINA, A. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. **Frontiers in Plant Science**, v.5, n.1, p.1-13, 2014.

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. the significance of bacillus spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**. v.8, n.1037, p. 1-19, 2020.

MOHAPATRA, S.; MITTRA, B. Alleviation of *Fusarium oxysporum* induced oxidative stress in wheat by *Trichoderma viride*. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v.50, n.1-2, p.84-96, 2017.

NAKKEERAN, S.; RAJAMANICKAM, S.; VANTHANA, M.; RENUKADEVI, P.; MUTHAMILAN, M. Harnessing the perception of *Trichoderma* signal molecules in rhizosphere to improve soil health and plant health. SHARMA, A. K.; SHARMA, P. (Eds.). (2020). **Trichoderma: Rhizosphere Biology**. Gateway East Springer Nature Singapore Pte Ltd, 2020. p. 61-80.

NASERINASAB, F.; SAHEBANI, N.; ETEBARIAN, H.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum* BI and salicylic acid on Tomato. **African Journal of Food Science**, v.5, n.3, p.276 – 280, 2011.

NATARAJ, V.; MARANNA, S.; KUMAWAT, G.; GUPTA, S.; RAJPUT, L. S.; KUMAR, S.; SHARMA, A. N.; BHATIA, V. S. Genetic inheritance and identification of germplasm sources for anthracnose resistance in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Genet Resour Crop Evol*, v.67, n.1, p.1449-1456, 2020.

NGUGIA, H.K.; DEDEJB, S.; DELAPLANEB, K.S.; SAVELLEA, A.T.; SCHERMA, H. Effect of flower-applied Serenade biofungicide (*Bacillus subtilis*) on pollination-related variables in rabbiteye blueberry. **Biological Control**, v.33, p.32-38, 2005.

OLIVEIRA, M.F.; SCHLINDWEIN, M.M. Índice de vantagem comparativa revelada para o complexo soja da Região Centro-Oeste brasileira. **Revista de Estudos Sociais**, v.17, n.33, p.109-131, 2015.

OLIVEIRA, V.A.; MARTINS, L.P.; GONÇALVES, R.C.; BENÍCIO, L.P.F.; COSTA, D.L.; LUDWIG, J. Use of seed treatment with fungicide in control of *Colletotrichum truncatum* and physiological quality of soybean seeds *Glycine max*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.2: p. 98 -106, 2013.

PASCHOLATI, S.F.; DALIO, R.J.D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO. **Manual de fitopatologia – princípios e conceitos**. 5 ed. v.1. OuroFino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p.424-450.

PENHA, R.O.; VANDENBERGHE, L.P.S.; FAULDS, C.; SOCCOL, V.T.; SOCCOL, C.R. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations. **Planta**, v.251, n.70, p.1-15, 2020.

PÉREZ-GARCIA, D.R.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, n.2, p.187-193, 2011.

PEREIRA, C.E.; OLIVEIRA, J.A.; ROSA, M.C.M.; OLIVEIRA, G.E.; COSTA NETO, J. Tratamento fungicida de sementes de soja inoculadas com *Colletotrichum truncatum*. **Ciência Rural**, v.39, n.9, p.2390-2395, 2009.

PESQUEIRA, A.S.; BACCHI, L.M.A.; GAVASSONI, W.L. Associação de fungicidas no controle da antracnose da soja no Mato Grosso do Sul. **Revista Ciência Agrônômica**, v.47, n.1, p.203-212, 2016.

POTI, T.; MAHAWAN, K.; CHEEWANGKON, R.; ARUNOTHAYANAN, H.; AKIMITSU, K.; NALUMPANG, S. Detection and molecular characterization of carbendazim-resistant *Colletotrichum truncatum* Isolates causing anthracnose of soybean in Thailand. **Journal of Phytopathology**, v.168, n.5, p.267-278, 2020.

RAI, S., SOLANKI, M. K., SOLANKI, A. C., & SURAPATHRUDU, K. (2019). Biocontrol Potential of *Trichoderma* spp.: Current Understandings and Future Outlooks on Molecular Techniques. *Plant Health Under Biotic Stress*, 129–160.

RASHAD, Y.M.; ABBAS, M.A.; SOLIMAN, H.M.; ABDEL-FATTAH, G.G.; ABDEL-FATTAH, G.M. Synergy between endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* GGA and arbuscular mycorrhizal fungi induces plant defense responses against white rot of garlic and improves host plant growth. **Phytopathologia Mediterranea**, v.59, n.1, p.169-186, 2020.

ROGÉRIO, F.; CIAMPI-GUILLARDI, M.; BARBIERI, M.C.G.; BRAGANCA, C.A.D.; SEIXAS, A.M.R.; ALMEIDA, C.D.S.; MASSOLA JR., N.S. Phylogeny and variability of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v.122, n.1, p.402—415, 2016.

ROGÉRIO, F.; GLADIEUX, P.; MASSOLA JUNIOR, N.S.; CIAMPI-GUILLARDI, M. Multiple introductions without admixture of *Colletotrichum truncatum* associated with soybean anthracnose in Brazil. **Phytopathology**, v. 109, p. 681-689, 2019.

SABATÉ, D. C., PÉREZ BRANDAN, C., PETROSELLI, G., ERRA-BALSELLS, R., & AUDISIO, M. C. (2017). Decrease in the incidence of charcoal root rot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Bacillus amyloliquefaciens* B14, a strain with PGPR properties. **Biological Control**, 113, 1–8.

SAVARY, S.; WILLOCQUET, L.; PETHYBRIDGE, S.J.; ESKER, P.; MCROBERTS, N.; NELSON, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v.1, n.1, p.1-10, 2019.

SHARMA, S.K; GUPTA, G.K; RAMTEKE, R. *Colletotrichum truncatum* [(Schw.) Andrus & W.D. Moore], the causal agent of anthracnose of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] - A Review. **Soybean Research**, v.9, n.1, p.31-52, 2011.

SHINE, M. B.; YANG, J.-W. EL-HABBAK, M.; NAGYABHYRU, P.; FU, D.-Q.; NAVARRE, D.; GHABRIAL, S.; KACHROO, P.; KACHROO, A. Cooperative functioning between phenylalanine ammonia lyase and isochlorogenic acid synthase activities contributes to salicylic acid biosynthesis in soybean. **New Phytologist**, v.212, n.1, p.627–636, 2016.

SHOVAN, L.R.; BHUIYAN, M.K.A.; BEGUM, J.A.; PERVEZ, Z. In vitro Control of *Colletotrichum dematium* causing anthracnose of soybean by fungicides, plant extracts and *Trichoderma harzianum*. **International Journal of Sustainable Crop Production**, v.3, n.3, p.10-17, 2008.

SILVA, H.F.; SANTOS, A.M.G.; AMARAL, A.C.T.; BEZERRA, J.L.; LUZ, E.D.M.N. Bioprospection of *Trichoderma* spp. originating from a Cerrado-Caatinga ecotone on *Colletotrichum truncatum*, in soybean. **Revista Brasileira Ciência Agrária.**, v.15, n.1, p.1-7, 2020.

SILVA, J.B. **Reação de cultivares de soja e agressividade de isolados de *Colletotrichum* spp., agente causal da antracnose da soja.** 2016. 56 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, Sinop, 2016.

SILVA JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO. **Manual de fitopatologia** – princípios e conceitos. 5 ed. v.1. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, 2018. p.239-260.

SINGH, B.N.; SINGH, A.; SINGH, S.P.; SINGH, H.B. *Trichoderma harzianum*- mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. **European Journal of Plant Pathology**, v.131, n.9, p.121–134, 2011.

SMIT, F.; DUBERY, I.A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. **Phytochemistry**, v.44, n.5, p.811–815, 1997.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defense mechanisms and stimulus response system. **The New Phytologist**, v.132, n.1, p.1-45, 1996.

SMITH-BECKER, J.; MAROIS, E.; HUGUET, E. J.; MIDLAND, S.L.; SIMS, J. J.; KEEN, N. T. Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 231–238, 1998.

SOLINO, A. J. S. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; OLIVEIRA, J. S. B.; ALENCAR, M. S. R.; RIBEIRO, L M. Induction of defense mechanisms from filtrates of saprophytic fungi against early blight disease in tomato. **African Journal of Microbiology Research**, v.10, n.44, p.1849-1859, 2016.

SOOD, M.; KAPOOR, D.; KUMAR, V.; SHETEIWY, M.S.; RAMAKRISHNAN, M.; LANDI, M.; ARANITI, F.; SHARMA, A. *Trichoderma*: The “Secrets” of a Multitalented Biocontrol Agent. **Plants**, v.9, n.762, p.1-25, 2020.

SUBEDI, U.; GHARTI, D.B.; NEUPANE, S.; GHIMIRE, T. Management of anthracnose in soybean using fungicide. **Journal of Nepal Agricultural Research Council**, v.1, n.1, p.29-32, 2015.

SUR, S.; ROMO, T.D.; GROSSFIELD, A. Selectivity and mechanism of fengycin, an antimicrobial lipopeptide, from molecular dynamics. **The Journal of Physical Chemistry**, v.122, n.8, p.2219–2226, 2018.

TAHIR, H.A.S.; GU, I.; WU, H.; RAZA, W.; SAFDAR, A.; HUANG, Z.; RAJER, F.U.; GAO, X. Effect of volatile compounds produced by *Ralstonia solanacearum* on plant growth promoting and systemic resistance inducing potential of *Bacillus* volatiles. **BMC Plant Biology**, v.17, n.133, p.1-16, 2017.

TAVANTI, T.R.; TAVANTI, R.F.R.; GALINDO, F.S.; SIMÕES, I.; DAMETO, L.S.; SÁ, M.E. Yield and quality of soybean seeds inoculated with *Bacillus subtilis* strains. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.24, n.1, p.65-71, 2020.

TIAN, T.; REVERDY, A.; SHE, Q.; SUN, B.; CHAI, Y. The role of rhizo deposits in shaping rhizomicrobiome. **Environmental Microbiology Reports**, v.12, n.2, p.160–172 2020.

TIAN, L.; LIN, X.; TIAN, J.; JI, L.; CHEN, Y.; TRAN, L.-S. P.; TIAN, C. Research Advances of Beneficial Microbiota Associated with Crop Plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.1792, p. 1-18, 2020.

THAKUR, M.; B. S. SOHAL. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN Biochemistry**, v.1, n.1, p.1-10, 2013.

TOMÁNKOVÁ K, LUHOVÁ L, PETRIVALSKY M, PEC P, LEBEDA A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.68, n.1, p.22-32, 2006.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJAN, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, v.153, n.3, p.895-905, 2010.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K. Beneficial effects of *Trichoderma* secondary metabolites on crops. **Phytotherapy Research**, v.1, n.1, p.1-8, 2020.

XING, K.; ZHU, X.; PENG, X.; QIN, S. Chitosan antimicrobial and eliciting properties for pest control in agriculture: a review. **Agronomy for sustainable development**, v.35, n.2, p.569-588, 2015.

WALTERS, D.; WALSH, D.; NEWTON, A.; LYON, G. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, Athens, v.95, n.12, p.1378-1373, 2005.

WANG, Y.-Y.; LI, P.-S.; ZHANG, B.-X.; WANG, Y.-P.; MENG, J.; GAO, Y.-F.; HE, X.-M.; HU, X.-M. Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability, **Bioresources**, v.15, n.2, p.2560-2578, 2020.

WANG, W.; FENG, B.; ZHOU, J.-M.; TANG, D. Plant immune signaling: Advancing on two frontiers. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.60, n.1, p.2-24, 2020.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. **The EMBO Journal**, v.16, n.16, p.4806-4816, 1997.

YADAV, Y.K.; KHARE, C.P.; TIWARI, P.K.; SRIVASTAVA, J.N. Important disease of soybean crop and their management. In: SRIVASTAVA, J.N., SINGH, A.K. (ed.). **Disease of field crops diagnosis and management: pulses, oil seeds, narcotics, and sugar crop**. edition 1, v. 2, New Jersey: Ed. Apple Academic Press, 2020.

YANG, J.; CAO, W.; RUI, Y. Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms, **Journal of Plant Interactions**, v.12, n.1, p.158-169, 2017.

YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.1, p.5942-5944, 2012.

YOUSSEF, S.A.; TARTOURA, K.A.; ABDELRAOUF, G.A. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. **Biological Control**, v.100, p.79-86, 2016.

ZHANG, K.; SU, L.; WU, J. (2020). Recent Advances in Recombinant Protein Production by *Bacillus subtilis*. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.11, n.1, p. 6.1-6.24, 2020.

ZIEGLER, E.; PONTZEN, R. Specific inhibition of glucan-elicited glyceolin accumulation in soybeans by extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, n.3, p.321-331, 1982.