

**AVALIAÇÃO DE *Trichoderma harzianum*
SUPEREXPRESSANDO O GENE DE *AQUAPORINA* PARA O
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM FEIJÃO COMUM**

LARA BERNARDES DA SILVA FERREIRA
Tecnóloga em Gestão Ambiental

LARA BERNARDES DA SILVA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE *Trichoderma harzianum*
SUPEREXPRESSANDO O GENE DE *AQUAPORINA* PARA O
CONTROLE DE *Meloidogyne javanica* EM FEIJÃO COMUM**

Orientadora: Prof^o Dra. Pabline Marinho Vieira

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas para obtenção do título de MESTRE.

URUTAÍ – GO
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Campus Urutaí

F383a Ferreira, Lara Bernardes da Silva

Avaliação de *Trichoderma harzianum* superexpressando o gene de aquaporina para o controle de *Meloidogyne javanica* em feijão comum / Campus Urutaí. [manuscrito] / Lara Bernardes da Silva Ferreira. -- Urutaí, GO: IF Goiano, 2018.
25 fls.

Orientador: Dra. Pabline Marinho Vieira

Coorientador: Dr. Milton Luiz da Paz Lima

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, 2018.

1. Controle biológico. 2. aquaporina. 3. germinação. 4. blotter test.
5. nematoide. I. Título.

CDU 635



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PROTEÇÃO DE PLANTAS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação de *Trichoderma harzianum* superexpressando o gene de *aquaporina* para o controle de *Meloidogyne javanica* em feijão comum.

AUTORA: Lara Bernardes da Silva Ferreira

Dissertação defendida e aprovada como parte das exigências para obtenção do título de Mestra em Proteção de Plantas.

Banca Examinadora:

Prof.ª Dra. Pabline Marinho Vieira (orientadora)
Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí

Prof.ª Dra. Raphaela de Catro Georg
Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa
Universidade Federal de Goiás – Campus Samambaia

Urutaí, 06 de julho de 2018



ppgpp.urt@ifgoiano.edu.br



(64) 3465-1912

RODOVIA GERALDO S. NASCIMENTO,
KM 2,5
CEP 75790-000, URUTAÍ – GO
www.ifgoiano.edu.br/urutai



DEDICATÓRIA

Dedico à todos os brasileiros que contribuíram com seus impostos para que eu tivesse acesso a uma educação pública de qualidade, principalmente aqueles mais pobres que contribuem e não têm acesso ao ensino de pós-graduação público.

AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo e ao meu filho por estarem presentes e me apoiando durante todo o tempo de realização do mestrado.

À professora Pabline pela orientação, disponibilidade e acompanhamento nas atividades.

Ao professor Milton Lima pela coorientação, apoio, incentivo, disponibilidade e acompanhamento das atividades.

À professora Érica Leão-Araújo por todo incentivo, acompanhamento e apoio desde a seleção até a finalização do mestrado.

À toda equipe do laboratório de fitopatologia que foram de grande valia e contribuição nos experimentos. Meus sinceros agradecimentos ao professor Milton, Ana Lívia, Larissa e Paula.

À toda equipe do laboratório de nematologia, em especial a professora Gleina, Deborah e Leidiane.

À toda equipe do laboratório de Biotecnologia que me deram todo suporte e assistência durante a execução do trabalho.

Aos professores Anderson e Fernando Godinho pelas valiosas considerações que deram em meu trabalho durante a qualificação.

Aos colegas do PPGPP que fizeram com que essa empreitada se tornasse mais divertida e calorosa.

À todas as minhas amigas que ao longo dessa jornada estiveram ao meu lado torcendo por mim, me auxiliando ou simplesmente trocando uma palavra de carinho. Em especial: Amanda, Letícia, Érica Leão-Araújo, Janine e Muza,

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Urutaí, pela oportunidade de realização do mestrado, estendendo-se à todos os técnicos e docentes pelo valioso conhecimento adquirido. E por conceder minha liberação como servidora para desenvolvimento das atividades do mestrado.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO	3
MATERIAL E MÉTODOS	4
Obtenção e aplicação das bioformulações de <i>Trichoderma harzianum</i>	4
Avaliação da atividade de biocontrole de <i>Meloidogyne javanica</i>	5
Análise de germinação e vigor das sementes	5
Análise fitossanitária dos tratamentos utilizando o método “Blotter Test”	7
RESULTADOS.....	9
Efeito dos tratamentos com bioformulações contendo <i>T. harzianum</i> no biocontrole de <i>Meloidogyne javanica</i>	9
Efeito das bioformulações na qualidade fisiológica das sementes	10
Análise fisiológica e fitossanitária dos tratamentos	13
DISCUSSÃO	16
CONCLUSÃO.....	19
REFERÊNCIAS	20
APÊNDICES	25

RESUMO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa amplamente cultivada no Brasil em diferentes condições climáticas e épocas do ano. Entretanto, o cultivo do feijão tem diversos prejuízos relacionados às várias pragas e doenças de origem fúngica, bacteriana, virótica e nematódea. Diante disso, o controle biológico representa uma alternativa de menor custo que visa suprir a nova tendência mundial na agricultura, que é a sustentabilidade. Neste trabalho, foram avaliadas linhagens de *Trichoderma* sp. produzidas através de ferramentas biotecnológicas quanto à capacidade de controle biológico de nematoide e os seus efeitos na qualidade fisiológica e fitossanidade em sementes de feijão. Para isso, sementes foram tratadas com linhagens de *T. harzianum* selvagem, *T. harzianum* em condições de indução de enzimas líticas do micoparasitismo, e linhagens geneticamente modificadas para superexpressão do gene de aquaporina, proteína reconhecidamente envolvida no controle de *Fusarium* sp. Foi possível demonstrar que os tratamentos contendo linhagens geneticamente modificadas foram capazes de manter a atividade de controle biológico do nematoide *Meloidogyne javanica* em plantas de feijão quando comparados à linhagem selvagem e os produtos comerciais disponíveis no mercado. E, com relação a qualidade fisiológica, essas linhagens superexpressando aquaporina aumentaram a capacidade de absorção de água, e mantiveram os parâmetros de germinação e vigor quando comparados ao *T. harzianum* selvagem. Além disso, a análise fitossanitária das sementes revelou a manutenção da atividade de controle biológico e melhor aderência dos tratamentos contendo *T. harzianum* geneticamente modificado. Assim, a superexpressão de aquaporina em linhagens de *T. harzianum* tem potencial para aplicação em bioformulações nos tratamentos de sementes de *Phaseolus vulgaris*.

Palavras-chave: Controle biológico, aquaporina, germinação, blotter test, nematoide.

ABSTRACT

Common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) are leguminous plants widely grown in Brazil under different climatic conditions and seasons. However, the cultivation of beans has had severe damage caused by pest and diseases of fungal, bacterial, viral and nematode origin. Therefore, biological control are low cost strategies which aim to supply the new world trend in agriculture. In this work, *Trichoderma* sp. lineages are evaluated taking into account the biological control capacity of nematodes, vigor, and phytosanitary behavior of bean seeds. Hence, seeds were treated with three lineages: (i) wild *T. harzianum*; (ii) *T. harzianum* under conditions of lytic enzyme induction of mycoparasitism; (iii) and modified genetic *T. harzianum* with aquaporin gene overexpression. involved in the control of *Fusarium* sp. As a result, it was possible to demonstrate that treatments containing genetically modified lineages were able to maintain the biological control activity of the nematode *Meloidogyne javanica* in bean plants when compared to the wild lineage and the commercial products available in the market. And, with respect to physiological quality, these lines overexpressing aquaporin increased the water absorption capacity, and maintained the parameters of germination and vigor when compared to the wild *T. harzianum*. In addition, the phytosanitary analysis of the seeds revealed the maintenance of the biological control activity and better adherence of the treatments containing genetically modified *T. harzianum*. Thus, the overexpression of aquaporin in *T. harzianum* strains has potential for application in bioformulations in treatments seeds of *Phaseolus vulgaris*.

Key words: Biological control, aquaporin, germination, blotter test, nematode.

INTRODUÇÃO

O Brasil é país de destaque na produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), visto que o cereal que tem presença diária na dieta do brasileiro (POSSE et al., 2010; SILVA et al., 2008 SOUZA et al., 2016). Entretanto, diversos fatores ambientais afetam a produção desta leguminosa, como as condições climáticas adversas e os agentes fitopatogênicos (SOUZA et al., 2016). Neste sentido, há uma grande necessidade de medidas fitossanitárias que promovam maior produtividade e rentabilidade desta cultura.

As plantas de feijão são hospedeiras de várias doenças de origem fúngica, bacteriana, viral e nematódea (BAIDA et al., 2011; CANDIDA et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; SOUZA et al., 2016; POSSE et al. 2010). Sendo que, o feijoeiro é considerado como uma das leguminosas mais susceptível aos ataques dos nematoides fitoparasitas (FANCILLI & NETO, 2005). No Brasil, os fitonematoides mais frequentes no cultivo do feijão pertencem aos gêneros *Pratylenchus* e *Meloydogyne* (FERRAZ, 2005). Estes são responsáveis por grandes perdas do rendimento da cultura em campo, podendo variar de 10 a 90 %, e causar enormes perdas na agricultura (FERRAZ, 2005).

A maioria dos agentes causadores dos problemas fitossanitários no feijoeiro são transmitidos e/ou transportados pelas sementes (SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2016). Por isso, sementes de feijão contaminadas podem introduzir patógenos ainda inexistentes numa região, ou disseminar patógenos na área de cultivo provocando danos expressivos à cultura e grandes prejuízos econômicos aos produtores (TOURNAS., 2005; SILVA et al., 2008; SOUZA et al., 2016). Dessa forma, insumos agrícolas para o tratamento de sementes de feijão surgem como alternativas potenciais no controle fitossanitário.

O tratamento de sementes é um importante método que consiste na aplicação de produtos químicos (fungicidas, inseticidas e nematicidas) ou biológicos nas sementes para o controle fitossanitário, contribuindo para um melhor desempenho das sementes na lavoura (CORRÊIA et al., 2008). Entretanto, métodos químicos possuem elevados custos, riscos de contaminação ao meio ambiente e à saúde humana (LORITO et al., 2010; PEDRO et al., 2012; VINALE et al., 2008; WOO et al., 2014). Nesse contexto, o controle biológico se apresenta como alternativa aos métodos de controle químico existentes e representa uma perspectiva que visa suprir a nova tendência mundial da agricultura moderna com preocupações socioambientais.

Espécies do gênero *Trichoderma* sp. são mundialmente utilizadas no controle

biológico das principais doenças que afetam a cultura de feijão, como os diversos tipos de nematoides e fungos (AMIRA et al., 2018; CARVALHO et al., 2011; FRACETO et al., 2018; KIRIGA et al., 2018; SINGH & SCWARTZ, 2011). Isso deve-se aos mecanismos de ação desse fungo de controle biológico, que inclui: o micoparasitismo, antibiose, competição por nutrientes, indução de resistência e promoção de crescimento em plantas (LORITO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010; PEDRO et al., 2012; ZEILINGER et al., 2016). Atualmente, diversos trabalhos têm sido realizados avaliando o potencial do tratamento de sementes com *Trichoderma* no controle biológico de fitopatógenos (CARVALHO et al., 2011; MASTOURI et al., 2010; PILL et al., 2009; XUE et al., 2017;).

A genômica é a ciência de destaque para o estudo e seleção de linhagens de *Trichoderma sp.* a serem comercializadas em bioformulações para o controle biológico de fitopatógenos (LORITO et al., 2010; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2010; NICOLAS et al., 2014). Inclusive, linhagens geneticamente modificadas para superexpressão de aquaporina foram capazes de induzir o crescimento radicular e aéreo de plantas de feijão, além de apresentarem maior atividade antagonista a *Fusarium sp.*, principal fitopatógeno de feijão (VIEIRA et al., 2013). Além disso, plantas transgênicas com esse gene de aquaporina de *T. harzianum* aumentaram a tolerância a estresse hídrico e melhoraram parâmetros fisiológicos e biométricos (VIEIRA et al., 2017). Aquaporinas são proteínas integrais de membrana que possuem papel de transporte de água e de uma variedade de solutos de baixo peso molecular entre as membranas, sendo estes: H₂O₂, glicerol (AMIRA et al., 2018; BIERNET et al., 2008; MAUREL et al., 2016). De fato, estudos demonstram que aquaporinas são essenciais na troca de água associada a osmoregulação em microrganismos e, em plantas, estão associadas à transpiração, crescimento e tolerância a estresses (CALAMITA et al., 1998; HERNANDEZ-CASTRO et al., 2003; MEYRIAL et al., 2001; VIEIRA et al., 2018; WYSOCKI et al., 2001).

Neste trabalho, um gene de *T. harzianum* envolvido no controle biológico de *Fusarium sp.* e transporte de água foi superexpresso e as linhagens geneticamente modificadas foram avaliadas no tratamento de sementes de feijão comum quanto a sua eficácia no controle de *Meloidogyne javanica*, fitossanidade e qualidade das sementes.

OBJETIVO

Avaliar linhagens de *Trichoderma harzianum* geneticamente modificadas para a superexpressão de aquaporina quanto à eficácia no biocontrole de *Meloidogyne javanica*, qualidade fisiológica e fitossanidade de sementes de *P. vulgaris*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e aplicação das bioformulações de *Trichoderma harzianum*

Os tratamentos das sementes de *Phaseolus vulgaris*, cv. BRS Estilo, foram realizados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos avaliados em sementes de *Phaseolus vulgaris*.

TRATAMENTO	GRUPO	DESCRIÇÃO
NT	Controle	sem tratamento
wt	Selvagem	<i>Trichoderma harzianum</i> ALL42
wtQuit	Selvagem	<i>T. harzianum</i> com quitina comercial
wtRiz	com indução	<i>T. harzianum</i> com parede celular de <i>Rizoctonia solani</i>
aqpA	Geneticamente modificado	<i>T. harzianum</i> contendo 4 cópias do gene <i>aquaporina</i>
aqpC		<i>T. harzianum</i> contendo 2 cópias do gene <i>aquaporina</i>
C1	Comerciais	Ecotrich©
C2		Trichodermil©

Como controle positivo, foram utilizados dois tratamentos com formulações comerciais de *Trichoderma harzianum* produzidas por Ballagro (Ecotrich© - C1) e Koppert Brasil (Trichodermil© - C2). Sementes não tratadas (NT) foram utilizadas como controle negativo.

Trichoderma harzianum ALL42 (Coleção do laboratório de Enzimologia, UFG-ICB) foi incluído como tratamento em sua forma selvagem (wt) e em duas condições de indução dos genes do micoparasitismo, sendo elas: quitina comercial e parede celular de *Rizoctonia solani* (wtQuit e wtRiz). Para isso, os esporos de *T. harzianum* wt foram cultivados em erlenmeyers com agitação constante (180 rpm) à 28° C durante 12 horas, em meio MYG contendo 0,5% de extrato de malte, extrato de levedura à 0,25%, 1% de glicose e suplementada com 2% de parede celular inativada de *Rizoctonia solani* (*R. solani* autoclavada à 120 °C durante 20 min, lavada com água destilada e liofilizada) ou quitina comercial.

As linhagens geneticamente modificadas de *T. harzianum* ALL42 (aqpA e aqpC) para a superexpressão do gene de aquaporina foram utilizadas neste estudo. A concentração de suspensão de esporos utilizada para todos os tratamentos de sementes de feijão comum (*P. vulgaris*) foi de 10⁸ conídios por mL⁻¹ na proporção de 10 mL/Kg.

Avaliação da atividade de biocontrole de *Meloidogyne javanica*

Sementes foram tratadas com oito tratamentos de acordo com a Tabela 01 e crescidas em 1 quilo de substrato comercial estéril, mantidas em casa de vegetação com irrigação diária. Após 15 dias da semeadura foram inoculados 2 mL de uma suspensão contendo 2000 nematoides *Meloidogyne javanica* por muda. Aos 45 dias após a inoculação, foram avaliadas sete plantas por tratamento. As plantas foram removidas dos vasos, a parte aérea foi descartada e as raízes foram levadas ao laboratório onde foi feita a lavagem e aferida a massa fresca das raízes. Posteriormente, foi realizada a coloração de acordo com Taylor & Sasser (1978). Após a coloração, o índice de galhas e o índice de massa de ovos (IMO) foi quantificado de acordo com Hartman e Sasser (1985).

Em seguida realizou-se a extração do nematoide de raiz *Meloidogyne javanica* de acordo com o método da flutuação centrífuga em solução de sacarose com caulim de acordo com método de Coolen & D'Herde (1972), para avaliação da população final e para o cálculo do fator de reprodução (FR). O FR foi calculado para cada planta, dividindo a população final de cada planta (PF) pela população inicial inoculada (PI = 2000).

As análises estatísticas foram realizadas em um delineamento inteiramente casualizado. Foi adotado a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis entre os tratamentos ($p < 0,05$), uma vez que os dados não seguem uma distribuição normal. Aplicou-se o teste LSD em sua forma não paramétrica para comparações múltiplas entre as medianas de massa fresca de raiz e J2/OVOS/10g de raiz. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o ambiente R (R Core Team, 2017) de computação estatística.

Análise de germinação e vigor das sementes

Para a avaliação da viabilidade das sementes foi realizado os testes de germinação e, com objetivo de avaliar o vigor das sementes, foram realizados os testes de primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado, comprimento de plântulas, massa fresca e seca de plântulas e curva de embebição.

Teste de germinação: O teste foi conduzido de acordo com os critérios estabelecidos pela RAS – Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009), com 200 sementes por tratamento, distribuídos em quatro repetições de 50 sementes, utilizando como substrato papel de germinação, formando os rolos, umedecidos em solução à 0,1% de Nitrato de Cálcio na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco e colocados em

temperatura constante de 25 °C em câmara de germinação. As avaliações das plântulas foram efetuadas de acordo com os critérios estabelecidos pela RAS e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais. Aos cinco dias foram obtidos os dados de primeira contagem e, aos nove dias, os dados de germinação final.

Envelhecimento acelerado: Foi realizado pelo método Gerbox de acordo com a metodologia descrita por Marcos Filho (1994), com 40 mL de água destilada por Gerbox e camada única de sementes sob a tela de aço inox, mantidas à 41 °C por 48 horas em BOD. Decorrido este período as sementes foram submetidas ao teste de germinação de acordo com a RAS (BRASIL, 2009).

Comprimento de plântulas: Foram realizadas 4 repetições contendo 10 sementes por tratamento. As sementes foram dispostas em uma linha horizontal no terço superior do papel de germinação. O substrato, umedecimento e tempo e temperatura de exposição utilizados foram os mesmos citados para o teste de germinação. Ao final de nove dias foram tomadas as medidas das partes das plântulas normais (parte radicular e parte aérea) utilizando um paquímetro digital. O resultado foi a média, em centímetros, por repetição da parte aérea (CPA) e do sistema radicular (CSR).

Massa fresca e seca de plântulas: Foram utilizadas as plântulas normais obtidas do teste de comprimento de plântulas. Foram retirados os cotilédones e feito um corte para a separação da parte aérea e radicular. Para cada repetição foram utilizadas todas as 10 plântulas da repetição em saco de papel identificado previamente pesado, sacos separados para sistema radicular e parte aérea. A massa fresca da parte aérea (MFPA) e do sistema radicular (MFSR) foram expressos em gramas (g). Em seguida, os sacos contendo as partes das plântulas foram levadas a estufa à 60 °C por 48 horas e, após este período foi realizada a pesagem em balança de precisão. O resultado foi expresso em g, sendo a média da massa da parte aérea (MSPA) e sistema radicular (MSSR) de cada repetição.

Curva de embebição: Foi obtida pela pesagem sistemática de quatro repetições de 50 sementes, em intervalos de uma hora durante as 12 primeiras horas e de três horas até completar 24 horas e posteriormente as pesagens foram a cada 12 horas até atingir 50% de protrusão de raiz primária. As sementes foram envolvidas em uma folha de papel de germinação, umedecidas com água destilada, no volume 2,5 vezes o peso seco do papel e a porcentagem de absorção de água foi calculado de forma indireta, baseando-se no teor de água inicial das sementes e o peso úmido destas nos diferentes intervalos. As curvas de embebição utilizando as médias de cada tratamento foram ajustadas pelo modelo de

Peleg (PELEG, 1988). Bandas de 95% de confiança foram construídas para a comparação dos tratamentos. O modelo de Peleg é dado por:

$$f(t) = f_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 \cdot t}$$

onde $f(t)$ é a umidade no tempo t , f_0 é a umidade inicial e K_1 e K_2 são constantes.

As análises estatísticas foram realizadas em delineamento inteiramente casualizado. Foi adotado a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis entre os tratamentos ($p < 0,05$), uma vez que os dados não seguem uma distribuição normal. E uma análise multivariada (MANOVA) não paramétrica com Biplot com elipses de 95% de confiança. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o ambiente R (R Core Team, 2017).

Análise fitossanitária dos tratamentos utilizando o método “Blotter Test”

Sementes de *P. vulgaris* não desinfetadas e tratadas com as linhagens comerciais, geneticamente modificados, selvagem, selvagem com indução e um controle foram dispostas individualmente sobre camada de papel de filtro umedecido (2 folhas de papel mata borrão), mantendo-se distanciadas 1-2 cm uma da outra, dependendo do tamanho de sua maior dimensão, no interior de recipientes, como Gerbox, caracterizando o chamado “Blotter Test”. Foram realizadas 10 repetições com 25 sementes por tratamento e permaneceram sob incubação em câmaras de crescimento com fotoperíodo de 12 horas por um período de 8 dias à temperatura de $\pm 22^\circ\text{C}$.

As sementes foram examinadas individualmente com auxílio de um estereomicroscópio a resolução de 30-80X, pela ocorrência de frutificações típicas do crescimento de fungos. Preparou-se lâminas para observação ao microscópio ótico. Assim quantificou-se a porcentagem de emissão de raiz primária (ERP) que foi o número de sementes com pelo menos início do processo de germinação (emissão de raiz) pelo número total de sementes por Gerbox. A incidência de microrganismos (IM) foi calculada a partir da contagem do número de sementes que apresentavam estruturas de microrganismos na sua superfície dividida pelo número total de sementes avaliadas por Gerbox. Também foram identificados individualmente a incidência de cada gênero de microrganismos por tratamento.

As análises estatísticas foram realizadas em delineamento inteiramente casualizado. Foi adotado a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis entre os tratamentos ($p < 0,05$), uma vez que os dados não seguem uma distribuição normal. E uma análise multivariada (MANOVA) não paramétrica com Biplot com elipses de 95% de confiança. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o ambiente R (R Core Team, 2017).

RESULTADOS

Efeito dos tratamentos com bioformulações contendo *T. harzianum* no biocontrole de *Meloidogyne javanica*

Os dados das avaliações dos tratamentos no biocontrole de *M. javanica*, apresentados na Tabela 2, demonstram que os tratamentos contendo linhagens comerciais de *T. harzianum* (C1 e C2) foram os que apresentaram menores medianas na penetração de *M. javanica* juvenis na raiz de *P. vulgaris* quando comparados com todos os tratamentos. E ainda, tanto o *T. harzianum* selvagem (wt) quanto as linhagens geneticamente modificadas (aqpA e aqpC), apresentaram melhor atividade de biocontrole de *M. javanica* quando comparados ao grupo não tratado (Tab. 2).

Tabela 2. Avaliação dos tratamentos no controle do nematoide *M. javanica* em sementes da cultivar de feijoeiro comum.

Tratamentos	IG	IMO	MF	J2/ovos/10g de raiz	FR
NT	5	5	2,17 b	4281,6 a	2,484
wt	4	4	3,8 a	791,13 bc	0,95
wtQuit	3	4	4,21 a	1802,78 abc	1,839
wtRiz	3	5	2,91 ab	2555,24 ab	2,702
aqpA	3	3	4,87 a	751,15 c	1,379
aqpC	4	5	4,4 a	555,22 c	0,95
C1	4	5	3,62 a	48,27 d	0,06
C2	4	5	3,38 a	80,09 d	0,06

Índice de galhas (IG), Índice de massa de ovos (IMO), massa fresca de raiz (MF), Fator de reprodução (FR). Medianas seguidas de mesma letra minúscula na coluna não se diferem pelo teste de LSD ($p > 0,05$).

Ao avaliarmos a quantidade de fêmeas de *M. javanica* que penetraram as raízes das plantas e sua fertilidade, dadas pelo índice de galhas (IG) e índice de massa de ovos (IMO), foi observado que os tratamentos com as linhagens comerciais e a aqpC, apesar de apresentarem elevados números nesses índices, tiveram as menores médias J2/Ovos/10g de raiz. Neste sentido, estes tratamentos inibiram a fertilidade das fêmeas presentes nas raízes e/ou viabilidade dos ovos destas. Este fato não foi observado nos demais grupos tratados e controle (NT). Assim, a linhagem com expressão intermediária de aquaporina, aumentou a atividade de biocontrole em *T. harzianum*.

Os dados da massa fresca de raiz (MF) nos tratamentos demonstraram que os tratamentos contendo *T. harzianum* selvagem (wt), contendo quitina (wtQuit) e linhagens

geneticamente modificadas (aqpA e aqpC), produziram um volume maior de raiz quando comparado ao controle (NT). Assim, estes tratamentos interferem na produção de raiz pela planta após contato com o nematoide.

Ao avaliarmos o fator de reprodução (FR) de *M. javanica* em plantas de feijão, foi demonstrado que os tratamentos comerciais (C1 e C2), *T. harzianum* selvagem (wt) e a linhagem aqpC reduziram a reprodução deste patógeno nas plantas (Tab. 2). Assim, as linhagens de *T. harzianum* com as menores expressão de aquaporina interferem no ciclo reprodutivo do fitopatógeno.

Efeito das bioformulações na qualidade fisiológica das sementes

Na Tabela 3 estão apresentados os parâmetros do modelo de Peleg ajustados com R² acima de 0,99 e EMAP abaixo de 5,4%. É possível observar que o tratamento contendo *T. harzianum* selvagem (wt) proporcionou uma maior taxa de acúmulo de água nas sementes, seguidos dos tratamentos contendo linhagens geneticamente modificadas (aqpA e aqpC). As menores taxas de acúmulo de água foram observadas no tratamento contendo *T. harzianum* com indução de patógeno (wtRiz) e no tratamento comercial C2 (Tab. 3).

Tabela 03. Fórmulas e parâmetros de ajuste do modelo de Peleg para curva de embebição das sementes de *P. vulgaris* contendo 8 tratamentos.

Tratamentos	Fórmulas	R ²	EMAP
NT	$f(t) = t (0.242297 + 0.009115 t)^{-1}$	0,99	4,04
wt	$f(t) = t (0.195288 + 0.008751 t)^{-1}$	0,99	4,23
wtQuit	$f(t) = t (0.236212 + 0.009014 t)^{-1}$	0,99	5,4
wtRiz	$f(t) = t (0.287182 + 0.007941 t)^{-1}$	0,99	4,02
aqpA	$f(t) = t (0.213615 + 0.008772 t)^{-1}$	0,99	4,64
aqpC	$f(t) = t (0.234817 + 0.008752 t)^{-1}$	0,99	3,81
C1	$f(t) = t (0.255574 + 0.009352 t)^{-1}$	0,99	3,17
C2	$f(t) = t (0.286639 + 0.008163 t)^{-1}$	0,99	3,8

O tempo t é dado em horas e a umidade f (t) é dada em porcentagem.
EMAP: erro médio absoluto percentual.

Foi observado que a protusão radicular durante o processo de embebição ocorreu após o período de 30 horas em todos os tratamentos avaliados e controle (Fig 1).

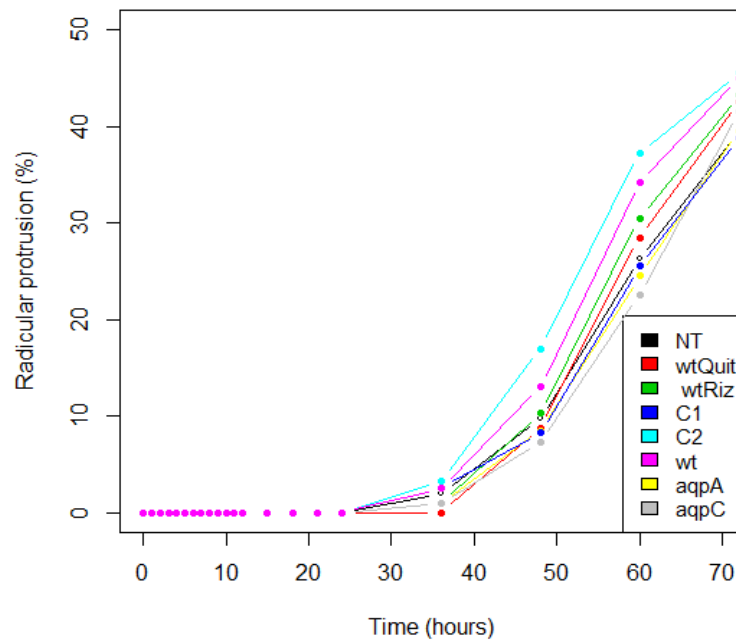


Figura 1. Avaliação da protusão radicular durante o processo de embebição das sementes.

Ao avaliarmos a curva de embebição de água pelas sementes durante a germinação, foi possível observar que os tratamentos com *T. harzianum* selvagem (wt) e as linhagens GM (aqpA e aqpC) apresentaram as maiores taxas absorção água em todos os tempos avaliados (Figura 2A e 2B). Já os tratamentos comerciais (C1 e C2) apresentaram as menores taxas de acúmulo de água quando comparados a todos os tratamentos e grupo controle em todos os tempos avaliados (Figura 2A e 2B).

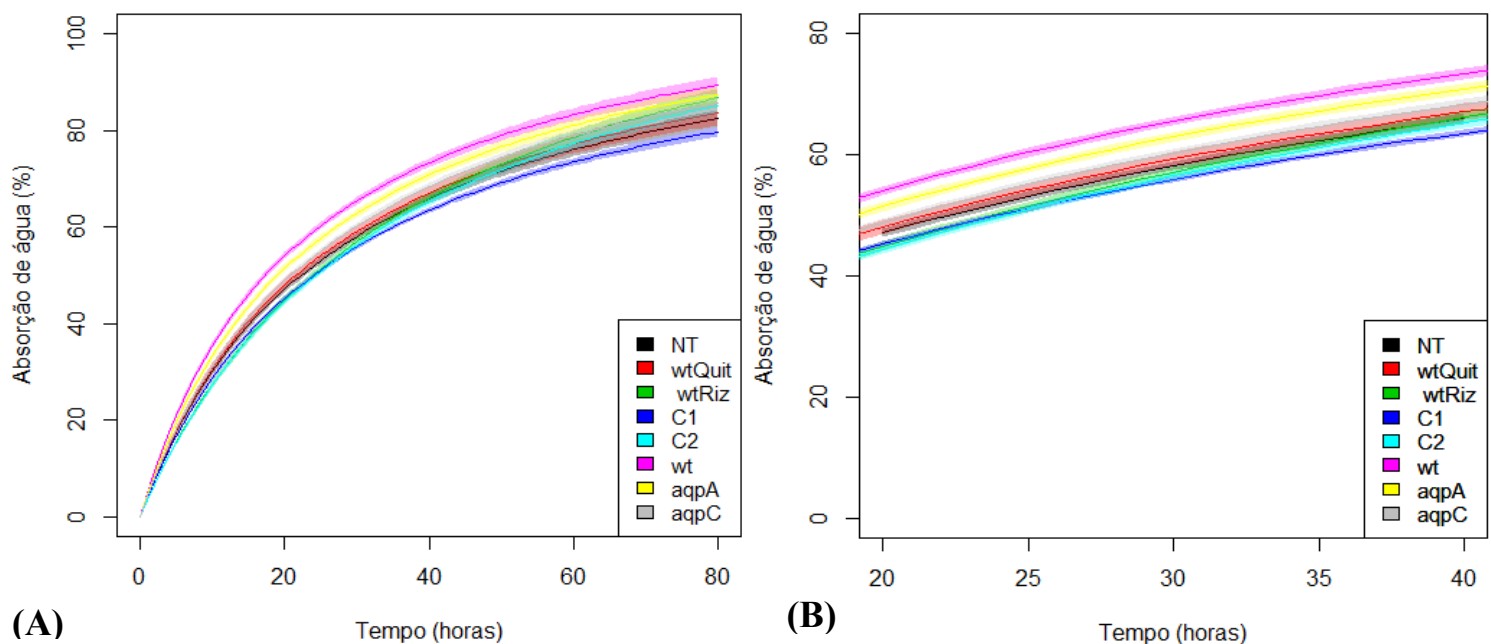


Figura 2 –Modelo ajustado de Peleg com bandas de 95% de confiança para as curvas de embebição das sementes de feijão tratadas com *T. harzianum*. (A) Curva de embebição

das sementes nos períodos de 20 a 80 horas. **(B)** Curva de embebição das sementes, com ênfase entre os períodos de 20 a 40 horas, para melhor visualização.

As avaliações dos tratamentos na qualidade fisiológica das sementes estão apresentadas na Figura 3. Foi observado que as variáveis fisiológicas relacionadas à raiz da planta apresentaram a maior distinção entre todos os parâmetros avaliados, sendo estes: comprimento do sistema radicular (CSR), massa fresca de raiz (MFR) e massa seca de raiz (MSR). Nestes, o tratamento comercial C1 apresentou os melhores índices para todas essas variáveis analisadas quando comparado aos demais tratamentos. E ainda, o tratamento com indução por patógeno (wtRiz) reduziu todos os índices de raiz, indicando que a presença de enzimas da parede de patógeno com *T. harzianum* causou prejuízo na germinação. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa quando comparados com o grupo controle com relação aos parâmetros de raiz da planta.

Com relação à variável comprimento de plântula da parte aérea (CPPA), os tratamentos do grupo GM (aqpA e aqpC) aumentaram este índice quando comparados com *T. harzianum* selvagem (wt).

Foi demonstrado que aos tratamentos contendo *T. harzianum* selvagem (wt) isolado e induzido por parede celular de *R. solani* (wtRiz) apresentaram os piores índices de comprimento de parte aérea (CPPA) como parâmetro fisiológico avaliado. E ainda, wtRiz reduziu o desempenho fisiológico das sementes em todos os parâmetros avaliados quando comparado ao grupo não tratado.

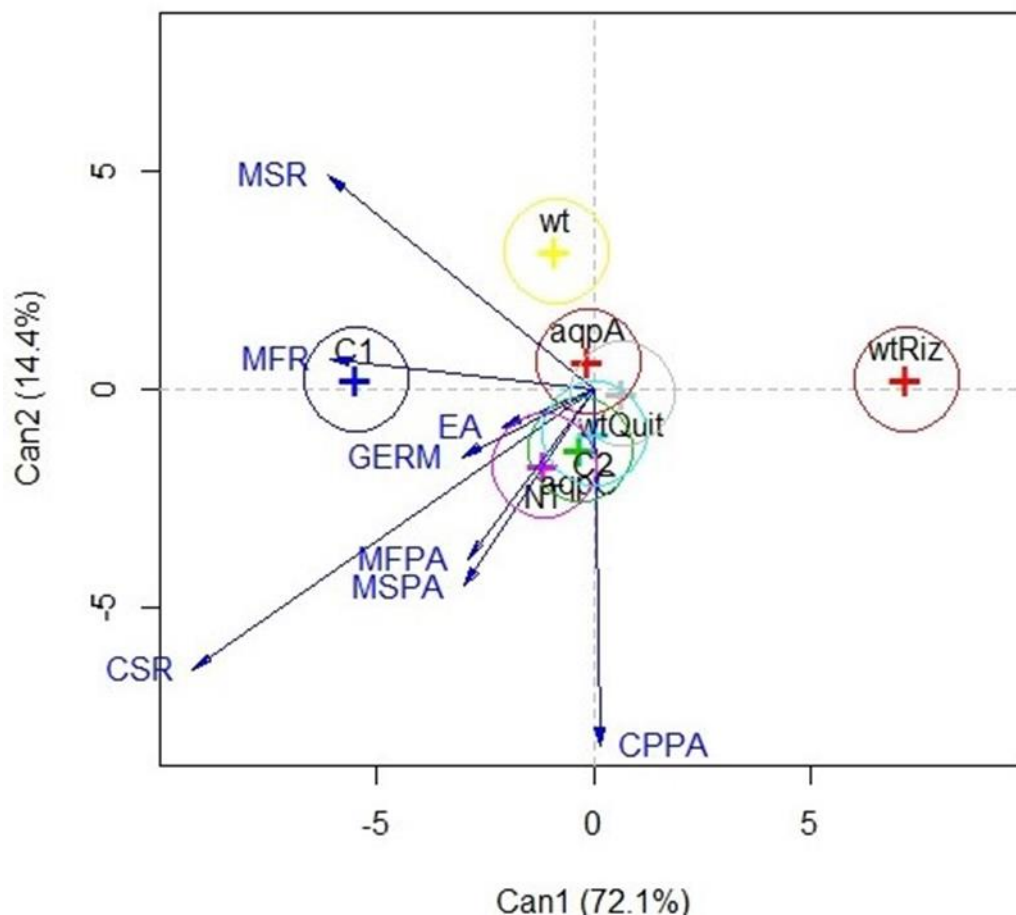


Figura 3 - Biplot contendo scores médios de 8 tratamentos, elipses de 95% de confiança com base em variáveis de vigor de sementes de feijão. Envelhecimento acelerado (EA), Massa fresca da parte aérea (MFPA), Massa seca da parte aérea (MSPA), Massa fresca da parte aérea (MFR), Massa seca da raiz (MSR), Germinação (GERM), Comprimento da parte aérea (CPA), Comprimento do sistema radicular (CSR).

Análise fisiológica e fitossanitária dos tratamentos

Foram identificados 12 gêneros de microrganismos nas sementes após os tratamentos, sendo estes: *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Curvularia* sp., *Pythium* sp., *Trichoderma* sp., *Cladosporium* sp., *Bacillus* sp., *Internsonilia* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp. (Fig.4).

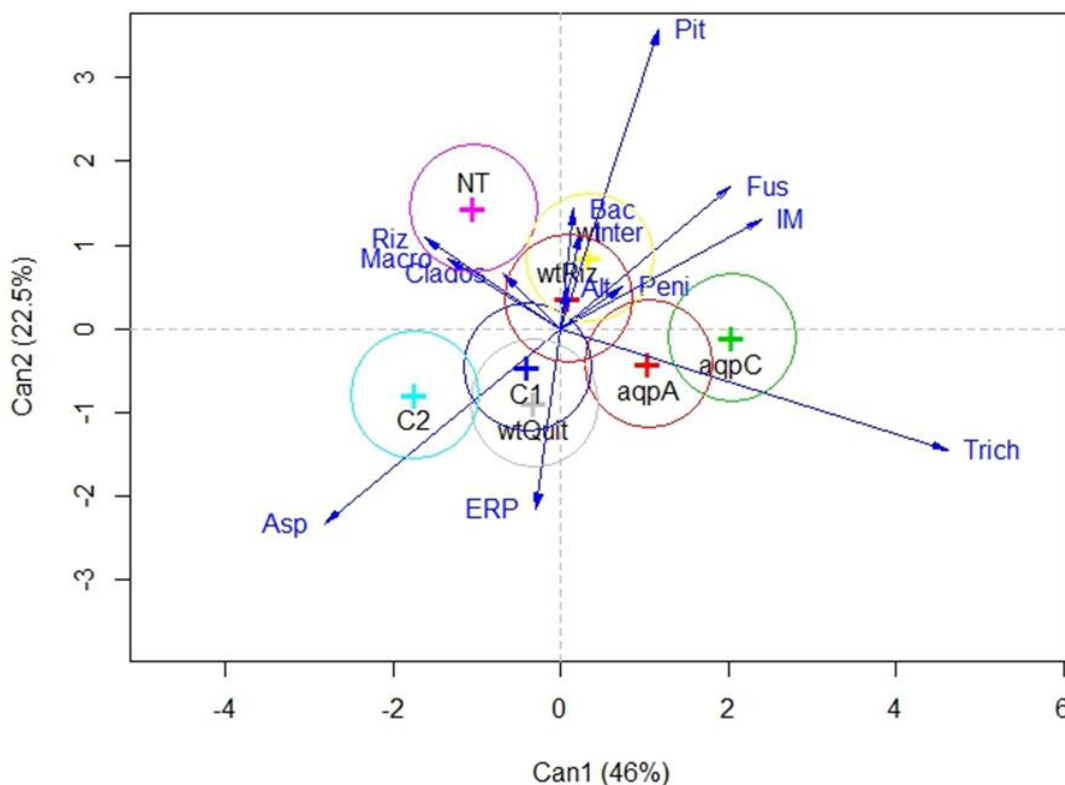


Figura 4 - Biplot contendo scores médios de 8 tratamentos, elipses de 95% de confiança com base em variáveis sanitárias em sementes de feijão. Incidência de microrganismos (IM), incidência de *Trichoderma* sp. (TRIC), incidência de *Fusarium* sp. (FUS), incidência de *Aspergillus* sp. (ASP), incidência de *Penicillium* sp. (PENI), incidência de *Curvularia* sp. (CURV), incidência de *Cladosporium* sp. (CLA), incidência de *Bacillus* sp. (BAC), incidência de *Internsonilia* sp. (INT), incidência de *Macrophomina* sp. (MACRO), de incidência de *Rhizoctonia* sp. (RHIZ), incidência de *Pythium* sp. (PIT), emissão de raiz primária (ERP) em sementes de feijoeiro comum.

Foi possível observar que as variáveis sanitárias que apresentaram maior efeito na distinção dos tratamentos foram a incidência de *Trichoderma* sp. (Trich), incidência de *Aspergillus* sp. (Asp), índice de microrganismos (IM) e incidência de *Fusarium* sp. (Fig. 4). As demais variáveis não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos.

Na avaliação do índice de microrganismos (IM), que detecta microrganismos patogênicos e não patogênicos, foi observado que as linhagens GM apresentaram uma quantidade total de microrganismos maior quando comparados aos demais tratamentos (Fig. 4). Porém foi observado que as linhagens GM tiveram maiores incidência do próprio

microrganismo de biocontrole (*Trichoderma sp.*) quando comparadas a todos os tratamentos e controle, o que sugere maior aderência nas sementes destas linhagens GM e, conseqüente, potencial para aplicação em bioformulações (Fig. 4).

Com relação a incidência de *Aspergillus sp.*, que é um importante fungo de armazenamento em sementes e micotoxigênico, foi observado que os tratamentos com as linhagens comerciais (C1 e C2) e com a linhagem com indução por quitina (wtQuit) apresentaram uma maior incidência deste fungo (Fig. 4). Já os tratamentos GM (aqpA e aqpC) tiveram uma menor incidência quando comparados aos demais tratamentos.

Assim, foi demonstrado que a incidência de *Trichoderma sp.* teve uma correlação negativa com a incidência de *Aspergillus sp.*, ou seja, a medida que aumenta a incidência de *Trichoderma sp.* nas sementes ocorre redução da incidência de *Aspergillus sp.* (Fig. 4). Sugere-se o antagonismo destas linhagens de *Trichoderma sp.* com o fungo micotoxigênico.

Na análise da incidência de *Fusarium sp.*, importante patógeno de sementes e na cultura do feijoeiro, foi observado que nenhum dos tratamentos foi capaz de reduzir a incidência deste fitopatógeno na dosagem utilizada (Fig. 4).

DISCUSSÃO

O uso de microrganismos que atuam no controle das doenças e pragas de plantas vem sendo priorizado na agricultura moderna como alternativa ao tratamento químico (NICOLAS et al., 2014). Com isso, fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* correspondem a 90% das bioformulações utilizadas em campo para o controle de doenças de origem fúngicas, bacteriana e nematoides (YOUSSEF; TARTOURA; ABDELRAOUF, 2016; SARAVANAKUMAR et al., 2016). Estes microrganismos de controle biológico possuem como características o crescimento rápido e um grande potencial de adaptação a diversas condições ecológicas (HAN et al., 2016; MARTINEZ et al., 2008).

Estudos demonstram que as espécies de *Trichoderma* possuem capacidade antagonista que combina diferentes mecanismos de ação, tais como: micoparasitismo; antibiose; competição por nutrientes; produção de metabolitos antimicrobianos e fungistáticos, além da indução de defesa nas plantas (LORITO et al., 2010; MONTEIRO et al., 2010; ZEILINGER et al., 2016). Estas características fazem com que os fungos deste gênero sejam excelentes agentes antagonistas com capacidade de competir, colonizar e proteger as plantas hospedeiras contra os ataques de doenças e pragas.

Com a finalidade de selecionar linhagens de *Trichoderma* com maior capacidade de biocontrole as ferramentas moleculares têm proporcionado inovações para o estudo e identificação de genes de *Trichoderma* sp. com potencial biotecnológico para a produção de biofungicidas, bem como, para o melhoramento genético de plantas (LORITO et al., 2010; MONTERO-BARRIENTOS et al., 2010; NICOLAS et al., 2014). Previamente, foi demonstrado que plantas de *Phaseolus vulgaris* tratadas com linhagens de *Trichoderma harzianum* geneticamente modificadas para a superexpressão de uma aquaporina apresentaram melhoras em parâmetros fisiológicos como desenvolvimento de raiz (VIEIRA et al., 2018). Além disso, estas linhagens aumentaram a capacidade antagonista de *Fusarium oxysporum*. E ainda, a expressão heteróloga dessa aquaporina de *T. harzianum* em plantas de *Nicotiana tabacum* aumentou a tolerância a estresse hídrico, condutividade hidráulica, taxa fotossintética e desenvolvimento radicular das plantas (VIEIRA et al., 2017). Nesse trabalho, sementes de *P. vulgaris* (feijão comum) foram tratadas com linhagens de *T. harzianum* geneticamente modificadas para superexpressão de aquaporina e avaliadas quanto a capacidade de germinação e controle de doenças fúngicas em sementes, além do controle biológico de *Meloidogyne javanica*

nas plantas.

As aquaporinas são proteínas integrais de membrana que pertence a família MIP (Major intrinsic proteins) e possuem o importante papel de transporte de água e de uma variedade de solutos de baixo peso molecular entre as membranas, dentre estes: H₂O₂, glicerol e polióis lineares (AMIRA et al., 2018; BIERNET et al., 2008; MAUREL et al., 2016). De fato, estudos demonstram que as aquaporinas são essenciais na troca de água associada a osmoregulação em microrganismos e, em plantas, estão associadas à transpiração, crescimento e tolerância a estresses (CALAMITA et al., 1998; HERNANDEZ-CASTRO et al., 2003; MEYRIAL et al., 2001; VIEIRA et al., 2018; WYSOCKI et al., 2001). Por isso, as aquaporinas representam uma ferramenta valiosa para a biotecnologia como gene de triagem de organismos resistentes as adversidades ambientais, bem como, na produção biotecnológica e seleção de plantas tolerantes à seca (AMIRA et al., 2018).

As bioformulações contendo o agente de controle biológico *Trichoderma* sp. são amplamente utilizadas devido a eficácia contra diversos fitopatógenos presentes no solo, incluindo fungos e nematóides (FRACETO et al., 2018; KIRIGA et al., 2018; SAHEBANI & HADAVI., 2008; SHARON et al., 2001; SZABÓ et al., 2012). Sabe-se que *Trichoderma* sp. é altamente competitivo em ambientes de raiz e solo, com mecanismos antagônicos que inclui a produção de metabólitos, competição por espaço e nutrientes, além da produção de enzimas líticas (glucanases, quitinases, proteases e lipases) que degradam componentes da parede celular dos fitopatógenos (SHARON et al., 2001; VINALE et al., 2008). Os mecanismos de ação de *Trichoderma* sp. para o controle biológico de fitonematóides incluem a atividades de quitinases e proteases para o parasitismo direto dos ovos e larvas, além da indução de mecanismos de defesa da planta hospedeira, levando à resistência sistêmica (SHARON et al., 2001). Foi demonstrado em nosso trabalho que, assim como as linhagens comerciais, tanto *T. harzianum* selvagem quanto as linhagens GM foram capazes de reduzir o número de nematóides nas raízes das plantas de feijão e a sua reprodução. Este fato não foi observado nas sementes não tratadas ou nos tratamentos com indução de enzimas líticas em *T. harzianum* selvagem. Assim, a superexpressão de um gene responsável pelo aporte de água não interferiu na capacidade de controle biológico de *Meloidogyne javanica*. Portanto, a superexpressão do gene aquaporina não causou interferência nas enzimas/rotas metabólicas que podem estar associadas ao controle de nematóides ou de indução de resistência no vegetal.

Sabe-se que as relações simbióticas das raízes das plantas com microrganismos, incluindo o *Trichoderma* sp., produz sinais capazes de ativar as vias relacionadas ao desenvolvimento do vegetal e aumento da condutividade hidráulica nas raízes (BROTMAN et al., 2013; SINGH et al., 2016; QIN et al., 2016). De fato, estudos demonstraram que isolados de *T. harzianum* promoveram o crescimento da parte aérea do feijoeiro a partir da microbiolização das sementes (CARVALHO et al., 2011). Nesse contexto de simbiose, as raízes têm papel de extrema importância devido às atividades de absorção e transporte de água do solo para o vegetal (BERRACHED et al., 2017; SCHENK & JACKSON, 2002). Inclusive, já foi sugerido que a simbiose com microrganismos induz alta expressão de aquaporina nas plantas e proporciona um aumento da condutividade hidráulica (LEHTO & ZWIAZEK., 2011; XU et al., 2013). Além disso, plantas de feijão inoculadas com linhagens de *T. harzianum* superexpressando aquaporina apresentaram melhores parâmetros biométricos como resultado de uma maior transferência de água do solo para as raízes através do fungo GM (VIEIRA et al., 2018). Por isso, as aquaporinas desempenham um importante papel na transferência de água do solo para a planta através das células fúngicas. Em nosso trabalho, sementes de *P. vulgaris* tratadas com *T. harzianum* selvagem WT e GM apresentaram maior aporte de água durante o processo de germinação quando comparadas aos demais tratamentos. E, sementes tratadas com as linhagens GM, mantiveram os parâmetros fisiológicos de germinação e vigor quando comparadas ao fungo selvagem.

Na análise fitossanitária após os tratamentos foi observado que as linhagens GM apresentaram maior aderência nas sementes de feijão quando comparadas a todos os tratamentos, e sabe-se que uma distribuição uniforme e uma maior aderência das formulações nas sementes são indispensáveis para a eficácia de um bioproduto (CHIURAISE et al., 2015). Além disso, maior biocontrole de *Aspergillus* sp. foi observado nessas sementes, indicando que as linhagens GM apresentaram melhor antagonismo para este fungo micotoxigênico. Agüero et al., (2008) relataram a antibiose como o principal mecanismo de ação de *T. harzianum* para o controle de *Aspergillus flavus* em sementes de milho, sendo que os metabólitos voláteis produzidos pelo agente de biocontrole são responsáveis por reduzir a biomassa do fitopatógeno.

CONCLUSÃO

Sementes tratadas com linhagens de *T. harzianum* superexpressando o gene de aquaporina apresentaram atividade de controle biológico do nematoide *Meloidogyne javanica*. Além disso, interferiram na absorção de água durante a germinação das sementes, aderência nas sementes e atividade de biocontrole de *Aspergillus* sp.

REFERÊNCIAS

- AGUERO, L. E. M. et al. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin b1 production in stored maize grains exposed to volatile compounds of *Trichoderma harzianum* Rifai. **Interciência** 33:219-222, 2008.
- AMIRA, M. B. et al. MIP diversity from *Trichoderma*: Structural considerations and transcriptional modulation during mycoparasitic association with *Fusarium solani* olive trees. **PLoS ONE** 13 (3), 2018.
- BAIDA, F. C. et al. Reação de linhagens de feijão-vagem ao *Meloidogyne javanica* e *M. paranaensis* em casa-de-vegetação. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 2, p.237-241, 2011.
- BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/DAS/ACS, 2009. 395p.
- BIENERT, G. P. et al. A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)₃ and Sb(OH)₃ across membranes. **Bmc Biology**, v. 6, n. 1, p.6-26, 2008.
- BROTMAN, Y. et al. *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. **PLOS Pathogens**, 9(4), 2008.
- CALAMITA, G. et al. Regulation of the *Escherichia coli* water channel gene aqpZ. **Proc Natl Acad Sci EUAA** 95, 3627–31. 1998.
- CÂNDIDA, V. D. et al. Controle genético da murcha do Fusário (*Fusarium oxysporum*) em feijoeiro comum. **Tropical Plant Pathology**, vol. 34, 6, 379-384, 2009.
- CARVALHO, D. D. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p.28-34, 2011.
- CHIURASE, N.; YOBO, K. S.; LAING, M. D. Seed Treatment with *Trichoderma Harzianum* Strain kd Formulation Reduced Aflatoxin Contamination in Groundnuts. **Journal Of Plant Diseases And Protection**, v. 122, n. 2, p.74-80, 2015.
- COOLEN, W. A.; D'HERDE, C. J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue. **Ghent, State Nematology and Entomology Research Station**, 77p. 1972.
- CORRÊA, B. O. et al. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. & Magn. **Revista Brasileira de Sementes** 30:156-163, 2008.
- FERRAZ, L. C. C. B. Problemas nematológicos na cultura do feijão irrigado. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Feijão irrigado: tecnologia & produção**. ESALQ/USP/LVP, p. 63-72, 2005.

FRACETO, L. F et al. *Trichoderma harzianum*-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, p.1-8, 2018.

HAN, P. et al. Identification and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from 'Baozhu' pear (*Pyrus ussuriensis* Maxim.). *Food Chemistry*, v. 196, n. 3, p. 808–814, 2016.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 1, p.43-56, 2004.

HARTMAN, K. M.; SASSER, J. N. Identification of *Meloidogyne* species on the basis of differential host test and perineal pattern morphology. In: CARTER, C. C.; SASSER, J. N. (Ed.). *An advanced treatise on Meloidogyne*. v. 2, **Methodology Raleigh**: North Carolina State University Graphics, p. 69-77. 1985.

HERNANDEZ-CASTRO, R. The aquaporin gene *aqpX* of *Brucella abortus* is induced in hyperosmotic conditions. **Microbiology**, v. 149, n. 11, p.3185-3192, 1 nov. 2003.

KIRIGA, A. W. et al. Effect of *Trichoderma* spp. and *Purpureocillium lilacinum* on *Meloidogyne javanica* in commercial pineapple production in Kenya. **Biological Control**, v. 119, p.27-32, 2018.

LEHTO, T.; ZWIAZEK, J. J. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 2, p.71-90, 8 dez. 2010.

LORITO, M. et al. Translational Research on *Trichoderma*: From 'Omics to the Field. **Annual Review Of Phytopathology**, v. 48, n. 1, p.395-417, jul. 2010.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: Funep, p.133-149, 1994.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology** v. 26, p. 553–560, 2008.

MASTOURI, F. et al. Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* Alleviates Biotic, Abiotic, and Physiological Stresses in Germinating Seeds and Seedlings. **Phytopathology**, v. 100, n. 11, p.1213-1221, 2010.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; RODRIGUES, O. *Aquaporins* and plant transpiration. **Plant, Cell & Environment**, v. 39, n. 11, p.2580-2587, 2016.

MEYRIAL, V. et al. Existence of a tightly regulated water channel in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.** 268, 334–43, 2001.

MONTEIRO, V. N. et al. New insights in *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens by secreted protein analysis. **Current microbiology**, v. 61, n. 4, p. 298–

305, 2010.

MONTERO-BARRIENTOS, M. et al. Transgenic expression of the *Trichoderma harzianum* hsp70 gene increases Arabidopsis resistance to heat and other abiotic stresses. **Journal Of Plant Physiology**, v. 167, n. 8, p.659-665, 2010.

NICOLÁS, C. et al. Trichoderma genes in plants for stress tolerance status and prospects. **Plant Science**, v. 228, p.71-78, 2014.

PANDEY, V. et al. Dose-dependent response of *Trichoderma harzianum* in improving drought tolerance in rice genotypes. **Planta**, v. 243, n. 5, p.1251-1264, 2016.

PEDRO, E. A. S. et al. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 11, p.1589-1595, 2012.

PELEG, M. An Empirical Model for the Description of Moisture Sorption Curves. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 4, p. 1216 – 1919, 1988.

PILL, W. G. et al. Responses of non-primed or primed seeds of ‘Marketmore 76’ cucumber (*Cucumis sativus* L.) slurry coated with *Trichoderma* species to planting in growth media infested with *Pythium aphanidermatum*. **Scientia Horticulturae**, v. 121, n. 1, p.54-62, 2009.

POSSE, S. C. et al. Informações técnicas para feijoeiro-comum na região central brasileira: 2009-2011. **Incaper**, 245 p. (Incaper Documentos, 191), 2010.

R Core Team (2017). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. Acesso em: 20 de dezembro, 2017.

QIN, Y. et al. Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p.1245-1259, 2016.

SAHEBANI, N., HADAVI, N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biol. Biochem.** 40, 2016– 2020, 2008.

SARAVANAKUMAR, K. et al. Synergistic effect of Trichoderma-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum. **Biological Control**, v. 94, n. 2, p. 37–46, 2016.

SCHENK, H. J.; JACKSON, R. B. THE GLOBAL BIOGEOGRAPHY OF ROOTS. **Ecological Monographs**, v. 72, n. 3, p.311-328, 2002.

SHARON, E. et al. Biological Control of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p.687-693, 2001.

SILVA, G. C. et al. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina Ciências Agrárias** (Londrina).

29:29-34, 2008.

SINGH, S. P.; SCHWARTZ, H. F. Breeding Common Bean for Resistance to Diseases: A Review. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p.2199-2223, 2010.

SINGH, V. et al. *Trichoderma asperellum* spore dose depended modulation of plant growth in vegetable crops. **Microbiological Research**, v. 193, p.74-86, 2016.

SOUZA, J. V. R. S. et al. No-till and direct seeding agriculture in irrigated bean: Effect of incorporating crop residues on soil water availability and retention, and yield. **Agricultural Water Management**, v. 170, p.158-166, 2016.

SZABÓ, M. et al. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: The role of chi18-5 and chi18-12 genes in nematode egg-parasitism. **Biological Control**, v. 63, n. 2, p.121-128, 2012.

WYSOCKI, R. et al. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 6, p.1391-1401, 2001.

TAYLOR, A. L.; SASSER, J. N. Biology, identification and control of root-knot nematodes. Internacional Meloidogyne Project. **North Carolina: State University**, 111p. 1978.

TOURNAS, V. H.; KATSLOUDAS, E. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 105, n. 1, p.11-17, 2005.

VIEIRA, P. M. et al. Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. **Bmc Genomics**, v. 14, n. 1, p.177-189, 2013.

VIEIRA, P. M. et al. Overexpression of an aquaglyceroporin gene from *Trichoderma harzianum* improves water-use efficiency and drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. **Plant Physiology And Biochemistry**, v. 121, p.38-47, 2017.

VINALE, F. et al. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. **Soil Biology And Biochemistry**, v. 40, n. 1, p.1-10, 2008.

XU, H, COOKE, J. E. K, ZWIAZEK, J. J. Phylogenetic analysis of fungal aquaporins provides insight into their possible role in water transport of mycorrhizal associations. **Botany** 91: 495–504, 2013.

XUE, A. G. et al. Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat. **Crop Protection**, v. 96, p.97-102, 2017.

WOO, S. L. et al. *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. **The Open Mycology Journal**, 8, (Suppl-1, M4) 71-126, 2014.

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.

ZEILINGER, S. et al. Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p.74-90, 2016.

APÊNDICES



Figura 05 - Aspectos morfológicos de sementes de feijão submetidos aos diferentes tratamentos infestadas com diferentes gêneros de fungos. **A.** Aspecto da germabilidade de colonização microbiana sobre sementes do tratamento testemunha, **B.** Micélio denso, acinzentado, cotonoso abundante de *Cladosporium* sp. **C.** Micélio irregular, branco com incrustações picnidiais e negrecidas de *Macrophomina* faseolina. **D.** Micélio não denso, flocoso de coloração esverdeada proliferando na semente e no papel de filtro de *Trichoderma*. **E.** Esporângios globosos escuros depositados no papel de filtro circundante a semente de *Rhizopus* sp., **F.** Puverulência amarelada de *Aspergillus* sp., **G.** Puverulência de coloração verde musgo do gênero *Aspergillus* sp., **H.** Micélio denso, abundante, cotonoso de coloração branca de *Fusarium* sp.