



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL

SUYÁ SAMARA MOREIRA

**ASPECTOS DO DESENVOLVIMENTO EM FEIJÃO -
COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) INOCULADOS COM
Trichoderma spp.**

GOIÂNIA

2014

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Suyá Samara Moreira		
E-mail:	Su.smh2@gmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página? <input type="checkbox"/> Sim <input checked="" type="checkbox"/> Não			
Vínculo empregatício do autor			
Agência de fomento:		Sigla:	
País:	UF:	CNPJ:	
Título:	ASPECTOS DO DESENVOLVIMENTO EM FEIJÃO -COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) INOCULADOS COM <i>Trichoderma</i> spp.		
Palavras-chave: <i>Trichoderma</i> ; Feijoeiro; Folha; Raiz; Indutor de crescimento			
Título em outra língua:	ASPECTS OF DEVELOPMENT IN-COMMON BEAN (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) inoculated with <i>Trichoderma</i> spp.		
Palavras-chave em outra língua: <i>Trichoderma</i> ; Bean; Leaf; Root; Growth inducer			
Área de concentração:	Botânica		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	31/03/2014		
Programa de Pós-Graduação:	Biodiversidade Vegetal		
Orientador (a):	Cirano Ulhoa		
E-mail:	Ulho@ufg.com		
Co-orientador (a):*	Maria Helena Rezende		
E-mail:			

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: ____ / ____ / ____

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE VEGETAL

**ASPECTOS DO DESENVOLVIMENTO EM FEIJÃO -
COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) INOCULADOS COM
Trichoderma spp.**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biodiversidade Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás por Suyá Samara Moreira para obtenção do grau de mestre em Biodiversidade vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa.
Co-Orientador: Prof. Dr^a. Maria Helena Rezende.

GOIÂNIA

2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
CPT/BC/UFG**

M838i Moreira, Suyá Samara.
Aspectos do desenvolvimento em feijão comum
(*Phaseolus vulgaris* L.) inoculados com *Trichoderma* spp.
[manuscrito] / Suyá Samara Moreira. - 2014.
82 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Cirano José Ulhoa; Co-orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Rezende.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Ciências Biológicas, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, siglas e tabelas.

1. *Trichoderma* spp. – Promotor de crescimento
2. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) I. Título.

CDU: 635.35:582.28

BANCA EXAMINADORA

Titulares:

Prof. Dr. Cirano José Ulhoa (Orientador) – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Tomás de Aquino Portes – Instituto de Ciências Biológicas / Universidade Federal de Goiás.

Dr. Murilo Lobo Junior – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) / Arroz e Feijão.

Suplente:

Prof. Dr^a. Valdirene Neves Monteiro - Universidade Estadual de Goiás / UNUCET

“Julgue seu sucesso pelas coisas que você teve que renunciar para conseguir.”

Dalai Lama

“Sendo motivado pela compaixão e amor, respeitando os direitos dos outro. Essa é a verdadeira prática da religião.”

Dalai Lama

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todos aqueles que me incentivaram e auxiliaram durante esta longa e árdua jornada.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora Aparecida por terem atendido às minhas preces e por terem me guiado nos momentos mais difíceis dessa jornada.

Ao Prof. Dr. Cirano José Ulhoa por ter me aceitado como orientanda, pela paciência nas minhas muitas horas de desespero, pelas longas conversas que me acalmavam e por não ter desistido de mim e nem do meu trabalho.

A Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Rezende que sempre me deu auxílio, especialmente quando eu mais precisei, e como eu precisei...

Ao Dr. Murilo Lobo Júnior pela dedicação e auxílio durante minha pesquisa, sendo essencial para o desenvolvimento do meu trabalho na Embrapa.

A todos os funcionários da Embrapa Arroz e Feijão por terem me socorrido nas horas que mais precisei, em especial ao Márcio e ao Elder por me receberem tão bem e por ter me orientado tão bem.

Aos membros do laboratório de Enzimologia que sempre que possível, me auxiliavam.

À minha mãe pela bravura, por ter se tornado uma guerreira que tanto amo e admiro.

Ao meu pai, que mesmo em tempos difíceis, me dedicou tanto amor.

Ao meu irmão Harlyton por ter me protegido em todas as dificuldades que passei.

A minha amiga irmã Lígia Flores Soares pelo seu amor ao computador e pela paciência por me auxiliar na revisão e formatação, fato que me estressa muito, durante madrugadas a fio.

A minha amada prima Tatiane que colocou toda sua arte profissional para me ajudar na hora em que a coisa “ficou feia”.

Ao “tio” João que sempre me apoiou durante todos esses anos, nos momentos alegres e nos difíceis tal qual um pai.

A minha família amada pelo apoio, conselhos, “grude” e “intromissão”, mas tudo baseado no amor que sentem por mim, por mais complicado que ele possa parecer.

A todos vocês o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE SIGLAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Aspectos gerais do <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	17
2.2 Fungos do gênero <i>Trichoderma</i>	22
2.3 <i>Trichoderma</i> spp. e o controle biológico	24
2.4 Tolerância a estresses abióticos	29
2.5 Promoção do crescimento em plantas influenciado por <i>Trichoderma</i> spp.	31
3. JUSTIFICATIVA	34
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo geral	35
4.2 Objetivos específicos	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Local de condução do experimento	35
5.2 Obtenção do inóculo	35
5.3 Sementes	36
5.4 Produção das plantas em casa de vegetação	37
5.5 Obtenção e armazenamento das amostras	38
5.6 Análises morfoanatômicas	38
5.6.1 Área foliar	38
5.6.2 Sistema radicular	38
5.6.3 Massa seca	39
5.6.4 Aspectos anatômicos da lâmina foliolar e raiz	39
5.7 Análise estatística	41
6. RESULTADOS	42
6.1 Análises de crescimento (aspectos morfológicos)	42
7. DISCUSSÃO	52

8. CONCLUSÃO	58
9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
10. REFERÊNCIAS	59
11. ANEXOS	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa seca das plantas (g) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tratamentos.....	42
Tabela 2 - Volume da raiz (cm ³) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tipos de tratamentos.....	43
Tabela 3 - Comprimento da raiz (cm) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tipos de tratamentos.....	44
Tabela 4 - Área foliar (cm) de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tipos de tratamentos.....	45
Tabela 5 - Espessura da epiderme adaxial (µm) em secção transversal da lâmina foliolar de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tratamentos.....	45
Tabela 6 - Espessura da epiderme abaxial (µm) em secção transversal da lâmina foliolar de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tratamentos.....	46
Tabela 7 - Espessura do mesofilo (µm) em secção transversal da lâmina foliolar de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tratamentos.	46
Tabela 8 - Matriz de correlação simples entre os parâmetros analisados no total dos estágios observados	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Feijoeiro comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	18
Figura 2 – Alguns estágios de desenvolvimento de <i>Phaseolus vulgaris</i> L.....	19
Figura 3 – Placa de Agar Batata Dextrose (BDA) do <i>Trichoderma T. harzianum</i> T22.....	22
Figura 4 – <i>Trichoderma harzianum</i> . (A) Ramificação do conidióforo mostrando fiálides bastante ampuliformes (ALL25). (B) Terminação apical do conidióforo jovem, ainda relativamente estéril (UnB-1650). (C) Porção do conidióforo com fiálides mais lageniformes (ALL52). Bar = 10 µm. (D) Idem a figura 2A, porém com maior aumento. (E) Conidióforo com fiálides alongadas, tendendo a lageniforme (ALL49). (F) Ramificação lateral do conidióforo mostrando fiálides ampuliformes (ALL50). (G) e (H) Conídios subglobosos (ALL22). (I) Conídios a elevada magnificação (MEV) mostrando a superfície lisa e porção basal truncada (ALL25). (J) Idem a figura 2I, porém com maior aumento.....	23
Figura 5 – MEV da ação micoparasítica de <i>T. harzianum</i> sobre <i>R. solani</i> . A, B, C e D correspondem a interação entre os isolados de <i>T. harzianum</i> ALL23, ALL40, ALL41 e ALL44 e o isolado de <i>R. solani</i> CNPAF-03, respectivamente.....	25
Figura 6 – Grãos de arroz com esporos de <i>Trichoderma harzianum</i>	36
Figura 7 – Mudanças de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedade pérola plantadas em torres de PVC.....	37
Figura 8 – Leitura da raiz do <i>Phaseolus vulgaris</i> L. pelo software WinRHIZO Pro 2007.....	39
Figura 9 – Corte transversal da lâmina foliolar de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. variedade Pérola.....	40
Figura 10 - Raiz do <i>Phaseolus vulgaris</i> L variedade Pérola.	41
Figura 11 - A-B. Raiz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tratamentos - estágio R5.....	43
Figura 12 - C-D. Raiz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. em relação aos tratamentos - estágio R5.....	44
Figura 13 - A- D. Secções transversais da região mediana do folíolo central de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio V2.....	47
Figura 14 - A-D Secções transversais da região mediana do folíolo central de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio V4.....	48
Figura 15 - A-D. Secções transversais da região mediana do folíolo central de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio R7.....	49
Figura 16 - A-D. Secções transversais da região de ramificação da raiz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio V4.....	50
Figura 17 - A-D. Secções transversais da região de ramificação da raiz de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio R5.....	51

LISTA DE SIGLAS

AIA - Ácido indolacético

AS - Ácido salicílico

ATP - Adenosina trifosfato

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

Embrapa - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EMSE - Expressão de marcadores de sequências expressas

FAA 50 - Formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%

ICB - Instituto de Ciência Biológicas

ISR - Resposta sistêmica induzida

MAMPs - *Microbe-associated molecular pattern*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento

RESUMO

Fungos do gênero *Trichoderma* spp. são utilizados como agentes de controle biológico e indutores de crescimento em plantas. A sua ação é baseada em mecanismos como a produção de metabólitos secundários, competição por espaço e nutrientes, produção de enzimas hidrolíticas e metabólitos análogos a fitormônios. Entretanto, poucos estudos foram realizados sobre os aspectos morfológicos e anatômicos da interação entre *Trichoderma* spp. e plantas. Este trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da inoculação de dois isolados de *Trichoderma harzianum* (ALL42 e T22) e um *Trichoderma asperellum* (T34) em aspectos morfológicos e anatômicos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Foram analisados variáveis como comprimento da raiz, volume da raiz, massa seca e área foliar, e anatômicos como análise quantitativa da espessura do mesofilo e da epiderme da folha nos estágios V2, V4, R5, R7 e R8, e mudanças nas características estruturais da raiz nos estágios V2, V4 e R5. Os tratamentos realizados foram com sementes sem inoculação do *Trichoderma* spp. (controle) e sementes tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. T 22, ALL42 e T34 com três repetições cada, somando doze tratamentos por estágio analisado. A análise estatística ocorreu pela análise de variância ANOVA e teste de separação das médias. Os dados mostram que ocorreram alterações na biomassa da planta seca, área foliar, comprimento e volume da raiz na maioria dos estágios analisados. Entretanto, em relação à espessura do mesofilo foram encontradas diferenças significativas apenas nos estágios V4 e R7. Foi observado que as plantas tratadas com *Trichoderma* spp. apresentaram um maior crescimento secundário do cilindro vascular das raízes, principalmente no estágio V4. Foi observado no estágio R5 um maior desenvolvimento do xilema secundário no cilindro vascular das raízes, quando tratado com *Trichoderma* spp.. Estes dados mostram que a presença do fungo acelera o desenvolvimento de raízes em *P. vulgaris*. Dentre os parâmetros analisados, os isolados de *T. harzianum* (ALL42 e T22) foram os que apresentaram uma maior diferença quando comparados com o controle.

Palavras-chave: *Trichoderma*; Feijoeiro; Folha; Raiz; Indutor de crescimento.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Trichoderma* spp. can be used as biological control agents and also as inducer of growth in different plants. Its action is based on different mechanisms such as the production of secondary metabolites, competition for space and nutrients, production of hydrolytic enzymes and signaling molecules. However, only a few works were made about morphological and anatomical aspects of the interaction between *Trichoderma* spp. and plants. This project aims to watch and determine the effects of inoculation of *Trichoderma harzianum* (ALL42 and T22) and *Trichoderma asperellum* (T34) strains in morphological and anatomical aspects of the bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Morphological parameters as size of the root, root volume, dry mass and leaf area were analyzed, and some anatomical parameters like quantitative analysis of mesophyle thickness leaf epidermis in stages V2, V4, R5, R7 and R8, and the alteration of the structural characteristics of the root in stages V2, V4 and R5. The treatments were performed in seeds free from inoculation with *Trichoderma* spp. (control) and seeds treated with *Trichoderma* spp. T 22, ALL42 and T34 with three replicates each, totaling twelve treatments for stage analyzed. Statistical analysis was performed by ANOVA analysis of variance and separation of means test. The obtained data suggest that changes occurred in the biomass of the dried plant, leaf area, length and volume of the root in most of the analyzed stages. However, in thickness of mesophyle analyse, significant differences was found only in stages V4 and R7. It was observed that the treated samples showed a greater *Trichoderma* spp. secondary cylinder vascular growth of roots, mainly in V4 stage. Was observed in R5 stage a further development of secondary xylem in the vascular cylinder of roots when treated with *Trichoderma* spp.. These data suggest that the fungus accelerates the development in *P. vulgaris* L. roots. Among the parameters analyzed, isolates of *T. harzianum* (ALL42 and T22) was those who shows a bigger difference when compared with the control.

Keyword: *Trichoderma*; Bean; Leaf; Root; Growth inducer

1. INTRODUÇÃO

O cultura do feijão é uma das mais importantes para os agricultores da América Latina, porem sujeito a sofrer perdas significativas devido a patógenos presentes no solo. No Brasil, o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos produtos agrícolas de maior importância socioeconômica, principalmente, pelo fato de ser uma das fontes primordiais de proteína e energia na alimentação da maior parte da população (OLIVEIRA, 2005). A cultura dessa leguminosa é consideravelmente diversa e é conhecida como cultura de subsistência em áreas pequenas com uso mínimo de insumos (BORÉM e CARNEIRO, 2006).

O aumento da produção agrícola promoveram um aumento no uso de agroquímicos, causando problemas ambientais significativos (CALHEIROS, OLIVEIRA e DOLORES, 2006). O uso destes produtos pode causar contaminação do solo, rios, alimentos, animais, intoxicação de agricultores e induzir a resistência de patógenos. Estes fatos podem promover um desequilíbrio biológico através da alteração da reciclagem de nutrientes e matéria orgânica, da eliminação de organismos benéficos ao meio e levando à redução da biodiversidade e consequente desequilíbrio de todo ecossistema (BETTIOL e MORANDI, 2009; CANPANHOLA e BETTIOL, 2003).

O uso de bioprodutos com função biopesticida e bioestimulante é uma alternativa viável para manter a produção agrícola elevada e com baixo impacto ambiental. Certas bactérias e fungos presentes no solo são capazes de colonizar as raízes das plantas e podem promover efeitos benéficos sobre a fisiologia das mesmas (ARIAS *et al.*, 2007; KUBICEK *et al.*, 2001). Microrganismos endofíticos que colonizam raízes promovem o crescimento de plantas de forma indireta, pela supressão de doenças e, diretamente, pela produção ou alteração da concentração de fitormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (MARIANO e KLOEPPER, 2000). Os efeitos de bactérias e fungos endofíticos na promoção de crescimento incluem aumentos na altura, na biomassa da parte aérea, do caule e da raiz e na formação de pelos radiculares e foliares da planta, na lignificação de vasos do xilema e na produção de tubérculos em batata (*Solanum tuberosum*) (PILLAY e NOWAK, 1997; STURZ, 1995).

De acordo com Monte (2001), 90% das aplicações de microrganismos utilizados como antagonistas de patógenos na agricultura são com isolados de espécies do gênero *Trichoderma*, fungos filamentosos de vida livre comuns no solo. O potencial do *Trichoderma* spp. como agente

de controle de doenças em vegetais foi descoberto na década de 30 (WEINDLING, 1932), a partir daí, vários estudos surgiram assim como diversos produtos comerciais formulados com *Trichoderma* spp. em países de quase todos os continentes (HOWELL, 2003). A comercialização de *Trichoderma* spp. como bioproduto ainda é pouco divulgada devido à falta de informação sobre as formas de uso e os possíveis benefícios obtidos na agricultura, rótulos incompletos, produtos que não apresentam a eficiência prometida, influências ambientais, incompatibilidade do fitopatógeno ou do agente de controle biológico e produtos de qualidade duvidosa.

O *Trichoderma* spp. tem boa capacidade reprodutiva, rápido crescimento, habilidade de sobreviver em ambientes desfavoráveis, eficiência na utilização de nutrientes, habilidade de promover o crescimento de vegetais e ativar seus mecanismos de defesa (CHET, IMBAR e HADAR, 1997). Muitas linhagens de *Trichoderma* são rizosfera competentes mantendo uma relação simbiótica com as plantas induzindo-as a um crescimento e desenvolvimento significativamente aumentado (SHORESH e HARMAN, 2008).

O controle biológico pelo *Trichoderma* spp. ocorre de forma indireta por competição por espaço e nutrientes, estimulação do crescimento das plantas, ativação de mecanismos de defesa, síntese de antibióticos ou diretamente por micoparasitismo. Esses mecanismos estão interligados e não dependem apenas da espécie de *Trichoderma*, mas também do tipo de cultivo, fungo a ser antagonizado, e condições ambientais tais como pH, temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes (BENÍTEZ *et al.*, 2004).

A interação *Trichoderma*/planta hospedeira leva a mudanças bioquímicas e estruturais importantes. Além disso, nesta interação é observado um aumento na produção de metabolitos secundários, e de produção de auxinas promovendo o seu crescimento (WOO *et al.*, 2006). Estas características favorecem a utilização de isolados de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

No Brasil a produção de *Trichoderma* spp. em massa para formulação de bioprodutos se dá por fermentação sólida, em que os inóculos são feitos em grãos de arroz autoclavados, seguindo pelo processamento e armazenagem dos esporos (POMELLA e RIBEIRO, 2009). São poucas as informações na literatura sobre as formulações dos produtos a base de *Trichoderma* spp. (LOPES, 2009).

A multiplicação dos esporos por reprodução assexuada pode ser agregada a compostos inertes ou usados isoladamente. A comercialização destes bioprodutos no Brasil ocorre na forma de granulados, pós-molháveis, suspensões aquosas concentradas ou óleo emulsionável (ALMEIDA *et al.*, 2008). São várias as áreas de aplicação, depende do cultivo e das doenças que desejam atingir. Pode ser misturado ao substrato (BETTIOL, 2008), misturado ao solo, por rega

ou pulverização no preparo do plantio, via pivô central em área total (LOBO Jr., PIMENTA e GONTIJO, 2006).

Os cuidados necessários para utilização de produtos à base de *Trichoderma* spp. são maiores do que para agroquímicos, pois o produto é composto por organismo vivo (POMELLA e RIBEIRO, 2009). A comercialização de produtos biológicos é na sua maioria, menos prejudicial quando comparado aos graves problemas que resíduos químicos podem provocar aos vegetais (LOPES, 2009). O alto custo de produção e problemas ambientais são os grandes responsáveis pelo aumento do uso de bioproduto como alternativa aos agrotóxicos (BETTIOL e MORANDI, 2009).

Sementes tratadas com agentes de controle biológico são uma das propostas para inibir a propagação de doenças via sementes, somado ao fato de manter uma densidade adequada de plantas na lavoura (CORRÊA *et al.*, 2008). Nesse contexto, propõem-se realizar um estudo mais aprofundado dos efeitos da inoculação de *Trichoderma* spp. em aspectos morfoanatômicos de *Phaseolus vulgaris* L. podendo ser aplicado no cultivo de plantas como indutores de crescimento com consequente redução do uso de agroquímicos e menores danos ao meio ambiente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais do *Phaseolus vulgaris* L.

O gênero *Phaseolus* pertencente a família Fabaceae é um gênero originário do continente americano, contendo aproximadamente 55 espécies, sendo as mais cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. Gray var. *latifolius* Freeman e *P. polyanthus* Greenman (SANTOS e GAVINALES, 2006). *Phaseolus vulgaris* L. popularmente conhecido como feijoeiro-comum ou simplesmente feijoeiro, é a espécie cultivada mais antiga em todos os continentes (SANTOS e GAVINALES, 2006).

P. vulgaris L. (Figura 1) é uma planta herbácea cujo sistema radicular pivotante atinge aproximadamente 20 cm de comprimento, com maior parte localizada nos 10 cm superficiais do solo. O caule é herbáceo. As folhas são pecioladas, trifolioladas, alternas, exceto as primeiras que são simples e opostas. Nas folhas trifolioladas o folíolo central ou terminal é simétrico e acuminado e os folíolos laterais são assimétricos e acuminados (LEON, 1968; VIEIRA, 1967).

Inflorescências em ráculos axilares, flores com uma bráctea e duas bractéolas, corola papilionada com uma quilha, originada da fusão de duas pétalas inferiores (LEON, 1968). Androceu com anteras com deiscência longitudinal ou rimosa. Gineceu com ovário súpero, unicarpelar, unilocular, plúrioovulados, um estilete terminal e um estigma.

O fruto de *P. vulgaris* L. é um legume denominado popularmente de vagem. As vagens são retas ou ligeiramente curvas, achatadas ou arredondadas, em geral com três a sete sementes (VIEIRA, 1967).



***Phaseolus vulgaris* L.**

Figura 1 – Feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).
Fonte: (AFRICA TERVUREN).

O feijoeiro-comum possui ciclo de vida curto, com duração média de 90 dias dependendo da cultivar e das condições ambientais (ALMEIDA, LEITÃO FILHO e MIYASAKA, 1971).

Existem dois hábitos de crescimento: determinado, inflorescência no ápice da haste principal e lateral, e indeterminado, onde ocorre florescimento da base para o ápice (ALMEIDA, LEITÃO FILHO e MIYASAKA, 1971). São inúmeras as variedades de feijão, entre elas temos a Pérola que possui um hábito de crescimento indeterminado e produtividade média de 2500 a 3500 kg/ha (EMBRAPA, 1994).

O ciclo biológico do feijoeiro, considerando os estágios de desenvolvimento (Figura 2), é dividido em fase vegetativa e reprodutiva. A fase vegetativa é constituída pelas etapas V0, V1, V2, V3 e V4 e a reprodutiva pelas etapas R5, R6, R7, R8 e R9 (LAING *et. al* 1984).

- V0 – Germinação (iniciada a germinação da semente);
- V1 – Emergência (50% dos cotilédones fora do solo);
- V2 – Folhas primárias (par de folhas primárias expandidas);
- V3 – Primeira folha trifoliolada (com folíolos expandidos);
- V4 – Terceira folha trifoliolada (com folíolos expandidos);
- R5 – Pré-floração (após emissão do primeiro botão ou racimo floral);
- R6 – Floração (primeira flor aberta);
- R7 – Formação de legumes (primeira vagem com a corola desprendida);
- R8 – Enchimento de legumes (início de inchamento das vagens);
- R9 – Maturação (quando a primeira vagem começa a descolorir ou secar).

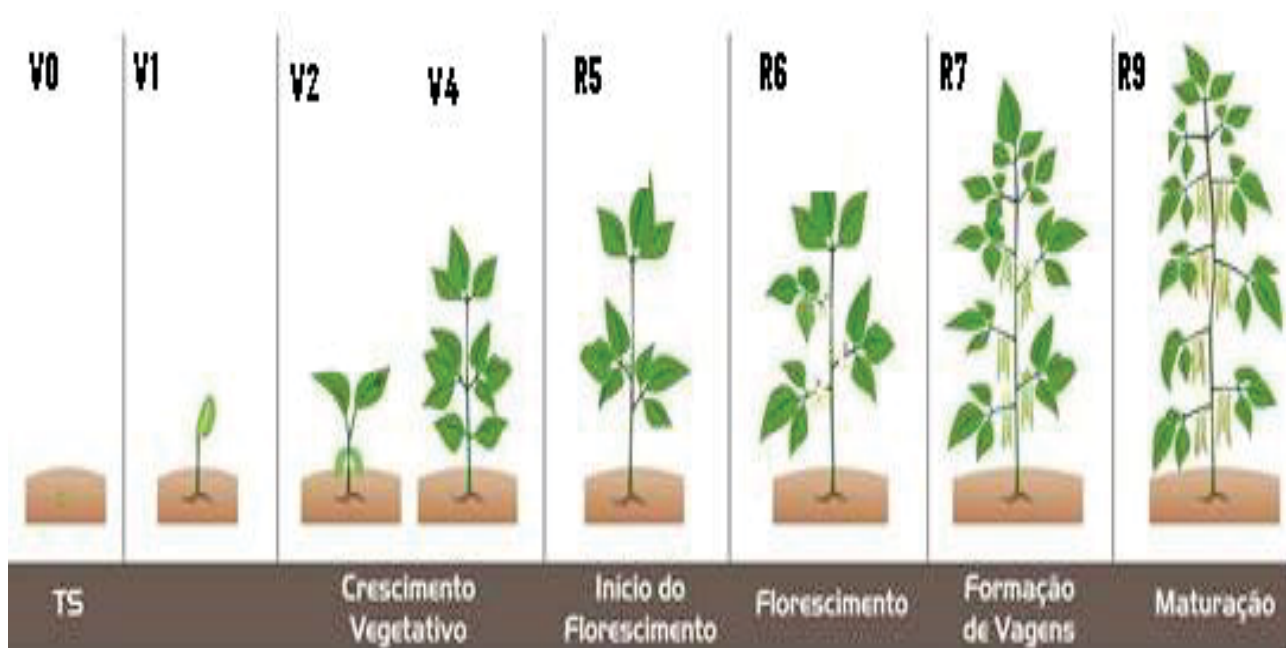


Figura 2 – Alguns estágios de desenvolvimento de *Phaseolus vulgaris* L.
Fonte: (BICALHO, 2013).

O feijão comum no Brasil é cultivado em três safras: águas (outubro a janeiro), seca: (fevereiro a maio) e inverno (junho a setembro).

Wutke, Brunini e Barbano (2000), descreveram sobre a duração das fases fenológicas e temperatura para a cultura do feijoeiro, relatando alta correlação entre o desenvolvimento dessa leguminosa e a temperatura ambiental. Bulisani Almeida e Roston (1987) descrevem que as condições climáticas ideais para o desenvolvimento da cultura do feijoeiro são aquelas com temperatura do ar entre 15°C e 27°C. Em casos de ocorrência de temperaturas elevadas, pode ocorrer prejuízo à produção das plantas, e em condições de temperaturas reduzidas, a duração do ciclo é consideravelmente aumentada.

A hidratação da semente logo após a semeadura é fator fundamental para o sua germinação. A água constitui a fonte de grande parte dos processos bioquímicos e fisiológicos, ativando o desenvolvimento essencial à vida da plântula, apresentando profunda influência na estrutura e nas propriedades das proteínas, das membranas, do material genético e de outros constituintes celulares (BRAY, 1995; BUCHANAN, GRUISSEM e JONES, 2000). A emergência e o desenvolvimento de plântulas estão relacionados ao vigor da semente e do regime hídrico das plântulas (CARVALHO *et al.*, 2013).

O rendimento do feijoeiro na América do Sul é limitado por fatores tais como doenças, pragas, nutrição mineral e estresses hídricos. Assim a agricultura moderna busca alternativas sustentáveis para melhorar o rendimento dos grãos que está relacionado com a quantidade de massa seca acumulada durante o crescimento da planta entre outros fatores (DIDONET e COSTA, 2004).

O feijão é alimento básico da dieta dos brasileiros e ocupa uma posição considerável dentre os alimentos ricos em proteínas e ferro, baixo teor de lipídeos, sódio, ricos em vitaminas do complexo B e minerais. A composição química do feijão traz inúmeros benefícios à saúde, pois auxilia na prevenção de doenças tais como distúrbios cardíacos, obesidade e diabetes (GEIL e ANDERSON 1994).

De acordo com relatos históricos, as leguminosas como os feijões, faziam parte da alimentação de índios. Em proporção e frequência menor do que a mandioca que, juntamente com a pesca, caça e frutos integravam a alimentação diária dos indígenas. Durante os períodos que compreenderam a escravatura no Brasil, o feijão se tornou um alimento de alto valor nutricional para a sobrevivência dos escravos e população de baixa renda. Com o tempo, o consumo do feijão foi se tornando cada vez mais comum e habitual em todo o país (CASCUDO, 1983).

Atualmente, o feijão é a principal fonte de proteína da alimentação brasileira, seguido

pela carne de origem bovina e pelo arroz. Apenas esses três alimentos básicos contribuem com cerca de 70% da ingestão proteica nacional, além de ser uma cultura de grande expressão socioeconômica em todo o país (LAJOLO, GENOVESE e MENEZES, 1996). O feijão quando comparado à proteína de origem animal apresenta menor custo, contribuindo com uma média de 20% da necessidade diária de proteína. O amido armazenado nos grãos ocupa aproximadamente 65% da composição total, já as fibras de celulose e hemicelulose ocupam cerca de 7% do mesmo (BASSINELLO, 2007).

De acordo com o primeiro levantamento de safra de grãos realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para a safra de 2013/2014, o plantio do feijão atingiu uma área equivalente a 3,0 milhões de hectares com uma produção nacional estimada de 3,2 milhões de toneladas, 1.080 kg/ha (CONAB, 2013).

O Brasil é o maior produtor mundial do feijão comum, com uma produtividade média de 922 kg/ha, enquanto que a produção mundial gira em torno de 776 kg/ha. Contudo, o cultivo de feijão por área ainda apresenta pouco rendimento no Brasil (FAO, 2010). As prováveis causas estão associadas a pragas e patógenos, baixa fertilidade, elementos tóxicos no solo, o que leva a uma redução no desenvolvimento do sistema radicular (SOUZA *et al.*, 2006). Outro fator relacionado à baixa produtividade é a qualidade das sementes, no Brasil a maioria dos agricultores usa grãos de feijão sem tratamento sanitário adequado no lugar de sementes tratadas, o que gera problemas relacionados à propagação de doenças e má germinação (VIEIRA e RAVA, 2000).

De acordo com a Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (SEAB), o consumo médio alimentar de feijão no Brasil teve uma estimativa per capita em 2011/12 de 14,94 kg/hab/ano (SEAB, 2012). Apesar disso Wander *et al.* (2010), verificaram que o consumo de feijão sofreu uma queda no mercado quando comparado aos últimos quarenta anos.

A cultivar Pérola, lançado em 1994 pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) é um exemplo recomendado para os estados de Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Bahia e Distrito Federal, devido suas características produtivas, mostrando uma produtividade, com irrigação, de aproximadamente 3mil kg/ ha. Esse cultivar é resistente ao Vírus do mosaico comum (gênero *Potyvirus*), ferrugem (*Uromyces appendiculatus*) e murcha do fusarium (*Fusarium oxysporum*). Vários casos de epidemias acometem a planta ainda na fase de plântula, motivados pela associação do patógeno à semente (hospedeiro), o que favorece a colonização. Comercialmente o feijão Pérola apresenta um grão mais claro, o que lhe dá um preço superior nos principais mercados (EMBRAPA, 2004).

2.2 Fungos do gênero *Trichoderma*

O fungo *Trichoderma* sp. é classificado como um *Ascomyceto* anamórfico do gênero *Hypocrea* sp. que pertence ao filo *Ascomycota* (AGRIOS, 1997). As espécies de *Trichoderma* normalmente são encontradas em quase todos os tipos de solos, especialmente os orgânicos, incluindo a cama de húmus das florestas, solos agrícolas e pomares, podendo viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos (MELO, 1991). Este fungo tem como características morfológicas o micélio, inicialmente de coloração branca e de crescimento rápido, que com o desenvolvimento, tomam a forma de tufo verde escuro (Figura 3). A coloração da colônia ocorre de acordo com a tonalidade e quantidade de conídios presentes, podendo apresentar variações que vão do verde ao verde amarelado. Os conídios são estruturas unicelulares, de forma subglobosa, ovoide, elipsoide ou elíptico-cilíndricos, com textura lisa ou rugosa (Figura 4). Essas estruturas são comumente observadas em forma de esferas, no ápice das fiálides ou células conidiogênicas (Figura 4). As células fiálides têm forma de cantil com o centro dilatado e o ápice afilado, solitários ou em grupos, hialinos, formando um ângulo com os conidióforos. Sendo os micélios ramificados, solitários ou em tufo compactos, geralmente em formato cônico ou piramidal. Normalmente mostram-se em forma de faixas concêntricas de coloração verde (MELO, 1991).



Figura 3 – Placa de Agar Batata Dextrose (BDA) do *Trichoderma harzianum* T22.

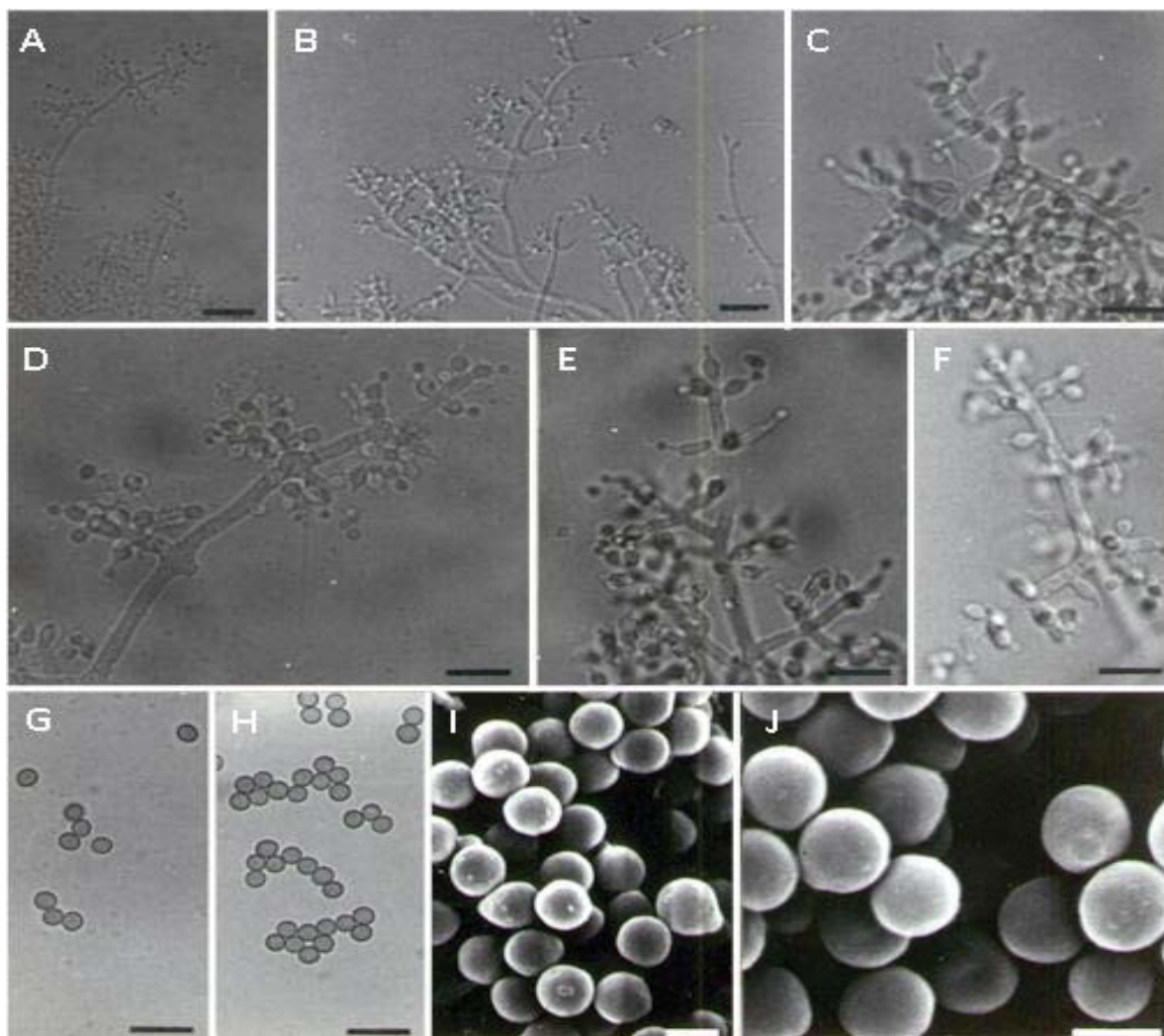


Figura 4 - *Trichoderma harzianum*. (A) Ramificação do conidióforo mostrando fiálides bastante ampuliformes (ALL25); (B) Terminação apical do conidióforo jovem, ainda relativamente estéril; (C) Porção do conidióforo com fiálides mais lageniformes (ALL52); (D) Idem a figura 2A, porém com maior aumento; (E) Conidióforo com fiálides alongadas, tendendo a lageniforme (ALL49); (F) Ramificação lateral do conidióforo mostrando fiálides ampuliformes (ALL50); (G) e (H) Conídios subglobosos (ALL22); (I) Conídios a elevada magnificação (MEV) mostrando a superfície lisa e porção basal truncada (ALL25); (J) Idem a figura I, porém com maior aumento.
Fonte: (LIMA, 2002).

Trichoderma spp. são isolados, cultivados e multiplicados de forma simples e rápida, além de colonizarem com eficiência o sistema radicular de diversas plantas. As hifas colonizam a superfície da raiz, produzem celulase penetrando na primeira ou segunda camada da epiderme, produzem hidrofobina que são proteínas que permitem adesão às superfícies hidrofóbicas (KERSHAW e TALBOT, 1998). Estes fungos não apenas antagonizam patógenos de planta como também são rizosfera competentes podendo melhorar o crescimento das plantas em associações endolíticas (BAILEY e LUMSDEN, 1998).

Trichoderma harzianum é a espécie de *Trichoderma* mais popularizada nos diversos ecossistemas, uma vez que é a mais encontrada na maioria das amostras de solo estudadas em vários países (DRUZHININA *et al.*, 2005). Habitual de regiões de clima tropical e temperado,

este gênero de fungo apresenta uma expressiva variabilidade gênica (GÓMEZ, CHET e HERRERA-ESTRELLA, 1997) sendo empregado em diversos produtos de interesse ecológico e comercial (HARMAN *et al.*, 2004). Por outro lado, a estabilidade genética do fungo no meio ambiente, sua estrutura populacional, reprodução estratégica e distribuição geográfica, têm recebido pouco atenção e permanecem pouco estudadas (HARMAN *et al.*, 2004).

O interesse científico especial neste gênero de fungo é em grande parte relacionado com o desenvolvimento do mercado de produtos agrícolas orgânicos. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Bettiol (2011), a expectativa de uso de bioprodutos no mercado brasileiro até o ano de 2015, gira em torno de 10% do mercado de agrotóxicos. Entretanto, para a utilização de espécies de *Trichoderma* como biofungicida são necessárias ainda muitas pesquisas em bioquímica e biologia molecular para entender os mecanismos de ação, tais como a ação de enzimas hidrolíticas e produção de metabólitos secundários (HARMAN *et al.*, 2004).

No Brasil, a falta de bioprodutos à base de *Trichoderma* spp. registrados no MAPA, tem sido um fator que restringe a sua utilização agrícola, atualmente há quatro produtos registrados no MAPA. Os produtos são encontrados nas formulações como grânulos dispersíveis em água, pó molhável e líquidas (esporos em suspensão oleosa e aquosa) (POMELLA e RIBEIRO, 2009). Dentre os produtos comercializados, os *isolados de Trichoderma asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. viride* são os predominantes no controle de patógenos, porém, além de poucos produtos comercializados, não há registro deles, pelo menos em sua maioria (BETTIOL e MORANDI, 2009).

2.3 *Trichoderma* spp. e o controle biológico

A dificuldade no controle de patógenos de plantas por métodos físicos e químicos é um problema recorrente na agricultura, pois muitos desses métodos são comprovadamente prejudiciais ao meio ambiente, além do fato de que a maioria desses patógenos é resistente ao tratamento em questão (ZILLI *et al.*, 2008).

O controle biológico é descrito por Baker e Cook (1974) como sendo a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença causada por patógenos ou parasitas nos seus estados de atividade ou dormência, por um ou mais organismos antagônicos realizada tanto naturalmente como através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, e ainda, por introdução em massa de um ou mais antagonista.

Posteriormente, Chet, Imbar e Hadar (1997) definiram o controle biológico como sendo a utilização de determinados microrganismos capazes de interferir junto a possíveis patógenos e pragas causadoras de doenças em plantas, sendo por isso, uma ferramenta de controle natural, assim como uma alternativa biológica para amenizar os problemas causados por agrotóxicos comuns na agricultura. Sendo assim, pode-se afirmar que alguns fungos e bactérias agem de forma benéfica à planta o que leva a respostas diretas e indiretas sobre o patógeno (CHET, IMBAR e HADAR, 1997; BAKER e COOK, 1974).

Segundo Melo (1996), o processo do micoparasitismo ocorre em uma sequência de estágios, sendo eles : localização - é a percepção pelo antagonista de estímulos químicos produzidos pelos patógenos; reconhecimento - processo subsequente ao da localização, com o reconhecimento do patógeno pelo antagonista, contato - processo que dá início à penetração, com o contato direto entre patógeno e antagonista e penetração - processo mediado pela ação de enzimas que degradam a parede celular (Figura 5).

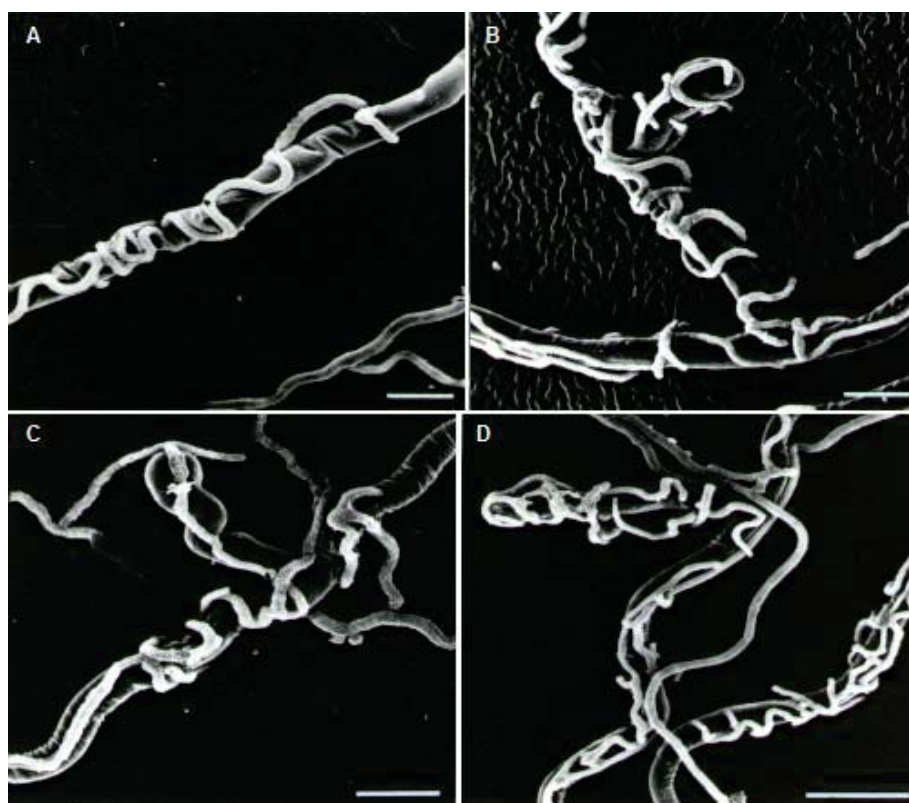


Figura 5 - MEV da ação micoparasítica de *T. harzianum* sobre *R. solani*. A, B, C e D correspondem a interação entre os isolados de *T. harzianum* ALL23, ALL40, ALL41 e ALL44 e o isolado de *R. solani* CNPAF-03, respectivamente. Bar = 10 μ m.

Fonte: (LIMA, 2002).

Antibiose pode ser definida como sendo uma interação entre organismos em que ocorre a produção de metabólitos com efeito danoso sobre o hospedeiro, geralmente degradando paredes

de células fúngicas, causando a morte celular (STADNIK e BETTIOL, 2000). Alguns desses metabólitos são antibióticos de baixo peso molecular (VEY, HOAGLAND e BUTT, 2001). Estudos elaborados por Howell (2003) demonstraram que a interação entre mecanismos de defesa por antibióticos e enzimas hidrolíticas são mais eficientes do que se houvesse apenas um único mecanismo de defesa.

Competição pode ser definida como sendo uma interação entre dois ou mais organismos que competem por espaço e/ou nutrientes numa tentativa de regular as populações (MELO, 1996).

A indução à resistência é um mecanismo utilizado por agentes de controle biológico, como o *Trichoderma* spp., que ativam os mecanismos de defesa das plantas quando expostas a um agente indutor, não apenas no sítio de indução como também em outros locais de forma inespecífica (ROMEIRO, 1999).

A ocorrência de doença em plantas engloba na sua definição a relação dos microrganismos patógenos e não patógenos que vivem no ambiente podendo influenciar as atividade entre eles, limitando ou aumentando a resistência do hospedeiro com todos os organismos vivos de modo a formar um único arranjo de interação (MELO, 1998).

A interação de plantas como feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), cacau (*Theobroma cacao* L.), algodão (*Gossypium Herbaceum* L.), milho (*Zea mays* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), maracujá (*Passiflora edulis* Sims.), plantas do gênero *Arabidopsis*, e trigo (*Triticum aestivum* L.) com espécies de *Trichoderma* spp. tais como *T. harzianum*, *T. asperellum* e *T. virens*, promovem a indução de defesa e resistência nas plantas hospedeiras (HANSON e HOWELL, 2004).

Quando esporos ou outras estruturas propagativas de *Trichoderma* spp. são adicionadas à rizosfera, estas entram em contato com a raiz levando as plantas a produzirem elicitores de respostas de defesa, aumentando a expressão de genes relacionados à defesa (HARMAN *et al.*, 2004).

Em processos patogênicos em várias espécies de plantas, há duas respostas de defesa imunológica:

- A primeira envolve padrões moleculares associados à patógenos - são moléculas comumente encontradas em microrganismos, conhecidas como MAMPs (*Microbe-associated molecular pattern*), que desencadeiam a imunidade da planta (DRUZHININA *et al.*, 2011);
- A segunda responde ao fator de virulência do patógeno, chamado de imunidade desencadeada pelo elittor. Outros microrganismo que não são patógenos às plantas,

como o *Trichoderma* spp., desencadeiam uma resposta sistêmica induzida (ISR), que resulta na acumulação de componentes de sinalização como o etileno e o ácido jasmônico, associados a várias vias de transdução de sinal para a defesa da planta (SHORESH, MASTOURI e HARMAN, 2010). Respostas precoces dos MAMPs envolvem os fluxos de íons através da membrana plasmática, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), o óxido nítrico e o etileno, e também, logo depois, a deposição de calose e a síntese de compostos antimicrobianos (DRUZHININA *et al.*, 2011).

Linhagens eficazes de *Trichoderma* spp. produzem uma variedade de MAMPs o que contribui, junto com a sua diversidade de ações, para que o mesmo se torne um dos fungos benéficos às plantas mais amplamente estudados e descritos na literatura científica (LORITO *et al.*, 2010).

Na interação *T. virens*/algodão (*Gossypium herbaceum* L.), uma proteína purificada, indutora de defesa, denominada Sm1 (proteína cisteína que atua como MAMPs), levou a planta hospedeira a uma elevada expressão sistêmica de enzimas relacionadas com a defesa tais como quitinase, hidroximetilglutarilCoA redutase, β -1,3-glucanase, peroxidase, e lipo-oxigenase (DJONOVIC *et al.* 2006). A associação *Trichoderma*/planta hospedeira leva às alterações bioquímicas e estruturais, como a deposição aumentada da parede celular (calose) no sítio de infecção, o aumento da atividade/expressão enzimática (ex. peroxidases e quitinases) e outras proteínas relacionadas à patogenicidade (WOO *et al.*, 2006).

Os isolados de *Trichoderma* spp. colonizam a epiderme e células do córtex das raízes ativando vias de sinalização que desencadeiam respostas de defesa nas plantas (BROTMAN *et al.*, 2013). Em uma análise comparativa em amostras de pepino (*Cucumis sativus* L.), entre folhas não tratadas e tratadas com *T. asperellum*, foi observado que os sintomas da doença causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* foram reduzidos em 80% das amostras (YEDIDIA *et al.*, 2003). Estudos semelhantes descritos por Segarra *et al.* (2009) para amostras da planta *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, houve uma indução de resistência contra a bactéria *P. syringae* pv. *tomato* com um tipo de isolado de *T. asperellum*, observando uma redução na sintomatologia da doença em plantas tratadas.

Segundo Harman *et al.* (2004), dentro da indução à resistência, o ácido salicílico e o ácido jasmônico juntamente com o etileno ou óxido nítrico, induzem a uma cascata de eventos que provocam a produção de uma grande variedade de metabólitos e proteínas com diversas funções na planta, modificando o proteoma vegetal.

Ensaio realizados por Salas-Marina *et al.* (2011), sugerem que o *Trichoderma atroviride* ativa a expressão sistêmica e local de genes relacionados ao etileno, ácido salicílico e ácido jasmônico.

O etileno é um fitormônio de ampla ação atuando desde a germinação das sementes, expansão de órgãos, formação de raízes, floração, amadurecimento e senescência de frutos e como mediador de resposta a lesões (BLEECKER e KENDE, 2000).

Ácido jasmônico é um fitormônio que, pertence ao grupo de ácidos graxos bioativos chamados de oxilipinas, e atua no desenvolvimento de tricomas, produção de metabólitos secundários, mediador de resposta a lesões, produção de inibidores de protease (LI *et al.*, 2004).

Análises farmacológicas em pepinos (*Cucumis sativus* L.) com inibidores específicos das vias de ácido jasmônico/etileno no *T. asperellum* demonstraram que estas vias de transdução de sinal estão envolvidos no efeito protetor conferido pelo *T. asperellum* contra *P. syringae* pv. *Lachrymans* (YEDIDIA *et al.*, 2003).

O ácido salicílico (AS) é um regulador de crescimento de natureza fenólica capaz de alterar processos fisiológicos nos vegetais e também resistência às doenças. Dentre seus efeitos na planta, ocorrem (ERIG e SCHUCH, 2005):

- Inibição da germinação através da atuação como antagonista do ABA;
- Inibição da senescência através da atuação como antagonista do etileno;
- Redução da transpiração;
- Interfere na absorção das raízes alterando o transporte de íons com uma rápida despolarização da membrana;
- Promoção da abscisão foliar.

O acúmulo de ácido salicílico nas raízes e folhas de pepino (*Cucumis sativus* L.) tratadas com *T. asperellum* não mostrou diferença quando comparado a plantas não inoculadas (SALAS-MARINA *et al.* 2011). Em outro estudo realizado por Korolev, Rav-David e Elad (2008) com isolados de *T. harzianum* houve uma indução de resistência contra o fungo *Botrytis cinerea* a partir de vias de sinalização do Ácido Jasmônico/etileno, foram utilizados microrganismos mutantes deficientes nestas vias para a avaliação do seu efeito.

Conforme uma avaliação de Silva *et al.* (2011) sobre o tratamento da antracnose em cultura de pepinos (*Cucumis sativus* L.), doença causada pelo fungo *Colletotrichum lagenarium*, por *Trichoderma* spp. para indução de resistência, mostrou que houve um controle rápido da doença. O tratamento além de reduzir significativamente os sintomas da doença, com a aplicação

do isolado três dias antes da inoculação do patógeno, conferiu também uma proteção sistêmica contra a antracnose atingindo valores entre 56,36 e 88,39%.

Estudos sobre a utilização do *Trichoderma* spp. inoculados em espécies de milho (*Zea mays* L.), mostraram, através de experimentos com enzimas quitinolíticas, uma maior atividade antifúngica pós-inoculação quando comparado com plantas do controle (SHORESH, MASTOURI e HARMAN, 2010).

A maioria dos fungos do gênero *Trichoderma* constituem fungos filamentosos que são tolerantes aos fungicidas químicos, pré-requisito para agirem como agentes de biocontrole sendo aplicados em plantas para suprimir o crescimento de alguns micróbios patogênicos através do solo. Joeniarti *et al.*, (2013) observaram a tolerância do *T. asperellum* para com o fungicida mefenoxame, bem como para identificar *in vitro* da atividade antagônica de *T. asperellum* contra patógeno *Phytophthora infestans*.

2.4 Tolerância a estresses abióticos

O estresse abiótico pode ser descrito como sendo qualquer fator ambiental que retira energia dos organismos, além de diminuir o crescimento e o desenvolvimento ou mesmo perturbar o equilíbrio de um sistema, mobilizando seus recursos e reservas e elevando seus gastos energéticos (LEVITT, 1980).

As respostas da planta ao estresse provêm de uma interação entre o tipo de estresse, incluindo a duração, severidade, nível de exposição e combinação com outros estresses, e a própria planta-estágio fenológico, genótipo, órgão ou tecido afetado (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Dependendo do estresse o *Trichoderma* spp. pode proporcionar redução da sua severidade.

O ciclo do feijoeiro é curto, sendo assim, pequenos períodos de seca podem comprometer o seu crescimento. De acordo com o clima, a quantidade de água requerida pela planta pode variar. Quando essa necessidade hídrica não é correspondida, o rendimento da cultura se reduz a um valor dependente do estágio fenológico em que o déficit de água acontece. Na etapa vegetativa o efeito sobre o crescimento é mínimo, mesma etapa de pré-floração e enchimento de vagens, a planta é muito sensível à falta de água no solo (CALVACHE e REICHARDT, 1996).

Segundo Yancey, 2005; Meneses *et al.*, 2006 as plantas em períodos de seca podem sofrer alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas apresentando alguns sintomas como:

- Redução na área foliar e senescência;
- Redução do crescimento da parte aérea;

- Redução do crescimento radicular;
- Acúmulo de solutos (prolina, poliaminas, trealose);
- Redução da transpiração;
- Redução da condutância estomática;
- Redução da assimilação líquida de CO₂;
- Redução da capacidade fotossintética;
- Consequente declínio da planta.

A colonização radicular por microrganismos saprófitos aumenta o desenvolvimento radicular e conseqüentemente a produtividade da cultura, a resistência a estresses abióticos e a disponibilidade de nutrientes (BENÍTEZ *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2011).

A aplicação de linhagens de *Trichoderma* spp. na planta aumenta a profundidade das raízes, auxiliando na aquisição hídrica elevando a sua capacidade de resistência aos estresses abióticos e na absorção de nutrientes (ARORA, ELANDER e MUKERJI, 1992; MACHADO *et al.*, 2011).

Pesquisas mostram que sementes de Tabaco inoculadas com *Trichoderma* spp. aprimoram o desempenho germinativo das mesmas, até sob condições adversas (BENÍTEZ *et al.* 2004).

Os resultados mencionados acima são comparáveis aos efeitos induzidos em plantas de Trigo (*Triticum aestivum* L.) inoculado com *T. harzianum* (Th-14, Th-Th-19 e 13). O que mostrou um aumento na taxa de germinação, reduzindo o estresse salino. Mudas colonizadas com *Trichoderma* spp. demonstraram tolerância à salinidade, fato observado por um maior teor de clorofila e índice de estabilidade da membrana, em todos os níveis de estresse (RAWAT *et al.*, 2011). Um mecanismo comum pelo qual as rizobactérias indutoras de crescimento da planta e os fungos saprófitas aumentam a tolerância das plantas ao estresse abiótico podendo levar ao melhoramento dos danos causados pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio em plantas estressadas (MASTOURI, BJORKMAN e HARMAN, 2010).

Um fator comumente encontrado em condições de estresse abiótico é o acúmulo de substâncias tóxicas de espécies reativas de oxigênio em que plantas sob estresse inoculadas com isolados de *T. harzianum* T22, apresentaram uma diminuição nos danos causados por estas substâncias, reduzindo o acúmulo de peróxidos lipídicos em sementes e plantas adultas (SHORESH e HARMAN, 2008). Outro fator importante foi a comparação do efeito da aplicação exógena de um antioxidante (glutathione) com a aplicação do *T. harzianum* T22 sobre a germinação de sementes estressadas, cujos resultados foram semelhantes ao do estudo anterior (MASTOURI, BJORKMAN e HARMAN, 2010).

O processo de peroxidação lipídica tem como principal subproduto o malondialdeído que é um importante indicador na taxa de dano oxidativo. Estudos descritos por Rawat *et al.*, (2011) e Meloni *et al.*, (2003) mostram que seu grau de acumulação foi maior em plantas não tratadas.

A expressão de marcadores de sequências expressas (EMSE) em amostras de folhas e raízes durante um período de seca detectou que as raízes tendem a responder mais cedo à seca do que as folhas. Independente da exposição à seca ou outros estresses, a colonização pelo *T. hamatum* promoveu uma maior tolerância ao estresse abiótico, observado pelo ressecamento e pela diminuição no ângulo de queda das folhas (BAE *et al.*, 2009).

2.5 Promoção do crescimento em plantas influenciado por *Trichoderma* spp.

O uso de diversos microrganismos como bioestimulantes e biofertilizante de plantas tem sido estudado por pesquisadores em várias espécies vegetais. São bactérias e fungos indutores de crescimento em plantas. Contudo, os mecanismos indutores do crescimento ainda carecem de novas abordagens científicas, especialmente no que concerne à sua capacidade de disponibilização de micronutrientes e à sua capacidade de produção de análogos fitormônios como o ácido indolacético (AIA) (HARMAN *et al.*, 2004). A ação de microrganismos como indutor de crescimento é alcançada de maneira direta ou indireta como, por exemplo, através da supressão de microrganismos prejudiciais à planta (LUZ, 1996).

A colonização por microrganismos refere-se à capacidade de reconhecer e aderir às raízes, penetrar e resistir a metabólitos tóxicos, tais como fitoalexinas, flavonoides, agliconas, fenóis, terpenoides e outros compostos antimicrobianos produzidos pelas plantas em resposta a invasão patogênica ou não (PEIXOTO NETO, AZEVEDO e ARAÚJO, 2002). A colonização das raízes por isolados de *Trichoderma* spp. contribui para aumentar o crescimento e desenvolvimento, a produtividade da cultura, utilização de nutrientes (ARORA, ELANDER e MUKERJI, 1992).

O fósforo é o nutriente mais limitante da produtividade de biomassa em solos tropicais ricos em ferro e alumínio. A alta estabilidade entre esses elementos e o fósforo tem como consequência sua indisponibilidade no sistema radicular das plantas (NOVAIS e SMYTH, 1999), essa importância se refere a sua presença em compostos energéticos importantes ao funcionamento da planta, entre eles a adenosina trifosfato (ATP) (MALAVOLTA, 2006).

Muitas linhagens de *Trichoderma* spp. são capazes de acidificar a rizosfera produzindo ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico, fumárico e glucônico promovendo a solubilização de micronutrientes, fosfatos e cátions minerais como o ferro (HARMAN *et al.*, 2004,

ASADUZZAMAN, ALAM e ISLAM, 2010). Com isso, a adição de *Trichoderma* spp. em solos pobres em micronutrientes e minerais atuaria como biofertilizantes pela sua capacidade de solubilizar estes compostos aumentando a produtividade da cultura (BENÍTEZ *et al*, 2004).

Em uma análise, Melo (1996) descreveu que as espécies de *Trichoderma* promovem o crescimento direto, aumentam a germinação de sementes e o florescimento de plantas. Este aumento no crescimento ocorreu mesmo em cultivos livres de patógenos realizados com solo estéril, o que mostra ser uma ação independente deste microrganismo em relação ao controle biológico (WINDHAM, ELAD e BAKER, 1986).

A interação simbiótica entre fungo e planta estimula o crescimento vegetal. Espécies de *Trichoderma* spp. podem promover aumentos de até 300% no crescimento de vegetal, segundo estudos descritos por Brotman, Gupta e Viterbo (2010), melhorando o desenvolvimento da planta e ativando o crescimento da raiz, da área foliar e o peso da planta.

Pesquisas mostram que em raiz de *Pinus radiata*. D. Don colonizadas por *T. atroviride* houve um maior crescimento radicular, do caule e das folhas, não afetando a altura da mesma, com isso levantou-se a hipótese de que o aumento da raiz levou ao aumento da área de absorção de água e nutrientes elevando a fotoassimilação (REGLINSKI *et al.*, 2012). Embora o estudo descrito por Reglinski *et al.* (2012) não tenha observado mudanças na altura da planta, Pereira (2012) observou que a altura de mudas de maracujá (*Passiflora edulis* Sims.) inoculadas com *Trichoderma* spp. apresentaram um aumento médio de 16% em relação ao controle.

Pesquisas realizadas por Bae *et al.* (2009) mostraram que a colonização de mudas de cacau (*Theobroma cacao* L.) por *Trichoderma hamatum* provocou o aumento na raiz e no seu peso seco e fresco independente do ciclo de água em condições de estresse. Mesmo considerando que o crescimento da planta afete sua tolerância ao estresse abiótico, Akrami, Golzary e Ahmadzadeh (2011) observaram que vários fatores podem interferir na eficiência dos agentes benéficos, entre eles alterações ambientais, principalmente a temperatura e a umidade, que são condições consideradas críticas para garantir o bom desempenho dos isolados de *Trichoderma* spp.

Geraldine, Pereira Filho e Lobo Jr. (2011) observaram que a viabilidade dos esporos de diferentes espécies de *Trichoderma* aplicado por pulverização na área foliar sofre influência da radiação solar o que pode afetar a produtividade e crescimento do feijoeiro (*P. vulgaris* L.).

Segundo Harman (2000), a microbiolização consiste na aplicação de microrganismos vivos às sementes e que este processo influencia no controle de patógenos e crescimento de plantas, incluindo germinação, emergência e desenvolvimento das plântulas e produção de frutos e grãos. O uso desta técnica de aplicação tem como vantagem a eficiência nos tratamentos já nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas (SOAVE e MORAES, 1987).

Chacón *et al.* (2007), mostraram que plantas de tomate (*S. lycopersicum* L.) inoculadas com *T. harzianum*, tiveram seu sistema radicular colonizado pelo fungo, resultando em um aumento da proliferação de raízes e consequente aumento na massa fresca e na área foliar das plantas. Observações feitas por Harman *et al.* (2012) mostraram que a interação do *Trichoderma* spp. com a planta causou alterações na arquitetura da raiz, aumentando a área de superfície da mesma, motivada pela colonização por fungo, alterando em consequência, a fisiologia da planta e resultando em inúmeros benefícios como a resistência ao estresse hídrico, absorção de fertilizantes nitrogenados, resistência à patógenos e eficiência fotossintética.

O isolado de *T. harzianum* T22, conhecido pela sua capacidade de colonizar todo o sistema radicular de milho, foi efetivo na indução de formação de raízes de soja e milho tratadas com o referido isolado e maior produtividade de pimentão comparado com o controle negativo (HARMAN, 2000).

A interferência de *Trichoderma* spp. em plantas e o aumento na produtividade ocorrem, segundo Harman *et al.* (2004), devido à sua capacidade em colonizar raízes. Um grande número de isolados selvagens de *Trichoderma* avaliados apresentou limitada capacidade de colonizar a rizosfera (PAPAVIZAS, 1985), o que leva a uma busca por alterações gênicas para a obtenção de isolados com melhor capacidade de crescimento junto às raízes durante o desenvolvimento radicular da planta (LYNCH *et al.*, 1991).

A promoção de crescimento das plantas mediada pelo fungo está diretamente relacionada com as alterações no padrão de expressão de proteínas do metabolismo vegetal durante a interação *Trichoderma*/planta hospedeira. Análises do proteoma da interação pepino e *T. asperellum*, mostraram que genes e proteínas envolvidas no metabolismo energético e fotossíntese tiveram expressão aumentada, bem como produtos de resposta de defesa, sugerindo que houve um aumento do crescimento da planta (SHORESH e HARMAN, 2008).

Esses microrganismos podem formar associações endofíticas e interagir com outros microrganismos na rizosfera, influenciando diretamente na proteção de doenças, crescimento e produtividade (SAITO, 2009). A ação destes microrganismos, isolados ou por associação, em plantas envolve o reconhecimento molecular entre os dois organismos por meio de uma gama de componentes de sinalização, tais como os fitormônios ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno, e as enzimas hidrolíticas como quitinases, glucanases, peroxidases e celulasas (GARCÍA-GARRIDO e OCAMPO, 2002; SHORESH, YEDIDIA e CHET, 2005).

Os sinalizadores responsáveis pelo reconhecimento molecular mencionado acima possuem um ponto de ligação com outras vias de resposta de hormônios variados como o ácido abscísico que é associado ao desenvolvimento da planta e estresse abiótico, o Ácido indol-3-acético que

está relacionado ao crescimento e desenvolvimento das plantas de raízes laterais, e as giberelinas que controlam o crescimento de plantas através da degradação de proteínas de repressão do crescimento DELLA que são repressores da sinalização de giberelina (HERMOSA *et al.*, 2012).

Os hormônios são mensageiros químicos, produzidos em uma célula, que atuam em processos celulares em outra célula. Um único hormônio pode controlar várias vias de ação em diversas células (MURCH, 2006). Os sinais químicos gerados pelos fitormônios acarretam mudanças no desenvolvimento ou estado fisiológico das células, dos tecidos e sistemas dos órgãos. Alguns destes hormônios são produzidos em determinado tecido e translocam para locais específicos promovendo mudança nessas áreas. Outros agem dentro do próprio tecido em que são sintetizados (RAVEN, 2001).

Carvalho Filho *et al.* (2008), analisaram a produção de AIA em isolados de *Trichoderma* spp. de acordo com os resultados obtidos foi observado no isolado *T. harzianum* CEN262, um nível consideravelmente superior de AIA em relação aos demais isolados estudados. A concentração elevada de AIA verificada nas análises do isolado *T. harzianum* CEN262 foram compatíveis com os valores obtidos nos experimentos relativos ao desenvolvimento de mini estacas de eucalipto clonal, que atingiu aumento de 137%, 145% e 43% da parte aérea, raiz e altura das plantas, respectivamente, comparados ao controle.

Gravel, Antoun e Tweddell (2007a; 2007b) observaram que a adição de AIA exógeno na rizosfera das plantas de tomate acarretou em uma inibição do crescimento radicular quando na ausência de *Trichoderma* sp. o que demonstra que altas concentrações de AIA na rizosfera levam a uma inibição do crescimento radicular não condizente com relatos literários sobre a influência do *Trichoderma* spp. como indutor de crescimento, sugerindo que este possua mecanismos capazes de degradar o AIA na tentativa de regular a taxa deste fitormônio.

3. JUSTIFICATIVA

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma importante fonte de proteína na dieta humana em vários países, principalmente no Brasil. O desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para melhorar o desenvolvimento e a produção do feijoeiro resultam na diminuição de gastos com manejo e no aumento da qualidade do produto final. A utilização de fungos do gênero *Trichoderma* no desenvolvimento do feijoeiro é uma alternativa sustentável quando comparada ao uso de produtos químicos, sendo menos prejudicial ao meio ambiente. Assim, a

interação fungo e feijoeiro poderá contribuir para o desenvolvimento da planta trazendo uma melhora no cultivo e proporcionando a redução dos custos de produção.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da inoculação de isolados do fungo *Trichoderma* spp. em aspectos morfológicos e anatômicos do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.).

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o comprimento e volume da raiz, área foliar e massa seca da planta;
- Avaliar os parâmetros quantitativos da lâmina foliolar: espessura da epiderme adaxial e abaxial e do mesofilo;
- Analisar aspectos anatômicos das folhas e raízes visando detectar possíveis alterações estruturais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local de condução do experimento

O experimento foi desenvolvido nas dependências da Universidade Federal de Goiás, nos Laboratórios de Enzimologia localizado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) II e de Anatomia Vegetal localizado no ICB I, e na Embrapa arroz e feijão no município de Santo Antônio de Goiás.

5.2 Obtenção do inóculo

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados nos ensaios foram cultivados em grãos de arroz parboilizados (Figura 6) e colocados em Erlenmeyer (250 mL), posteriormente sendo

umedecidos com água destilada em uma proporção de 60 % do volume de arroz usado, e levados para autoclave a uma temperatura de 121° C por 40 min. Os frascos foram mantidos a 25° C por um fotoperíodo de 12 horas por sete dias. As suspensões de esporos, obtidas após a lavagem do arroz com água destilada autoclavada foram inoculadas nas sementes em uma concentração de 2×10^9 conídios viáveis x mL⁻¹.

Os isolados utilizados no processo acima foram:

- *T. harzianum* T22 e ALL42;
- *T. asperellum* T34.



Figura 6 – Grãos de arroz com esporos de *Trichoderma harzianum*.

5.3 Sementes

Foram utilizadas sementes de *P. vulgaris* L. cedidas pela Embrapa Arroz e Feijão localizada no município de Santo Antônio de Goiás - GO. As sementes de feijão foram esterilizadas superficialmente com álcool 70% por 1 minuto e posteriormente lavadas por três vezes seguidas com água destilada autoclavada. Em seguida a umidade excessiva foi eliminada com o uso de papel toalha.

5.4 Produção das plantas em casa de vegetação

Três plantas de feijão da variedade Pérola foram cultivadas em cada torre de PVC (cilindros), sendo cada torre composta de dois cilindros com cerca de 25 cm de diâmetro X 60 cm de comprimento. As torres foram forradas internamente com sacos plásticos e preenchidas com vermiculita e adubada uma vez por semana (Figura 7). O delineamento experimental constitui de 20 tratamentos com três repetições. Os tratamentos foram dispostos da seguinte maneira:

- Controle: sementes sem inoculação do *Trichoderma* spp.;
- Sementes com isolados de *Trichoderma* spp. T34, ALL42 e T22 da coleção de microrganismos da Embrapa Arroz e Feijão.



Figura 7 – Mudanças de *P. vulgaris* L. variedade pérola plantadas em torres de PVC.

Cada tratamento foi composto por três repetições, sendo que as coletas foram feitas em cinco estágios do ciclo do feijoeiro, sendo os estágios V2 (7 DAE), V4 (28 DAE), R5 (32 DAE), R7 (52 DAE) e R8 (63 DAE) para análise morfológica, análise quantitativa da espessura do mesofilo e epiderme da lamina foliar, e foram coletadas amostras nos estágios V2, V4 e R5 para análise anatômica da raiz.

5.5 Obtenção e armazenamento das amostras

Para as análises dos parâmetros de crescimento foram coletadas amostras de feijoeiro nos estágios V2, V4, R5, R7 e R8 e posteriormente armazenadas em câmara fria por no máximo 24hs.

Para as análises da lâmina foliar foram coletadas amostras nos estágios V2 (folhas primárias), V4, R5, R7e R8 (terceira folha trifoliolada totalmente expandida) para a análise anatômica da raiz foram realizadas coletas nos estágios V2, V4 e R5. As amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído, ácido acético glacial, etanol 50%; 5:5:90, v/v) por 24 horas e conservadas em álcool 70%.

5.6 Análises quantitativas de crescimento e de parâmetros anatômicos

5.6.1 Área foliar

As folhas foram destacadas da planta e só assim a área foliar foi medida utilizando o aparelho medidor Area Meter modelo LI-3100.

5.6.2 Sistema radicular

As análises morfológicas do sistema radicular foram realizadas por meio do sistema WinRHIZO Pro 2007 a (Régent Instr. Inc.), acoplado a um *scanner* profissional Epson XL 10000. Conforme metodologia descrita por Cantão (2007), as raízes foram dispostas em uma cuba de acrílico de 20 cm de largura por 30 cm de comprimento, com uma lâmina de água de aproximadamente um centímetro, que permitiu a aquisição de imagens de raízes lavadas e da realização da medição do comprimento e volume da raiz (Figura 8).

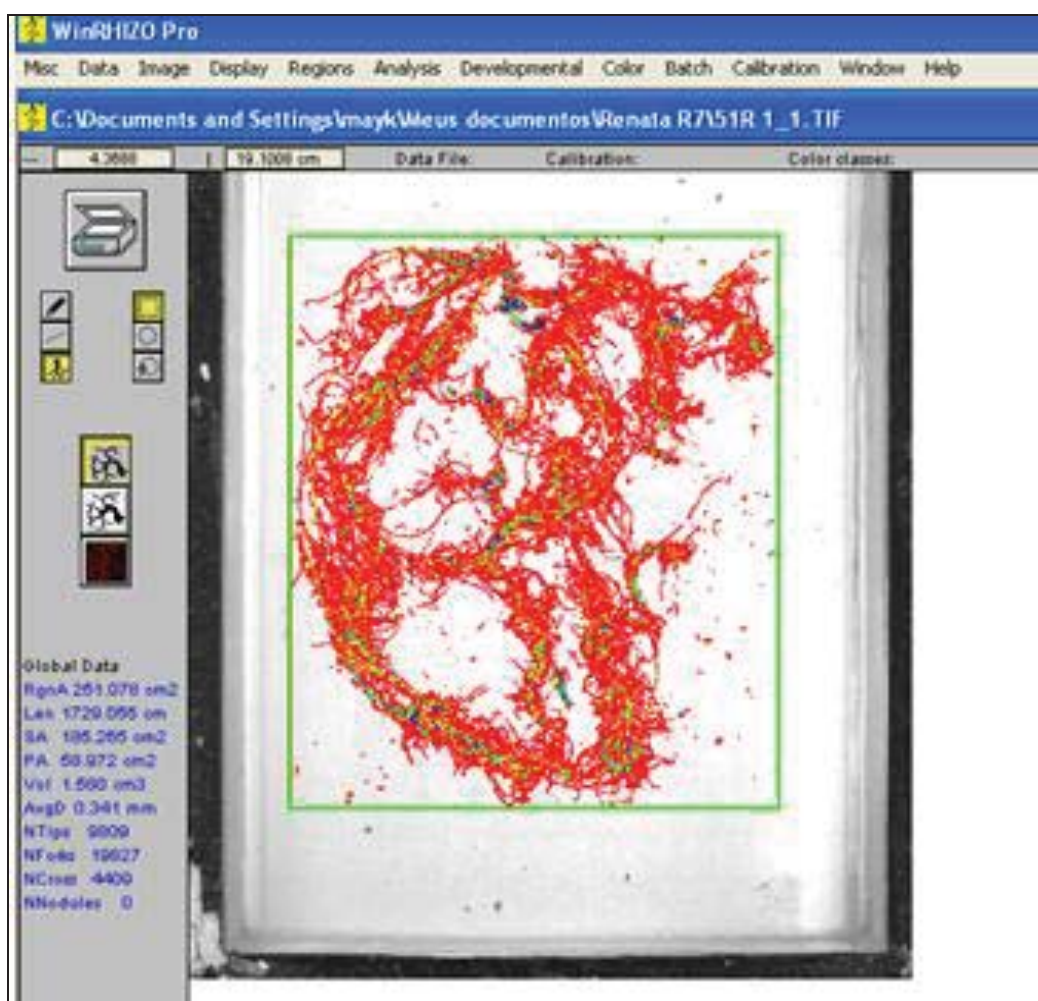


Figura 8 – Leitura da raiz do *Phaseolus vulgaris* L. pelo software WinRHIZO Pro 2007.

5.6.3 Massa seca

Das plantas coletadas foram separados as raízes e a parte aérea. As raízes foram lavadas para a remoção da vermiculita. Para a determinação da massa seca, as raízes e a parte aérea da planta foram acondicionadas em saco de papel e, em seguida, secas em estufa com circulação forçada de ar regulada a uma temperatura de 60° C por aproximadamente 72hs. Após o material atingir peso constante, foi realizada a pesagem em balança semi-analítica.

5.6.4 Aspectos anatômicos da lâmina foliolar e raiz

Para a caracterização anatômica, amostras da região mediana do folíolo central de cada indivíduo foi fixado com FAA 50 por 24h, posteriormente transferidos para etanol 60% por 24h, sendo então, armazenados em etanol 70% (JOHANSEN, 1940).

Para a preparação das lâminas semipermanentes foram realizadas secções transversais da lâmina foliolar a mão livre e com o auxílio de micrótomo de mesa. As secções do material vegetal foram clarificadas com hipoclorito de sódio a 6%, lavadas em água destilada por quatro vezes e submetidas à dupla coloração fucsina básica aquosa 0,1% e azul de astra 0,3% na proporção 3:1. Em seguida as secções foram montadas entre lâmina e lamínula utilizando-se glicerina 50% (ROESER, 1972).

As medidas de espessura do mesofilo e da epiderme das faces adaxial e abaxial da lâmina foliolar foram realizadas nas secções transversais da região mediana do folíolo central (Figura 9). A amostragem foi constituída de doze cortes para cada indivíduo analisado. As mensurações foram realizadas em microscópio Leica com câmera digital ICC50, com programa de captura de imagem LAD EZ versão 1.8.1.

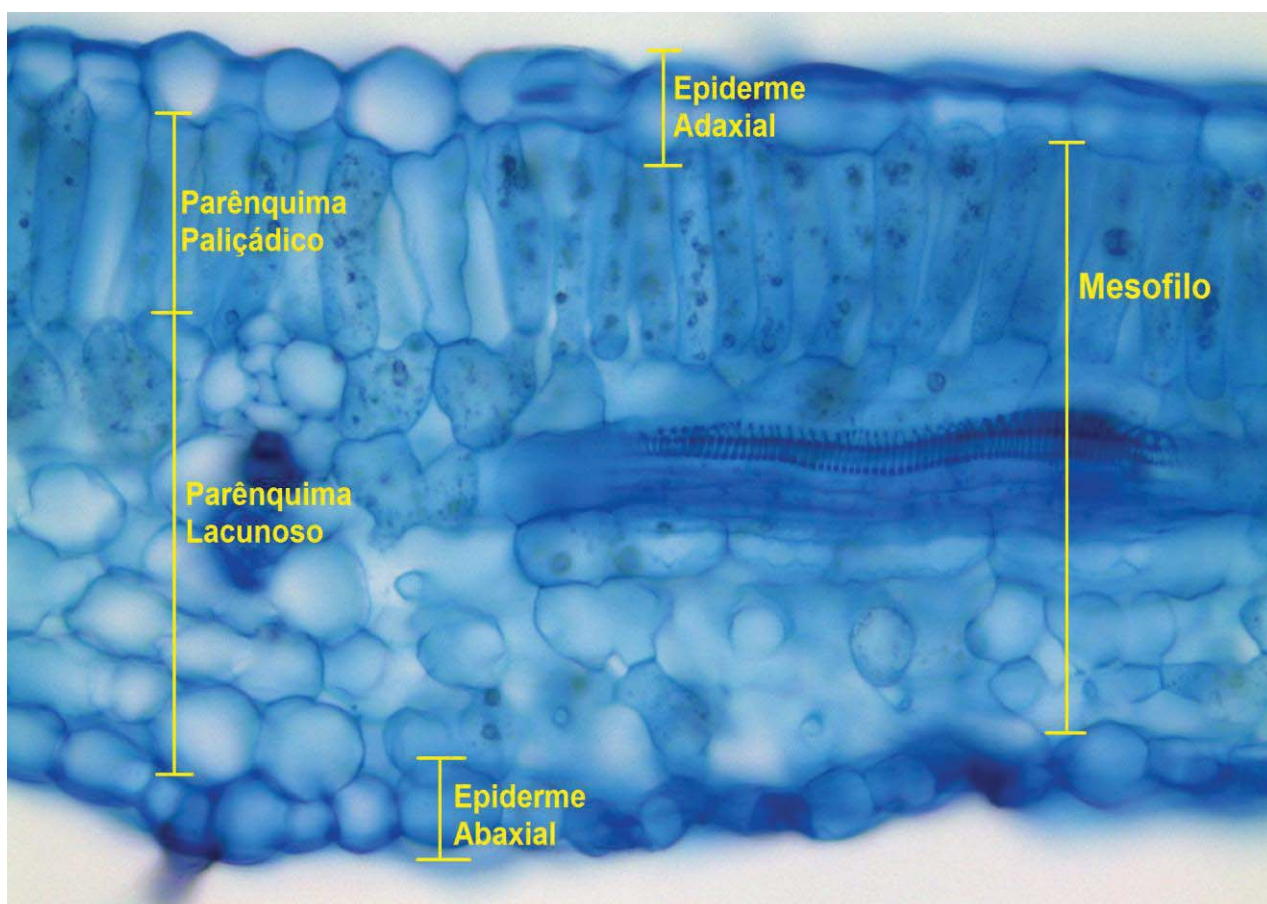


Figura 9 – Corte transversal da lâmina foliolar de *Phaseolus vulgaris* L. variedade Pérola

Para a análise anatômica da raiz, amostras da raiz principal provenientes da região de ramificação (Figura 10) foram fixadas em FAA 50 por 24h, posteriormente transferidas para etanol 60% por um período de 24h, sendo então, armazenadas em etanol 70% (JOHANSEN, 1940).

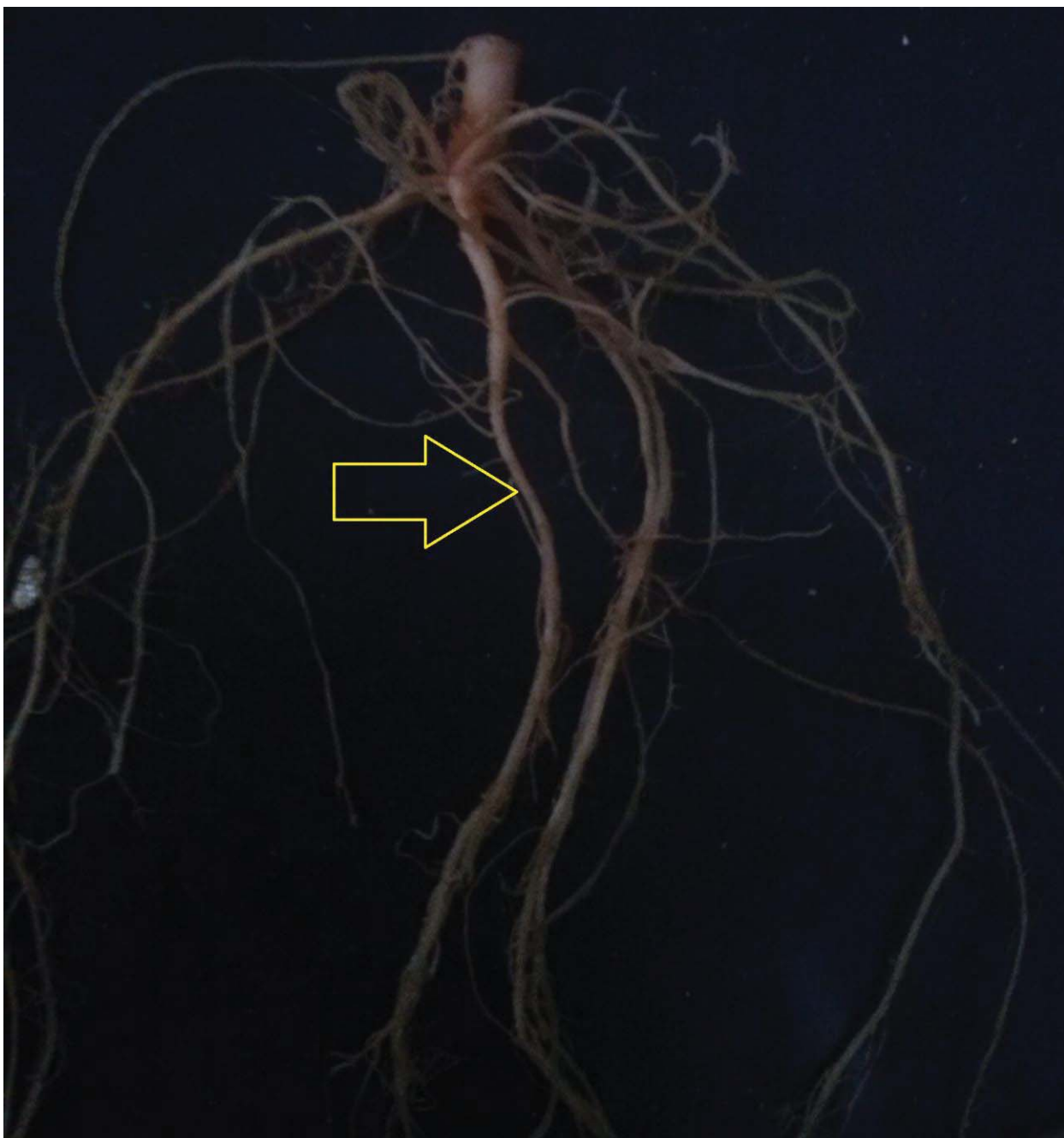


Figura 10 – Raiz do *Phaseolus vulgaris* L variedade Pérola. Seta indica a região em que foram retiradas as amostras da raiz principal.

5.7 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, com três repetições para análises morfológicas e anatômicas. Os dados foram calculados a uma análise de variância quando do término do ciclo do feijoeiro, período em que foram realizadas observações para a presença de possíveis alterações significativas pelo F-teste (5%) e teste Scott-Knott (5%) para a separação de médias.

6. RESULTADOS

6.1 Análises de crescimento (aspectos morfológicos)

O aumento da massa seca do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculado com o *Trichoderma* spp. foi significativo na maioria dos estágios analisados (Tabela 1), com exceção de R7. O isolado de *T. harzianum* (ALL42) foi o que apresentou uma maior média quando comparado com o controle e os outros isolados. Dados obtidos com três plantas para cada tratamento e em cada estágio.

Tabela 1 - Massa seca das plantas (g) de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tratamentos. As médias acompanhadas de mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferiram a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

(Massa seca final das plantas do feijoeiro (g)) Estágios do desenvolvimento						
	V2	V4	R5	R7	R8	Total
Controle	0,16 b	0,71 c	1,92 c	7,00a	13,22 a	4,60
T22	0,25 ab	1,18 ab	2,59 b	9,03a	9,80 ab	4,57
ALL42	0,26 a	1,30 a	3,59 a	6,92a	14,21 a	5,25
T34	0,26 a	1,04 b	2,72 b	7,88a	5,21 b	3,42
Média	0,23	1,06	2,70	7,71	10,61	-----
CV%	13,67	8,15	8,26	29,32	24,23	-----
F calculado	7,10*	26,27*	28,14*	0,57 _{NS}	7,50*	-----

NS: não significativo; *: F calculado significativo a 5% de probabilidade.

Controle: indivíduos não tratados com *Trichoderma* spp; T22: *T. harzianum*; ALL42: *T. harzianum*; T34: *T. asperellum*. V2: estágio em que aparecem folhas primárias; V4: estágio em que aparece a terceira folha trifoliolada; R5: estágio de Pré-floração; R8: Enchimento das vagens; R9: Maturação.

Foi observado nos diferentes estágios de crescimento do feijoeiro um aumento significativo no volume das raízes nas amostras de feijoeiro inoculados com o *T. harzianum* T22 (Tabela 2 e Figura 11).

Tabela 2 - Volume da raiz (cm³) de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tipos de tratamentos. As médias acompanhadas de mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferiram a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

(Massa seca final das plantas do feijoeiro (g) Estágios do desenvolvimento)						
	V2	V4	R5	R7	R8	Total
Controle	0,16 b	0,71 c	1,92 c	7,00a	13,22 a	4,60
T22	0,25 ab	1,18 ab	2,59 b	9,03a	9,80 ab	4,57
ALL42	0,26 a	1,30 a	3,59 a	6,92a	14,21 a	5,25
T34	0,26 a	1,04 b	2,72 b	7,88a	5,21 b	3,42
Média	0,23	1,06	2,70	7,71	10,61	-----
CV%	13,67	8,15	8,26	29,32	24,23	-----
F calculado	7,10*	26,27*	28,14*	0,57 _{NS}	7,50*	-----

NS: não significativo; *: F calculado significativo a 5% de probabilidade.

Controle: indivíduos não tratados com *Trichoderma spp*; T22: *T. harzianum*; ALL42: *T. harzianum*; T34: *T. asperellum*. V2: estágio em que aparecem folhas primárias; V4: estágio em que aparece a terceira folha trifoliolada; R5: estágio de Pré-floração; R8: Enchimento das vagens; R9: Maturação.

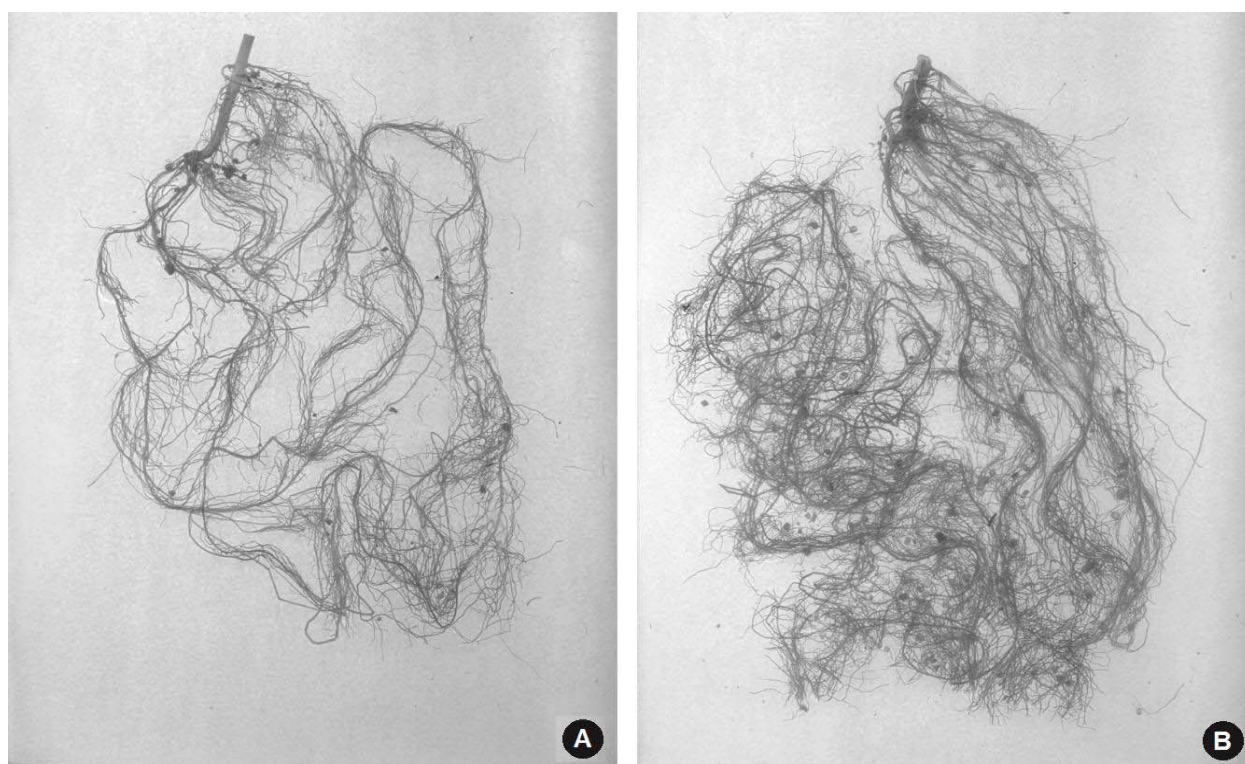


Figura 11 - A-B. Raiz de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tratamentos - estágio R5. A: raiz não tratada com *Trichoderma*. B: raiz tratada com *T. harzianum* T22.

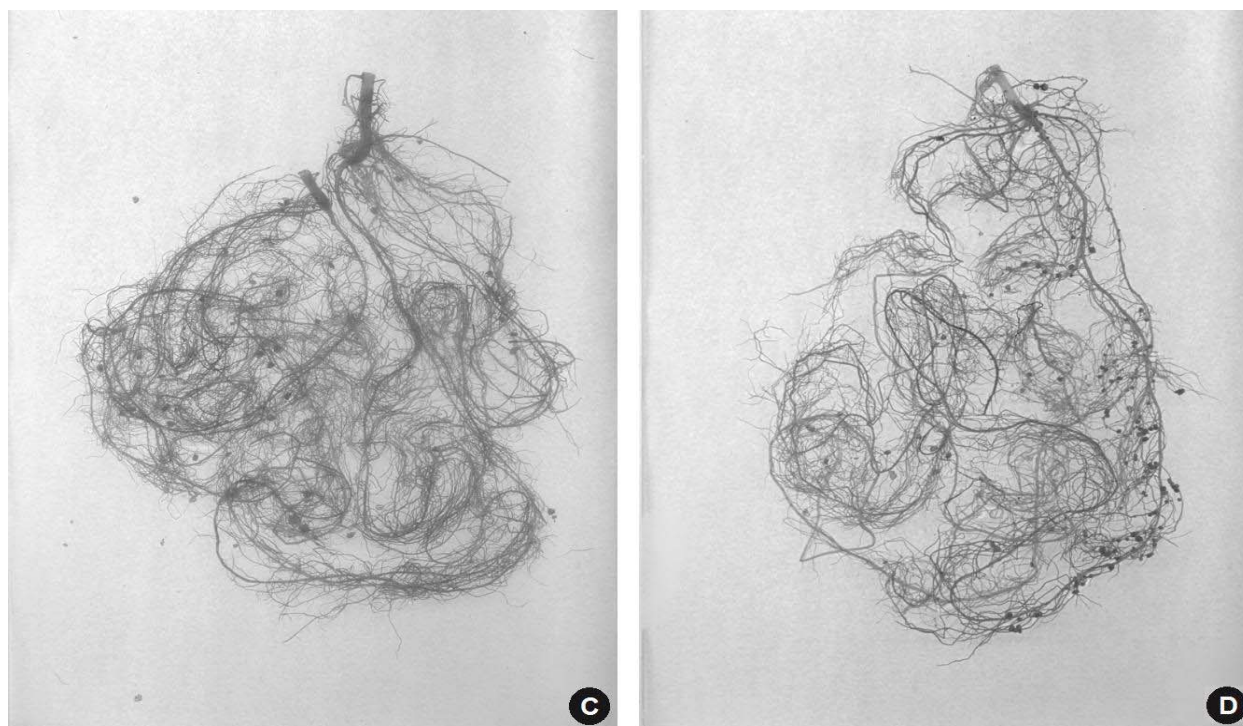


Figura 12 - C-D. Raiz de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tratamentos - estágio R5. C: raiz tratada com *T. harzianum*. ALL42; D: raiz tratada com *T. asperellum* T34.

No presente trabalho, o comprimento das raízes, principalmente no estágio V4, apresentaram maiores médias quando tratadas com os isolados de *T. harzianum* T22 e ALL42 (Tabela 3).

Tabela 3 -Comprimento da raiz (cm) de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tipos de tratamentos. As médias acompanhadas de mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferiram a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

	(Comprimento da raiz (cm)) Estágios do desenvolvimento					
	V2	V4	R5	R7	R8	Total
Controle	118,22 b	526,62 b	1088,60 b	922,20 c	1791,30a	889,38
T22	178,86 a	1091,67 a	1469,30 ab	1757,60 ab	1512,10a	1201,90
ALL42	129,87 ab	1067,87 a	1641,60 a	1238,70 bc	1999,90a	1215,58
T34	113,17 b	701,46 b	948,10 b	1833,10 a	1527,30a	1224,62
Média	139,05	846,90	1286,91	1437,87	1707,63	-----
CV%	17,61	13,16	14,97	14,21	18,31	-----
F calculado	11,00*	18,70*	8,43*	13,49*	1,67NS	-----

NS: não significativo; *: F calculado significativo a 5% de probabilidade.

Controle: indivíduos não tratados com *Trichoderma spp*; T22: *T. harzianum*; ALL42: *T. harzianum*; T34: *T. asperellum*. V2: estágio em que aparecem folhas primárias; V4: estágio em que aparece a terceira folha trifoliolada; R5: estágio de Pré-floração; R8: Enchimento das vagens; R9: Maturação.

As plantas inoculadas com os isolados *T. harzianum* T22 e ALL42 apresentaram área foliar maior que o controle nos estágios analisados. Apesar de não ter tido a maior média em todos os estágios, o isolado *T. harzianum* T22 apresentou valores relativamente maiores quando comparado a todas as médias (Tabela 4).

Tabela 4 - Área foliar (cm) de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tipos de tratamentos. As médias acompanhadas de mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferiram a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

	(Área foliar (cm)) Estágios do desenvolvimento					Total
	V2	V4	R5	R7	R8	
Controle	52,31a	192,31 b	421,23 c	1463,11 b	1052,09 b	636,21
T22	68,15a	322,94 a	628,73 ab	2074,06 a	1271,53 ab	873,08
ALL42	57,10a	328,42 a	681,98 a	1332,92 b	1527,90 a	785,66
T34	61,52a	375,87 a	530,45 bc	1454,50 b	566,48 c	597,76
Média	59,77	304,88	565,60	1458,23	1105,25	-----
CV%	11,32	9,34	8,48	33,92	11,19	-----
F calculado	2,97 _{NS}	27,96*	17,18*	3,11 _{NS}	32,41*	-----

NS: não significativo; *: F calculado significativo a 5% de probabilidade.

Controle: indivíduos não tratados com *Trichoderma* spp; T22: *T. harzianum*; ALL42: *T. harzianum*; T34: *T. asperellum*. V2: estágio em que aparecem folhas primárias; V4: estágio em que aparece a terceira folha trifoliolada; R5: estágio de Pré-floração; R8: Enchimento das vagens; R9: Maturação.

Em relação à espessura da epiderme adaxial e abaxial da lâmina foliolar não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Espessura da epiderme adaxial (μm) em seção transversal da lâmina foliolar de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tratamentos. As médias acompanhadas de mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferem a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

	(Espessura da epiderme superior (μm)) Estágios do desenvolvimento					Total
	V2	V4	R5	R7	R8	
Controle	41,57a	39,59a	41,32a	39,08a	42,39a	40,79
T22	41,45a	38,94a	39,45a	38,25a	41,36a	39,89
ALL42	42,53a	39,86a	39,39a	40,74a	39,35a	40,37
T34	41,61a	38,43a	39,53a	39,32a	41,03a	39,98
Média	41,79	39,2	39,92	39,35	41,03	-----
CV%	3,89	4,84	2,7	4,43	2,46	-----
F calculado	0,28 _{NS}	0,34 _{NS}	2,25 _{NS}	1,06 _{NS}	4,66 _{NS}	-----

NS: não significativo; *: F calculado significativo a 5% de probabilidade.

Controle: indivíduos não tratados com *Trichoderma* spp; T22: *T. harzianum*; ALL42: *T. harzianum*; T34: *T. asperellum*. V2: estágio em que aparecem folhas primárias; V4: estágio em que aparece a terceira folha trifoliolada; R5: estágio de Pré-floração; R8: Enchimento das vagens; R9: Maturação.

Tabela 6 - Espessura da epiderme abaxial (μm) em secção transversal da lâmina foliolar de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tratamentos. As médias acompanhadas de mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferiram a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

	(Espessura da epiderme inferior (μm)) Estágios do desenvolvimento					
	V2	V4	R5	R7	R8	Total
Controle	39,42a	38,94a	39,73a	39,74a	39,98a	39,56
T22	39,46a	39,60a	42,58a	39,59a	40,87a	40,42
ALL42	39,05a	38,43a	39,51a	39,18a	41,56a	39,54
T34	39,89a	39,86a	38,86a	39,30a	40,49a	39,68
Média	39,45	40,45	40,17	39,45	40,72	-----
CV%	5,12	4,61	6,39	2,84	4,32	-----
F calculado	0,09 _{NS}	0,69 _{NS}	1,24 _{NS}	0,16 _{NS}	0,43 _{NS}	-----

NS: não significativo; *: F calculado significativo a 5% de probabilidade.

Controle: indivíduos não tratados com *Trichoderma* spp; T22: *T. harzianum*; ALL42: *T. harzianum*; T34: *T. asperellum*. V2: estágio em que aparecem folhas primárias; V4: estágio em que aparece a terceira folha trifoliolada; R5: estágio de Pré-floração; R8: Enchimento das vagens; R9: Maturação.

A espessura do mesofilo apresentou valores maiores em plantas tratadas com *Trichoderma* spp. nos estágios V2 (figura 12), V4 (figura 13) e R7 (figura 14), porém somente foi significativo a 1% em V4 e 5% em R7 onde houve diferença entre as médias. A maior média foi apresentada pelo *T. harzianum* T22 em V4 apresentando 46% de aumento na espessura do mesofilo em relação ao controle (Tabela 7).

Tabela 7 - Espessura do mesofilo (μm) em secção transversal da lâmina foliolar de *Phaseolus vulgaris* L. em relação aos tratamentos. As médias acompanhadas de mesma letra, dentro de uma mesma coluna, não diferiram a 5% de significância pelo teste de Scott-Knott.

	(Espessura do mesofilo (μm)) Estágios do desenvolvimento					
	V2	V4	R5	R7	R8	Total
Controle	342,48a	256,40 b	369,90a	330,92 b	287,53a	317,44
T22	377,77a	374,56 a	353,11a	324,23 ab	281,63a	342,26
ALL42	363,28a	334,21 a	325,20a	406,89 a	286,01a	343,11
T34	346,38a	351,30 a	346,32a	310,63 b	267,39a	324,40
Média	357,47	329,11	348,63	343,17	280,64	-----
CV%	9,14	6,46	11,39	9,76	15,44	-----
F calculado	0,74 _{NS}	17,39*	0,65 _{NS}	5,01*	0,13 _{NS}	-----

NS: não significativo; *: F calculado significativo a 1% e 5% de probabilidade.

Controle: indivíduos não tratados com *Trichoderma* spp; T22: *T. harzianum*; ALL42: *T. harzianum*; T34: *T. asperellum*. V2: estágio em que aparecem folhas primárias; V4: estágio em que aparece a terceira folha trifoliolada; R5: estágio de Pré-floração; R8: Enchimento das vagens; R9: Maturação.

A organização estrutural da lâmina foliolar não apresentou alterações em relação ao controle (Figuras 12-14). A epiderme manteve-se uni seriada e apresentando células das faces adaxial e abaxial com formas e tamanhos variados; o mesofilo manteve a organização dorsiventral, sendo o parênquima paliçádico constituído por uma camada de células e o parênquima lacunoso com quatro a cinco camadas.

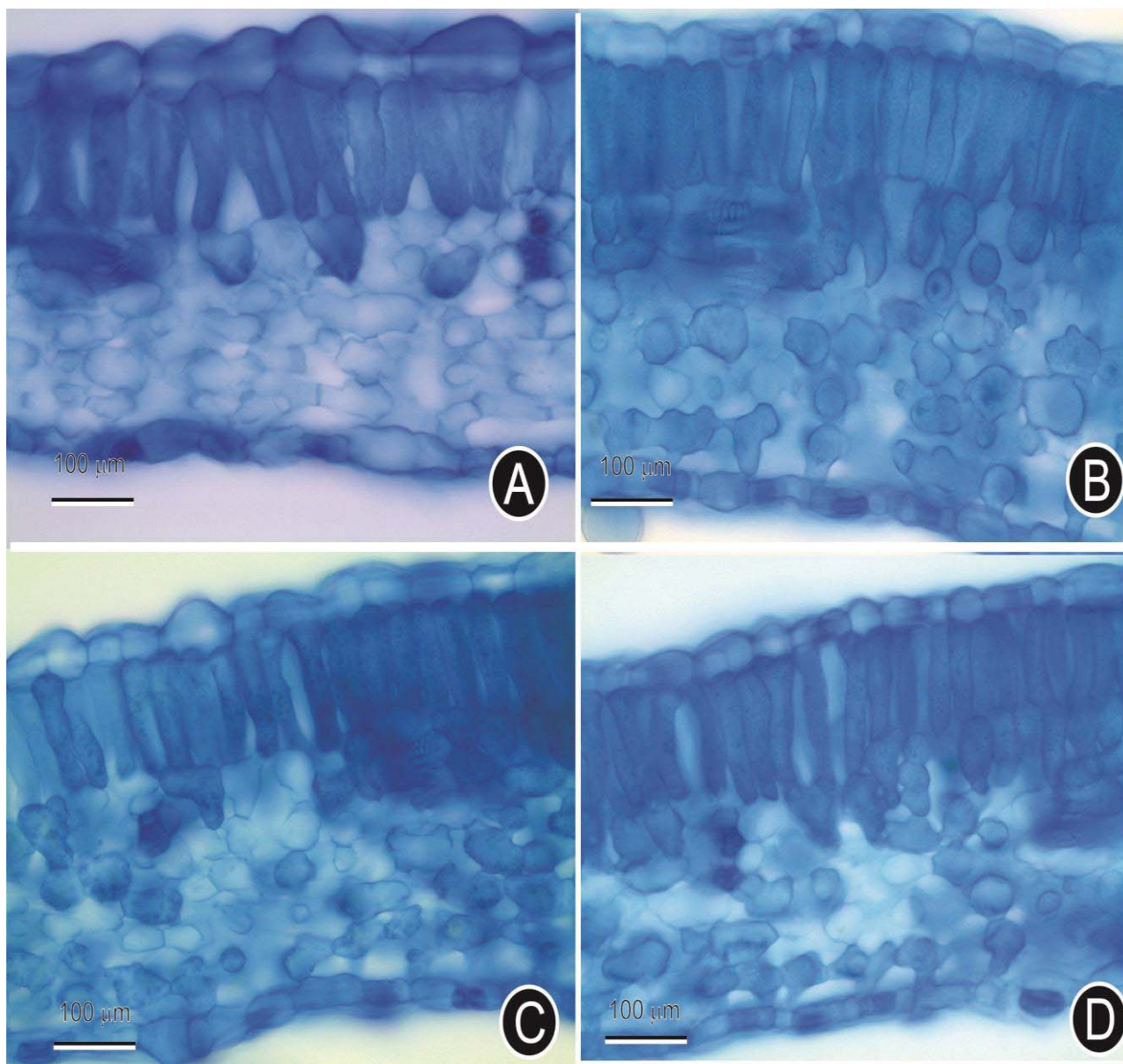


Figura 13 - A- D. Secções transversais da região mediana do folíolo central de *Phaseolus vulgaris* L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio V2. A. Sem tratamento com *Trichoderma*. B. Tratamento com *T. harzianum* (T22). C. Tratamento com *T. harzianum* (ALL42). D. Tratamento com *T. asperellum* (T34).

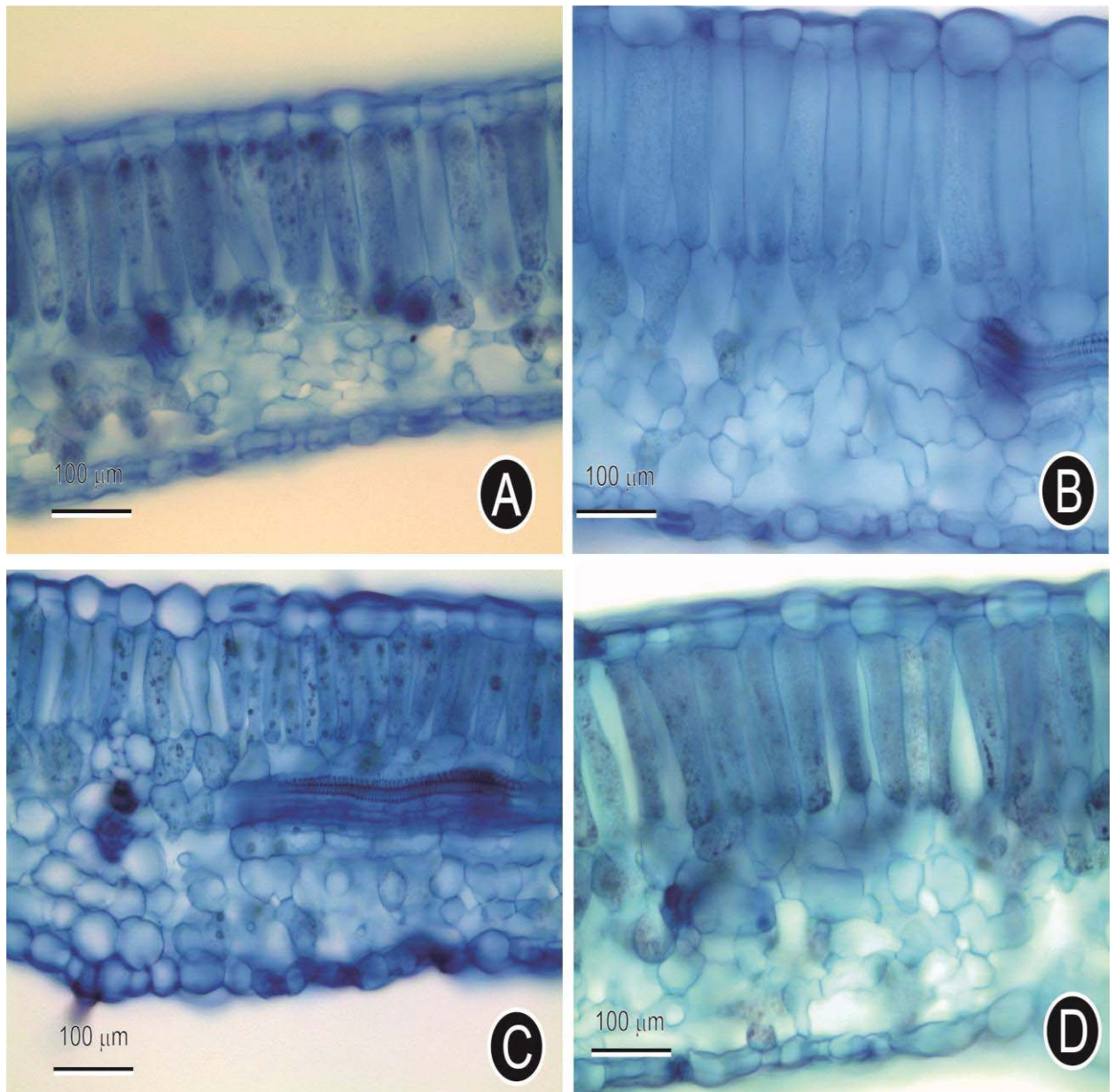


Figura 14 - A-D Secções transversais da região mediana do folíolo central de *Phaseolus vulgaris* L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio V4. A. Sem tratamento com *Trichoderma*. B. Tratamento com *T. harzianum* (T22). C. Tratamento com *T. harzianum* (ALL42). D. Tratamento com *T. asperellum* (T34).

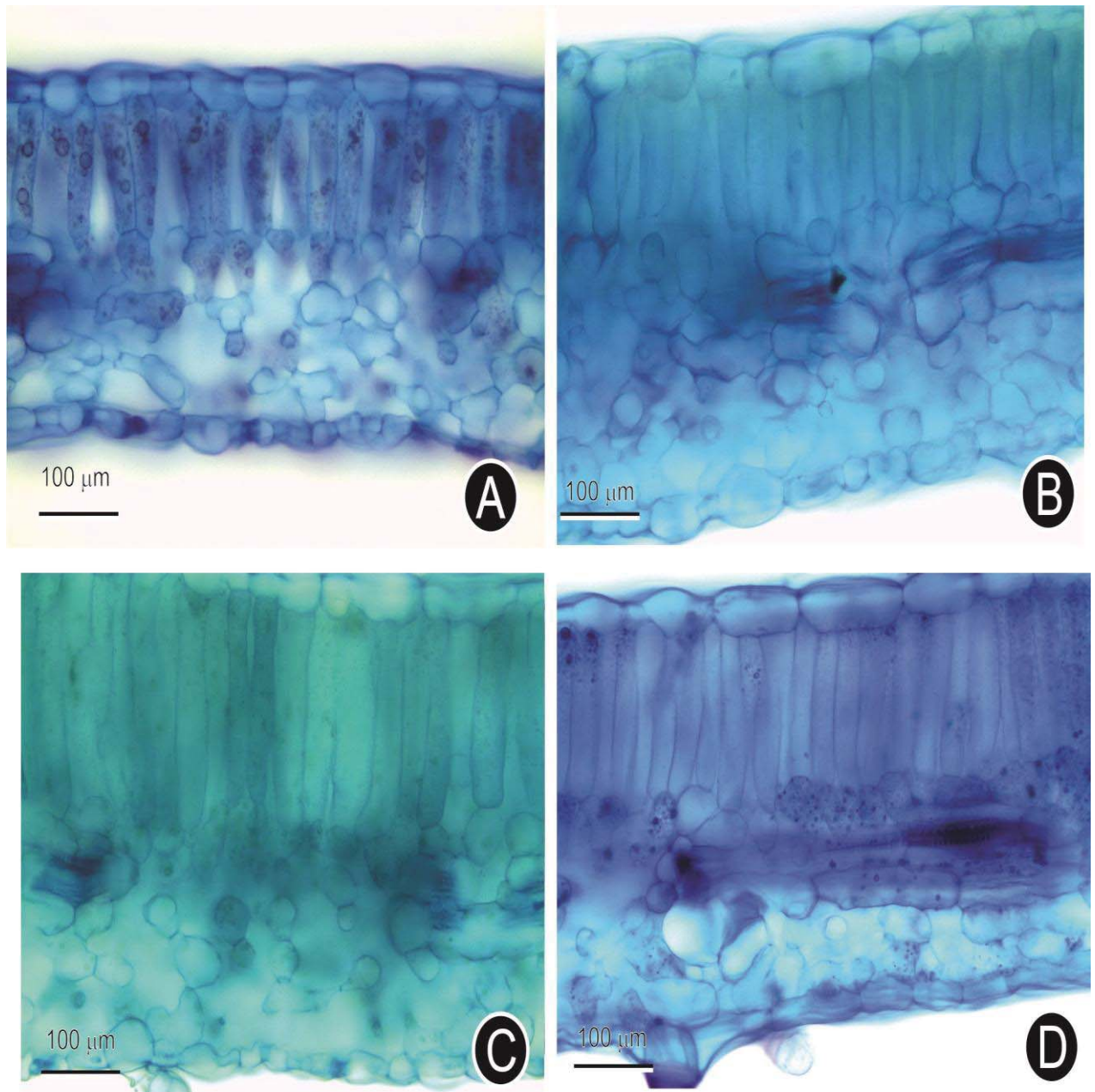


Figura 15 - A-D. Secções transversais da região mediana do folíolo central de *Phaseolus vulgaris* L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio R7. A. Sem tratamento com *Trichoderma*. B. Tratamento com *T. harzianum* (T22). C. Tratamento com *T. harzianum* (ALL42). D. Tratamento com *T. asperellum* (T34).

As raízes das plantas tratadas com o inóculo de *Trichoderma* spp. no estágio V4 apresentaram cilindro vascular em crescimento secundário mais desenvolvido, enquanto que o controle apresentou crescimento secundário incipiente (Figura 15).

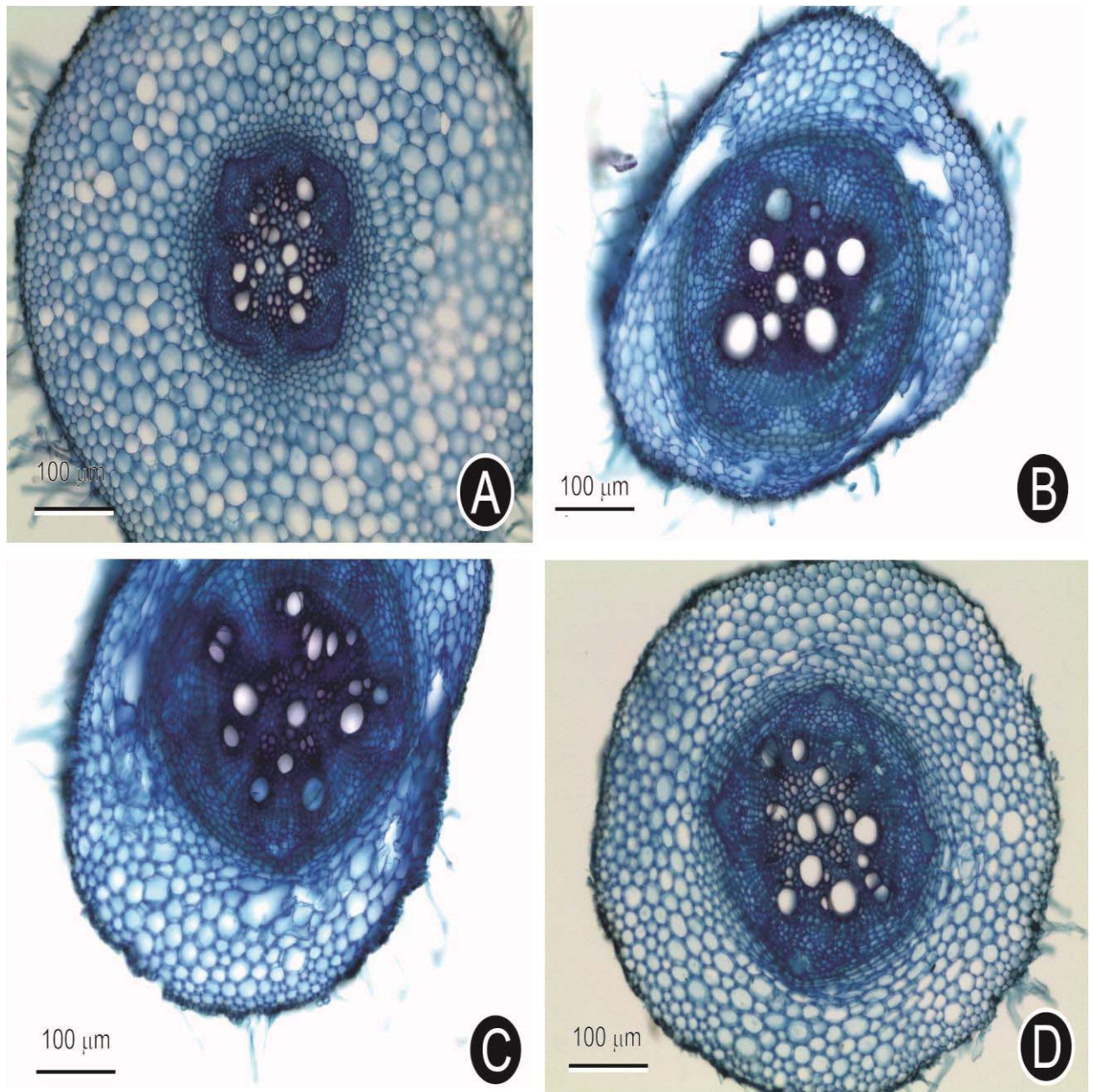


Figura 16 - A-D. Secções transversais da região de ramificação da raiz de *Phaseolus vulgaris* L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio V4. A. Sem tratamento com *Trichoderma*. B. Tratamento com *T. harzianum* (T22). C. Tratamento com *T. harzianum* (ALL42). D. Tratamento com *T. asperellum* (T34).

Houve um maior desenvolvimento de xilema secundário no período de pré-floração das plantas (R5) tratadas com *T. harzianum* (T22), *T. harzianum* (ALL42) e *T. asperellum* (T34) em relação ao controle (Figura 16).

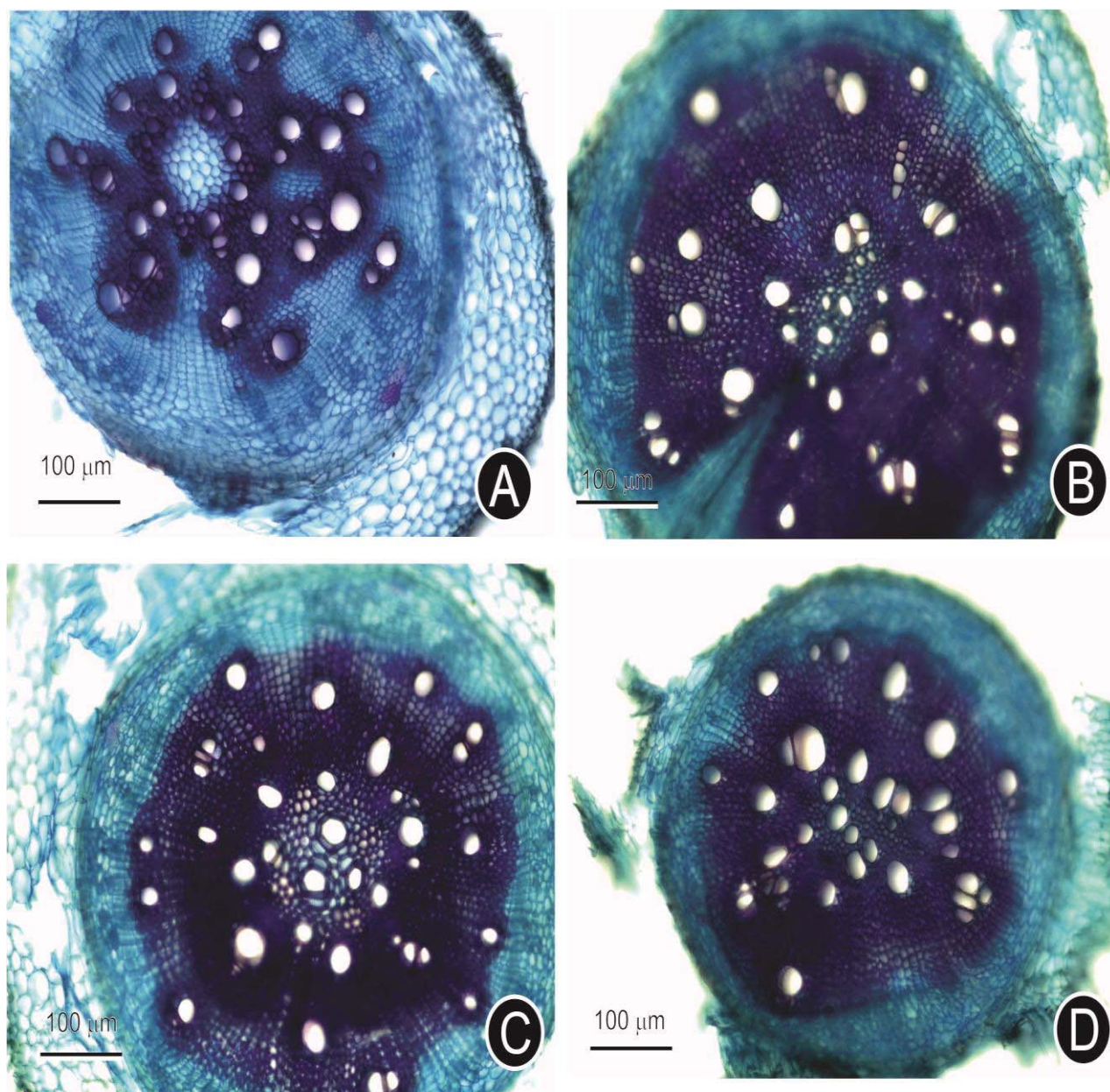


Figura 17 - A-D. Secções transversais da região de ramificação da raiz de *Phaseolus vulgaris* L. submetidas a diferentes tratamentos - estágio R5. A. Sem tratamento com *Trichoderma*. B. Tratamento com *T. harzianum* (T22). C. Tratamento com *T. harzianum* (ALL42). D. Tratamento com *T. asperellum* (T34).

A matriz de correlação examina o grau de associação de duas variáveis, verificando até que ponto estas são interdependentes ou covariantes.

Dentro da matriz de correlação apresentada abaixo, considerando todos os estágios analisados, pode-se observar correlação entre massa seca com o comprimento da raiz, volume da raiz e área foliar com valores próximos ao máximo que é 1. Foi apresentada também correlação positiva entre comprimento da raiz com volume da raiz e área foliar. Além da correlação positiva entre volume da raiz e área foliar.

Tabela 8 - Matriz de correlação simples entre os parâmetros analisados no total dos estágios observados.

	Mesofilo	Epidad	Epidab	Mseca	Compraz	Volraiz	Areafol
Mesofilo	1.00000	0.11515 _{NS}	-0.25696 _{NS}	-0.41464 _{NS}	-0.35684 _{NS}	-0.21938 _{NS}	-0.24574 _{NS}
Epidad		1.00000	-0.09759 _{NS}	-0.02122 _{NS}	-0.22484 _{NS}	-0.23277 _{NS}	-0.33503 _{NS}
Epidab			1.00000	0.08929 _{NS}	0.17607 _{NS}	0.16430 _{NS}	0.03141 _{NS}
Mseca				1.00000	0.77210*	0.80175*	0.76424*
Compraz					1.00000	0.83739*	0.71792*
Volraiz						1.00000	0.81958*
Areafol							1.00000

NS: não significativo; *: significativo a 5% por Scott-Knott.

Mesofilo: espessura do mesofilo; Epidad: espessura da epiderme adaxial; Epidab: espessura da epiderme abaxial; Mseca: Massa seca da planta; Compraz: comprimento da raiz; Volraiz: volume da raiz; Areafol: área foliar.

7. DISCUSSÃO

No estudo foco dessa dissertação, foram analisados alguns parâmetros durante o desenvolvimento das plantas de feijoeiro comum tratadas com isolados de *Trichoderma*, sendo eles:

- Massa seca;
- Volume da raiz;
- Comprimento da raiz;
- Área foliar;
- Espessura do mesofilo e da epiderme adaxial e abaxial da lâmina foliolar; e
- Aspectos anatômicos da raiz.

Com as análises acima, foram observadas diferentes respostas dependendo do estágio observado e do isolado utilizado.

A associação do *Trichoderma* spp. ao feijoeiro comum reflete a importância da simbiose entre plantas e microrganismos, fato observado naturalmente no ecossistema e que instiga estudos com o intuito de melhorar o desenvolvimento e o crescimento da planta, contribuindo para a produtividade agrícola.

Como pode ser observado na Tabela 1, as plantas tratadas com *Trichoderma* spp. apresentaram um aumento na massa seca final na maioria dos estágios analisados tendo como destaque os indivíduos tratados com o isolado *T. harzianum* ALL42 sendo mais enfático no estágio R5 com um aumento de 86% em relação ao controle. De acordo com Gomes e Paiva (2004), a massa seca da parte aérea indica o vigor da planta e a massa seca das raízes determina a capacidade das plantas de sobrevivência e crescimento inicial em campo. Pesquisas realizadas por Bae *et al.*, (2009) mostram em experimentos que a colonização de mudas de cacau (*Theobroma cacao* L.) por *Trichoderma hamatum* provocou o aumento na raiz e no seu peso seco e fresco. Santos, Mello e Peixoto, (2010), trabalhando com o *Trichoderma* spp. como indutor de crescimento em plantas, encontrou maior acúmulo de matéria seca em raízes de maracujazeiro (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.).

O comprometimento na disponibilidade de nutrientes é um fator ambiental que comumente limita o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Para não comprometer o seu desenvolvimento, aprimoram mecanismos para se adaptarem a esse tipo de estresse, que incluem alterações na arquitetura do sistema radicular (CHACÓN *et al.*, 2007).

As alterações na arquitetura das raízes viabilizando a capacidade de exploração do solo e, portanto, o potencial para extração dos nutrientes afetam a disponibilidade e a mobilidade no solo do nutriente limitante. Sendo assim, qualquer alteração na arquitetura do sistema radicular pode modificar a captação e a alocação de recursos e do crescimento da planta (CHACÓN *et al.*, 2007).

Como observado na Tabela 2 e Figura 11 deste trabalho, as plantas tratadas com *Trichoderma* spp. apresentaram um aumento no volumes radicular na maioria dos estágios analisados principalmente em indivíduos tratados com os isolados de *T. harzianum* T22, com um aumento de 96% em relação ao controle no estágio V4.

De acordo com Harman (2000), o *T. harzianum* é capaz de promover um aumento no comprimento e volume da raiz de várias plantas como soja (*Glycine Max*) e milho (*Zea mays*).

A colonização de raízes de plantas por *T. harzianum* T22 tem como um dos principais efeitos o desenvolvimento radicular o que foi mostrado por Harman (2000), com o aumento do volume de raiz de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) tratada com T22. Segundo Contreras-Cornejo *et al.* (2009), a auxina tem papel primordial na promoção do crescimento em plantas,

através do desenvolvimento de raízes laterais e desenvolvimento de pelos radiculares contribuindo para o aumento do volume da raiz, o que foi observado em plantas do gênero *Arabidopsis* através da utilização e comparação de marcadores deste hormônio em plantas inoculadas e não inoculadas com isolados de *Trichoderma virens* e *T. atroviride*. Na pesquisa, o *T. virens* foi capaz de estimular a produção de compostos indólicos como o ácido indol-3-acético, ácido indol-3-acetaldeído, que estimulam o crescimento da planta.

Chacón *et al.*, (2007), mostraram que plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) inoculadas com *T. harzianum*, tiveram seu sistema radicular colonizado pelo fungo, resultando num aumento da proliferação de raízes e conseqüente aumento na massa fresca e na aérea foliar da planta. Observações feitas por Harman *et al.*, (2012) relataram que a interação do *Trichoderma* spp. com plantas, como o pepineiro (*Cucumis sativus*), causam alterações na arquitetura da raiz, aumentando a área de superfície da mesma, sendo motivado pela colonização pelo fungo, alterando em conseqüência, a fisiologia da planta e resultando em inúmeros benefícios como resistência ao estresse hídrico, absorção de fertilizantes nitrogenados, resistência à patógenos e eficiência fotossintética. Um dos possíveis mecanismos de ação é a produção de uma proteína rica em cisteína pelo *Trichoderma* spp. capaz de mudar a arquitetura da raiz.

Os resultados relatados na Tabela 3 descrevem diferenças significativas quanto ao comprimento radicular dos feijoeiros tratados com o *Trichoderma* spp. na maioria dos estágios analisados, apresentando portanto, resultados satisfatórios quanto a aplicação do *T. harzianum* e *T. asperellum* por inoculação em sementes com relação a ampliação do comprimento radicular.

Segundo Saravanakumar, Arasu e Kathiresan (2013), *T. harzianum* é capaz de promover o crescimento de mangue-cinza (*Avicennia marina*), através do aumento no comprimento da raiz, devido a sua capacidade de solubilizar nutrientes como o fósforo.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os dados obtidos por diferentes autores, visto que os valores descritos na Tabela 4 mostraram que houve diferença significativa quanto à área foliar em feijoeiros tratados com *Trichoderma* spp. na maioria dos estágios analisados, em especial com o *T. harzianum* em três (R5, R7 e R8) dos cinco estágios observados, embora a maior porcentagem de acréscimo em área foliar encontrado tenha sido com *T. asperellum*, T34 no estágio V4.

A variável área foliar de uma planta é conhecida por ser um indicativo de desenvolvimento vegetal, já que o processo fotossintético depende da captura da energia luminosa e da sua conversão em energia química (PORTES, CARVALHO e KLUTHCOUSKI, 2003). O índice de medidas em área foliar influencia a captação de luz com isso um aumento na área foliar favorece

a fotossíntese o que tende a proporcionar um aumento na taxa de crescimento e ganho de carbono (GRIME e HUNT, 1975).

Em um dos muitos trabalhos analisados, Inbar *et al.* (1994) ao trabalharem com o isolado T203 de *T. harzianum*, perceberam que houve um aumento de 96% de área foliar em plântulas de pepino cultivadas em substrato tratado, compatível com os resultados do presente trabalho.

O estudo de Salas-Marina *et al.* (2011) mostrou que a aplicação do *T. atroviride* em raiz de *Arabidopsis* promoveu o crescimento da planta com resposta significativa na área foliar quando comparadas aos controles. Além disso, mostrou que *T. atroviride* produz compostos indólicos em meios de cultura, sugerindo que pode ser este um fator estimulante do crescimento de plantas.

Carvalho Filho *et al.* (2008), trabalhando com *Trichoderma* spp. como indutor de crescimento em mudas de eucalipto, notou um desenvolvimento da parte aérea com a inoculação de isolados de *T. harzianum*, incluindo a área foliar. Nesse mesmo estudo, foi observado que isolados do gênero *Trichoderma* tem potencial para controle do fungo *Cylindrocladium*, tendo como consequência indireta a interferência no crescimento de plantas, muitas vezes potencializando.

Yedidia *et al.* (2001) observaram que plantas de pepino tratadas com *T. harzianum* apresentaram um incremento significativo na área foliar, comparadas ao controle. Trabalhos realizados por Kleifeld e Chet, (1992) com aplicação de *Trichoderma* spp. apresentaram aumentos significativos na porcentagem de germinação, na área foliar quanto no peso seco das plantas.

Dentro dos cinco estágios analisados, a espessura do mesofilo apresentou valores maiores em três estágios da planta tratada com *Trichoderma* spp. V2, V4 e R7. Porém somente foi significativo ($p \leq 0,01$) no estágio V4, estágio esse em que ocorre o surgimento da terceira folha trifoliolada e que antecede a pré-floração, e em R7 que é o estágio em que ocorre a formação das vagens. Os resultados mais expressivos ocorreram no tratamento com o *T. harzianum* T22 que mostrou um aumento de 46% em relação ao controle em V4 e do *T. harzianum* ALL42 que mostrou um aumento de 22% em relação ao controle em R7.

Em estudos conduzidos por McClendon (1962) e Jurik (1986), foi demonstrado que existe uma estreita correlação entre a capacidade fotossintética e a espessura foliar.

Os parâmetros de análise quantitativa do crescimento da planta, independente da complexidade que envolve o seu crescimento, é um dos meios mais eficazes para avaliar o crescimento e o desenvolvimento vegetal (PEIXOTO, CRUZ e PEIXOTO, 2011).

Uma diversidade de fatores ambientais podem causar modificações nas características estruturais e funcionais das folhas, acarretando alterações no padrão de crescimento e produção das plantas, processo de plasticidade morfofisiológica para adaptação e resposta da planta (BJÖRKMAN, 1981).

Silva, Rodrigues e Costa, (1988) observaram que a disposição dos tecidos constituintes do mesofilo, parênquimas paliçádico e lacunoso não foi modificada pela radiação disponível resultante do sistema de cultivo utilizado em plantas de café (*Coffea arabica* L.), no entanto, as espessuras desses tecidos e da lâmina foliar sofreram um aumento na presença de níveis mais altos de radiação do que sob sombreamento, relatando a influência que o ambiente tem sobre o crescimento do feijoeiro. Já Alves, Tresmondi e Longui (2008) encontraram uma redução na espessura do mesofilo de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) em meio urbano quando comparado ao ambiente rural, indicando uma estratégia adaptativa ao ambiente que apresenta grandes concentrações de gases tóxicos.

No entanto não existe na literatura até o presente trabalho nenhuma análise quantitativa da espessura do mesofilo e epiderme da lâmina foliar em feijoeiros tratados com *Trichoderma* spp., fator biótico que segundo Santos, Mello e Peixoto (2010) age como indutor de crescimento de plantas.

A correlação área foliar e espessura do mesofilo no estágio V4 levou a um aumento no volume foliar mostrando uma relação direta de crescimento foliar e não apenas uma compensação pelo desenvolvimento do feijoeiro numa relação inversa entre área foliar e espessura do mesofilo. Porém, essa mesma correlação não foi observada para os demais estágios analisados.

A folha, por ser um órgão primário de síntese, é o que apresenta maior plasticidade e o que mais responde, estruturalmente, às variações impostas pelo meio (SMITH *et al.*, 1997). Sendo assim, a vantagem do mesofilo mais espesso em folhas de maior área foliar é com relação a uma maior fixação de CO₂ pela planta (GIVNISH, 1988; KLICH, 2000). A adaptação morfológica principalmente na relação área foliar/espessura propicia a permanência de um balanço positivo de carbono em diferentes condições ambientais encontradas e isto é a característica fundamental para a ocupação com sucesso em habitats diversificados (SPENCER e TEERI, 1994). A espessura do mesofilo provavelmente contribui para o desenvolvimento da planta devido ao parênquima clorofiliano permitir através do parênquima paliçádico a passagem direta da luz e do parênquima lacunoso servir para a dispersão luminosa, o que determina uma absorção luminosa mais uniforme através da folha, melhorando a fotossíntese consequentemente (TAIZ e ZEIGER, 2009).

Todas as espécies de *Trichoderma* testadas neste trabalho promoveram um aumento relativo em pelo menos uma das variáveis avaliadas, exceto na espessura da epiderme adaxial e abaxial da lâmina foliolar.

A análise de crescimento é baseada no fato de que aproximadamente 90% da matéria seca acumulada pelas plantas ao longo do seu crescimento é resultante da atividade fotossintética (POPOV *et al.*, 2003). Considerando o trabalho de Popov *et al.* (2003) e os dados obtidos no presente estudo, observou-se que há uma correlação proporcional e positiva entre os parâmetros analisados (Tabela 8) sugerindo que o tratamento do *Phaseolus vulgaris* L. com *Trichoderma* spp. pode contribuir com um melhor desenvolvimento dos mesmos. Contudo, apesar de ter sido encontrada uma correlação positiva na fase vegetativa no estágio V4 entre área foliar e espessura do mesofilo, não foi encontrada correlação entre esses parâmetros nos demais estágios analisados.

De acordo com os resultados do presente trabalho, o *Trichoderma* spp. foi capaz de induzir o aumento do volume e do comprimento da raiz, auxiliando na absorção de nutrientes. Além disso, foi mostrada uma provável influência de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento do crescimento secundário do cilindro vascular, em um maior número de indivíduos no estágio V4 (Figura 15) nas plantas tratadas com estes microrganismos, resultando no aumento do diâmetro da raiz. Segundo Gemell (1981), a iniciação e o desenvolvimento de tecidos secundários provavelmente são controlados por fitormônios como a auxina e as citocinas translocadas para a raiz, já Nilsson *et al.* (2008) supõem que a auxina é um fator essencial que regula a formação de tecidos secundários contribuindo para a formação de xilema secundário.

A ideia defendida no presente trabalho, de que *Trichoderma* spp. influencia no desenvolvimento de estrutura secundária acelerando o desenvolvimento da planta é reforçada pelo registro de relatos na literatura (HOYOS-CARVAJA, ORDUZ e BISSETT, 2009) de que o *Trichoderma* spp. produz análogos de AIA.

Considerando a estrutura anatômica da raiz analisada no estágio R5 (Figura 16) sugere-se que *Trichoderma* spp. acelera processos de desenvolvimento de estrutura secundária no cilindro vascular e, principalmente, o xilema secundário cujas células possuem paredes lignificadas.

A lignina confere suporte mecânico às plantas e por ser hidrofóbica contribui para evitar a perda de água, além de apresentar importante função de defesa contra patógenos e outras formas de estresses, favorecendo de maneira indireta o crescimento das plantas (MONTIES, 1989; JUNG, BUXTON e HATFIELD, 1996).

8. CONCLUSÃO

As pesquisas com *Trichoderma* spp. como agente de controle de doenças em vegetais estão mais avançadas quando comparadas ao seu uso como indutor de crescimento. A soma de novas pesquisas que permitam entender melhor como o *Trichoderma* spp. contribui para o crescimento e desenvolvimento de plantas podem colaborar para o seu uso como bioproduto de maneira segura e mais eficiente no campo. Sendo o feijão comum um dos alimentos mais comuns e nutritivos do Brasil e de grande importância econômica, o seu cultivo é bastante difundido, colocando-o entre um dos maiores produtores de feijão comum do mundo.

Dentro desse contexto, o trabalho aqui desenvolvido buscou evidências para aumentar a credibilidade do *Trichoderma* spp. como indutor de crescimento em cultivos de feijão. Foi observado, que cada isolado de *Trichoderma* analisado apresentou resposta satisfatória ao crescimento do feijoeiro. Em relação aos parâmetros analisados: área foliar, volume e comprimento da raiz, massa seca da planta, espessura da epiderme e do mesofilo, houve diferentes respostas significativas dependendo do isolado e do estágio de desenvolvimento da planta analisado quando comparado às plantas não tratadas com *Trichoderma* spp.

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Verificar se os isolados de *T. harzianum* T22, ALL42 e *T. asperellum* T34 produzem AIA;
- Verificar a disponibilidade de fósforo na raiz das plantas tratadas com *Trichoderma* spp.;
- Analisar outros parâmetros anatômicos quantitativos da lâmina foliolar em plantas tratadas com *Trichoderma* spp.: densidade estomática e de tricomas, índice estomático, medidas do diâmetro polar e equatorial dos estômatos e espessura dos parênquimas paliádico e lacunoso;
- Medir a taxa de clorofila nas folhas de plantas tratadas com *Trichoderma* spp.;
- Analisar se há aumento na lignificação de raízes nos últimos estágios de desenvolvimento do feijoeiro em plantas tratadas com *Trichoderma* spp.

10. REFERÊNCIAS

AFRICA TERVUREN. Prelude Medicinal Plants Database. **Royal Museum For Central Africa**. 20--. Disponível em: <http://www.africamuseum.be/collections/external/prelude/view_plant?pi=09910>. Acesso em 17 de Jan. de 2014.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4ª ed. Academia Press: San Diego, 635 p. 1997.

AKRAMI, M.; GOLZARY, H.; AHMADZADEH, M. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. **African Journal of Biotechnology**. Victoria Island, v.10, p. 2653- 2658. 2011.

ALMEIDA, J. E. M.; BATISTA FILHO, A.; ALVES, S. B.; LEITE, L. G.; NEVES, P. M. O. J. Formulação de entomopatógenos na América Latina. *In*: ALVES, S. B.; LOPES, R. B. (Org.). **Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios**. Piracicaba-SP: FEALQ, v. 14, p. 257-277. 2008.

ALMEIDA, L. D.; LEITÃO FILHO, H. F.; MIYASAKA, S. Característica do feijão carioca no cultivar: um novo cultivar. **Bragantia**, v. 30, p. 33-38, 1971.

ALVES, E. S.; TRESMONDI, F.; LONGUI, E. L. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (*Myrtaceae*) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 22, p. 241-248. 2008.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBUQUERQUE, C.; INACIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Fiocruz Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro - RJ, v. 12, nº 1, p. 61-72. 2007.

ARORA, D. K., ELANDER, R. P.; MUKERJI, K. G. (Eds) **Handbook of applied mycology**. Volume 4: Fungal Biotechnology, New York: Marcel Dekker. 1992.

ASADUZZAMAN, M.; ALAM, M. J.; ISLAM, M. M. Effect of *Trichoderma* on seed germination and seedling parameters of chili. **Journal of Science Foundation**, v. 8, nº 1-2, p. 141-150. 2010.

BAE, H.; SICHER, R. C.; KIM, M. S.; KIM, S-H.; STREM, M. D.; MELNICK, R. L.; BAILEY, B. A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**. Lancaster, UK, v. 60, p. 3279–3295. 2009.

BAILEY, B. A.; LUMSDEN, R. D. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to plant pathogens. *Trichoderma and Gliocladium*. **Enzymes, biological**

control and commercial applications. London: Taylor & Francis Harman GE, Kubicek CP, v.2, p. 185-204. 1998.

BAKER, K. F.; COOK, R. J. **Biological Control of Plant Pathogens.** San Francisco: W. H. Freeman, 433 p. 1974.

BASSINELLO, P. Z. **Qualidade dos grãos.** Brasília: Embrapa Arroz e Feijão, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia4/AG01/arvore/AG01_2_28102004161635.html>. Acesso em: 20 de Dez. de 2012.

BENÍTEZ, T., RINCÓN, M. A., LIMÓN, M. C. E CODON, C. A. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International microbiology**, v. 7, p. 249-260. 2004.

BETTIOL, W. Biopesticides use and research in Brazil. **Outlooks on Pest Management.** p. 280-283. 2011.

BETTIOL, W. Conversão de sistemas de produção. *In*: POLTRONIERI, L.S. & ISHIDA, A.K.N. (Eds.) **Métodos Alternativos de Controle de Insetos-Praga, Doenças e Plantas Daninhas:** Panorama atual e perspectivas. Belém: Embrapa Amazônia Oriental. p. 289-308. 2008.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil. *In*: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Org.). **Biocontrole de Doenças de Plantas:** uso e perspectivas. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, p.7-14. 2009.

BICALHO, I. **A cultura da feijão.** 2013. foto. color. Formato Jpeg. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAA9IIAE/a-cultura-feijao>>. Acesso em: 17 de Jan. de 2014.

BJÖRKMAN, O. Responses to different quantum flux densities. *In*: LANGE, O. L.; NOBEL P. S.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. **Encyclopedia of plant physiology.** Berlin: Springer-Verlag, New Series, v.12A, p. 57-107. 1981.

BLEECKE, R. A. B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 1-18. 2000.

BORÉM, A.; CARNEIRO, J. E. S. A cultura. *In*: VIEIRA, C.; PAULA JR., T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão.** 2º ed. Viçosa: Editora UFV, p. 13-18. 2006.

BRAY, C. M. Biochemical processes during the osmopriming of seeds. *In*: KIEGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination.** New York: Marcel Dekker, p.767-789. 1995.

BROTMAN, Y.; GUPTA, J. K.; VITERBO, A. *Trichoderma.* **Current Biology**, v. 20, p. 390-

391. 2010.

BROTMAN, Y.; LANDAU, U.; CUADROS-INOSTROZA, A.; TAKAYUKI, T; FERNIE, A. R.; CHET, I.; VITERBO, A.; WILLMITZER, L. *Trichoderma*-Plant Root Colonization: Escaping Early Plant Defense Responses and Activation of the Antioxidant Machinery for Saline Stress Tolerance. **PLOS Pathogens**, v. 9, nº 3. 2013. Disponível em: <<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1003221>>. Acesso em: 12 de Dez. de 2013.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologist**, Rockeville. 1367p. 2000.

BULISANI, E. A.; ALMEIDA, L. D'A. de; ROSTON, A. J. A cultura do feijoeiro no Estado de São Paulo. In: BULISANI, E. A. **Feijão**: fatores de produção e qualidade. Campinas: Fundação Cargill, p. 29- 88. 1987.

CALHEIROS, D. F.; OLIVEIRA, M. D.; DOLORES, E. F. G. *et al.* Poluição por pesticidas, nutrientes e materiais em suspensão nos rios formadores do Pantanal Matogrossense. Embrapa Pantanal. **Embrapa**, Corumbá, MS, 4p. adm., nº. 096. 2006. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM096.pdf>>. Acesso em 02 de Jan. de 2013.

CALVACHE, M.; REICHARDT, K. Water deficit imposed by partial irrigation at different growth stages for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: IAEA TECDOC 888, **Nuclear Techniques to Assess Irrigation Schedules for Field Crop**. p. 63-72. 1996.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle de fitopatógenos**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 165p. 2003.

CANTÃO, F. R. O. **Marcadores morfológicos de raiz em genótipos de milho contrastantes para tolerância à seca em resposta a estresses de fósforo e alumínio**. Lavras: UFL. 98p. 2007. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) pela Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG. 2007.

CARVALHO FILHO, M. R. T.; MENÉZES, J. E.; MELLO, S. C. M.; SANTOS, R. P. dos. **Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do Eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos**. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2008.

CARVALHO, T. C; SILVA S. S. DA; SILVA, R. C. DA, PANOBIANCO, M. E MÓGOR, A. F. Influência de bioestimulantes na germinação e desenvolvimento de plântulas de *Phaseolus vulgaris* sob restrição hídrica. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 36, nº.2, Abr. 2013.

CASCUDO, C. L. **História da alimentação no Brasil**: pesquisa e notas. Belo Horizonte: Itatiaia, 1983.

CHACÓN, M. R. RODRIGUEZ-GALÁN, O.; BENÍTEZ, T.; SOUSA, S. REY, M.; LLOBELL, A. DELGADO-JARANA, J. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. **International Microbiology**, v. 10, p. 19-27. 2007.

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

CONAB. Safra 2013/2014: Primeiro Levantamento/Intenção de plantio **Acompanhamento da safra brasileira**: grãos. 68 p. Out. de 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_08_12_38_56_boletim_portugues_outubro_2013.pdf>. Acesso em: 17 de Jan. de 2014.

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

CORRÊA, B. O., MOURA, A. B., DENARDIN, N. D., SOARES, V. N., SCHÄFER, J. T., LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, p. 156-163. 2008.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action**. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publ., p. 7-90. 2004. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=6yJTLhukED8C&oi=fnd&pg=PR11&dq=Plant+Hormones.+Biosynthesis,+Signal+Transduction,+Action&ots=YA19HuVgXP&sig=Gv2XGJ6rGvqA7OsWU2vQEmptb9c#v=onepage&q=Plant%20Hormones.%20Biosynthesis%2C%20Signal%20Transduction%2C%20Action&f=false>>. Acesso em: 01 de Dez. de 2013.

DIDONET, A. D.; COSTA, G. C. População de plantas e rendimento de grãos em feijoeiro comum de ciclo precoce. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, nº. 2, p. 105-109. 2004.

DJONOVIC, S.; POZO, M. J.; DANGOTT, L. J.; HOWELL, C. R.; KENERLEY, C. M. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular Plant Microbe Interact.** v. 19, p. 838–853. 2006.

DRUZHININA, I.; KOPTCHINSKI, A.; KOMON, M.; BISSETT, J.; SZAKACS, G.; KUBICEK, C. P. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 42, p. 813-828. 2005.

DRUZHININA I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**. v. 16, nº 9 e 10, p. 749-759. Sep. 2011.

EMBRAPA. **Feijão pérola é mais resistente e tem alta produtividade**. Brasília –DF: Embrapa, nov. 2004. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/1996/julho/bn.2004-11-25.6708888229/>>. Acesso em 25 de Abr. de 2013.

EMBRAPA. Feijão Pérola. 1994. In: **CATI**. São Paulo. 2013. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/Cati/_produtos/SementesMudas/cultivares/FEIJAO-PEROLA.pdf>. Acesso em: 17 de Jan. de 2014.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, v. 35, n.º. 4, p. 961-965. 2005.

FAO - Food and Agriculture Organization. **Statistic/FAOSTAT**. 2010 Disponível em: <<https://www.fao.org/download/ps200910.pdf>>. Acesso em: 27 de Mar. De 2013.

FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. Etapas de desarrollo en la planta de frijol. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHOONHOVEN, A. VAN (Ed.) **Frijol: investigación y producción**. Cali: CIAT, p.61-78. 1985.

FILHO, M. R. C.; MELLO, S. C. M. de; SANTOS, R. P. dos; MENÊZES, J. E. Avaliação de isolados de *Trichoderma* na promoção de crescimento, produção de ácido indolacético *in vitro* e colonização endofítica de mudas de eucalipto. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento 226**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008.

GARCÍA-GARRIDO, J. M.; OCAMPO, J. A. Regulation of the plant defence response in arbuscular *mycorrhizal* symbiosis. **Journal of experimental Botany**, n.º 373, p. 1377-1386. 2002.

GEIL, P. B.; ANDERSON, J. W. Nutrition and health implications of dry beans: a review. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v.13, n.º.6, p.549-558. 1994.

GEMMELL, A. R. **Anatomia do vegetal em desenvolvimento**. São Paulo: USP. 1981.

GERALDINE, A. M.; PEREIRA FILHO, C. R.; LOBO Jr. M. Sobrevivência de esporos de *Trichoderma* spp. na superfície foliar de Feijoeiro comum após exposição à radiação solar. Goiânia: UFG. In: Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão, Embrapa. **Anais...** Out. 2011.

GIVNISH, T. J. Comparative studies of leaf form: assessing the relative roles of selective pressures and phylogenetic constraints. **New Phytologist**. v. 106 (suppl.), p. 131-160. 1988.

GOMES, J. M; PAIVA, H. N. de. **Viveiros florestais: propagação sexuada**. 3ª ed., Viçosa: UFV, 116 p. 2004.

GÓMEZ, I.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. **Molecular and General Genetics**, v.

256, p.127-135, 1997.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants. **European Journal of Plant Pathology**, Oxford, v.119, p.457-462, 2007a.

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

GRIME, J. P.; HUNT, R. Relative growth-rate: its range and adaptive significance in local flora. **Ecology**, v. 63, n° 2, p. 393-422. 1975.

HANSON, L. E.; HOWELL, C. R. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. **Phytopathology**, v. 94, p.171-176. 2004.

HARMAN, G. E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T 22. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, p. 377-393. 2000.

HARMAN, G. E.; HERRERA-ESTRELLA, A. H.; HORWITZ, B. A.; LORITO, M. Special issue: *Trichoderma*. **Basic Biology to Biotechnology and Microbiology**. v. 158, p. 1-2. 2012.

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

HARMAN, G. E.; TAYLOR, A. G. Development of an effective biological seed treatment system. In: HORNBY, D. (Ed). Biological Control of Soil-borne. **Plant Pathology**, Melksham: Redwood Press. p. 415-426. 1990.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Journal of Microbiology**. São Paulo, n° 158, p. 17–25. 2012.

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

HOYOS-CARVAJA, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. D. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, n° 3, p. 409-416. 2009.

INBAR, J.; ABRAMSKY, M.; COHEN, D.; CHET, I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings growth under commercial conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 100, p. 337- 346. 1994.

JOENIARTI, E.; MATUZAHROH, N.; KUSRININGRUM. Tolerance of *Trichoderma asperellum* Isolates to Chemical Fungicide and Their Antagonistic Activity against *Phytophthora infestans*. **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 3, n° 1, p. 36-46. 2013.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill. 523p. 1940.

JUNG, H. G.; BUXTON, D.; HATFIELD, R. Improving forage fiber digestibility. **Feed Mix**, v. 4, p. 30-34. 1996.

JURIK, T. W. Temporal and spatial patterns of specific leaf weight in successional northern hardwood tree species. **American Journal of Botany**, v. 73, p. 1083-1092. 1986.

KERSHAW, M. J.; TALBOT, N. J. Hydrophobins and repelants: proteins with fundamental roles in fungal morfogenesis. **Fungal genetics Biology**. n° 23, p. 8-33. 1998.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma*: plant interaction and its effects on increased growth response. **Plant Soil**, v. 144, n° 2, p. 267-272. 1992.

KLICH, M. R. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Enviromental and Experimental Botany**, v. 44, p. 171-183. 2000.

KOROLEV, N.; RAV-DAVID, D.; ELAD, Y. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Biocontrol**. v. 53, p. 667-683. 2008.

KUBICEK, C. P.; MACH, R. L.; PETERBAUER, C. K.; LORITO, M. *Trichoderma*: From genes to biocontrol. **Journal of Plant Pathology**, v. 83, n° 2, p. 11-23. 2001.

LEON, J. **Fundamentos botânicos de los cultivos tropicales**. San José: IICA, 487 p. 1968.

LEVITT, J. Water stress. p. 25-280. *In: Responses of plants to environmental stresses*. London: Academic Press. 1980.

LI, L.; ZHAO, Y.; MCCAIG, B. C.; WINGERD, B. A.; WANG, J.; WHALON, M. E.; PICHERSKY, E.; HOWE, G. A. The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. **The Plant Cell**, v. 16, p. 126-143. 2004.

LI-COR. LI-3100 Support Page. 2011. Disponível em: <http://envsupport.licor.com/index.jsp?m=Discontinued&menu=Area_Meters&spec=LI-3100>. Acesso em: 16 de janeiro de 2014.

LIMA, A. L. **Caracterização morfológica, molecular e bioquímica de *Trichoderma* spp. isoladas de solo do cerrado brasileiro**. Brasília: UNB, 2002. Tese (Doutorado em Fitopatologia) pela Universidade de Brasília. 2002.

LOBO JR., M.; PIMENTA, G.; GONTIJO, G.H. Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma harzianum* em condições de campo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília - DF, v. 31S, p. 362. 2006.

LOPES, R. B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microrganismos no Brasil. *In*: Bettiol, W. e Morandi, M. A. B. (Ed.) - **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 15–28. 2009.

LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, p. 280-287. 2003.

LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. **Annual Reviews Phytopathology** v. 48, p. 395–417. 2010.

LUCCHESI, A. A. Fatores da produção vegetal. *In*: CASTRO, P. R. C.; FERREIRA, S. O.; YAMADA, T. (Eds.). **Ecofisiologia da produção vegetal**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, p. 1-11. 1987.

LUZ, E. W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 149. 1996.

LYNCH, J. M.; LUMSDEN, R. D.; ATKEY, P. T.; OUSLEY, M. A. Prospects for control of *Pythium* damping-off of lettuce with *Trichoderma*, *Gliocladium*, and *Enterobacter* spp. **Biology and Fertility of Soils**. v. 12, p. 95-99. 1991.

MACHADO, R. G.; SÁ, E. L. S. de; DAMASCENO, R. G.; HAHN, L.; ALMEIDA, D.; MORAIS, T.; CAMARGO, F. A. O.; REARTES, D. S. Promoção de crescimento de *Lotus corniculatus* L. e *Avena strigosa* Schreb pela inoculação conjunta de *Trichoderma harzianum* e rizóbio. **Ciência e Natura**, v. 33, nº. 2, p. 111-126. 2011.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 8, p. 121-137. 2000.

McCLENDON, J. H. The relationship between the thickness of deciduous leaves and their maximum photosynthetic rate. **American Journal of Botany**, v. 49, p. 320-322. 1962.

MALAVOLTA, E.; MORAES, M. F.; LAVRES JÚNIOR, J.; MALAVOLTA, M. Micronutrientes e metais pesados - essencialidade e toxidez. Cap.4, p.117-154. *In*: PATERNIANI, E. (Ed.). **Ciência, agricultura e sociedade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 403 p. 2006.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. *In*: MELO, I. S.;

AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna. Embrapa. 1998.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 388 p. 1991.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. **Revisão Anual Patologia de Plantas**. v. 4. p. 261-295. 1996.

MELONI, D. A.; OLIVA, M. A.; MARTINEZ, C. A.; CAMBRAIA, J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**. Paris, v. 49, p. 69-76. 2003.

MENESES, C. H. S. G., LIMA L. H. G. M., LIMA M. M. A., VIDAL M. S. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande. v. 10, nº. 1/2, p. 1039-1072. Ago. 2006.

MENEZES, M.; MACHADO, A. L. M.; SILVEIRA, M. do C. V. da; SILVA, R. L. X. da. Biocontrole de *Macrophomina phaseolina* com espécies de *Trichoderma* aplicadas no tratamento de sementes de feijão e no solo. In: Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica. Recife. **Anais...** v. 1, p. 133-140, 2004.

MONTE, E. Editorial Paper: Understanding Trichoderma: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology. **International Microbiology**, v. 4, p. 1-4. 2001.

MONTIES, B. Molecular structure and biochemical properties of lignins in relation with possible self-organization of lignin networks. **Annales des Sciences Foresti Éres**. v. 46, p. 846-855. 1989.

MURCH, S. J. Neurotransmitters, neuroregulators and neurotoxins in plants. In: BALUSKA, F.; MANCUSO, S.; VOLKMANN, D. (Eds). **Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life**, Berlin: Springer. p. 137–151. 2006.

MASTOURI, F.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**. v. 100, p. 1213–1221. 2010.

NILSSON, J.; KARLBERG, A.; ANTTI, H.; LOPEZ-VERNAZA, M.; MELLEROWICZ, E.; PERROT-RECHENMANN, C.; SANDBERG, R.; BHALERAO, R. P. Dissecting the Molecular Basis of the Regulation of Wood Formation by Auxin in Hybrid Aspen. **The Plant Cell**, v. 20, p. 843–855, April 2008.

NOVAIS, F. R.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: UFV, 399 p. 1999.

OLIVEIRA, S. H. F. Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotecnologia**. v. 2, nº 4, p. 8-13. 2005.

PAPAVIZAS, G. C. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Reviews of Phytopathology** v. 23, p. 23-54. 1985.

PEIXOTO, C. P.; CRUZ T. V. da; PEIXOTO, M. de F. da S. P. Análise quantitativa do crescimento de plantas: Conceitos e Prática. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 7, nº.13, p. 26. 2011.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 62-77. 2002.

PEREIRA, G. V. N. **Promoção do crescimento de mudas de Maracujazeiro inoculadas com *Trichoderma* spp.** Vitória da Conquista, Bahia: UESB. 2012. Dissertação (Mestrado) da Escola de Agronomia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2012. Disponível em: <<http://www.uesb.br/mestradoagronomia/banco-de-dissertacoes/2012/gleice-viviane.pdf>>. Acesso em: 01 de Dez. de 2013.

PILLAY, V. J.; NOWAK, J. Inoculum density, temperature, and genotype effects on *in vitro* growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings inoculated with a *pseudomonad bacterium*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 354-361. 1997.

POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas - uma visão empresarial. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 239-244. 2009.

POPOV, E. G.; TALANOV, A. V.; KURETS, V. K.; DROZDOV, S. N. Effect of temperature on diurnal changes in CO₂ exchange in intact cucumber plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 50, nº 2, p. 178-182. 2003.

PORTES, T. A.; CARVALHO, S. I. C. de; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos fisiológicos das plantas cultivadas e análise de crescimento da *Brachiaria* consorciada com cereais. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. (Ed.). **Integração lavoura-pecuária**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 303-330. 2003.

RAVEN, P. H., EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2001.

RAWAT, L.; SINGH, Y.; SHUKLA, N.; KUMAR, J. Alleviation of the adverse effects of salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) by seed biopriming with salinity tolerant isolates of *Trichoderma harzianum*. **Plant soil**. v. 347, p. 387-400. 2011. Disponível em: <www.nature.com/reviews/micro> . Acesso em: 01 de Abr. De 2013.

REGLINSKI, T.; RODENBURG, N.; TAYLOR, J.T.; NORTHCOTT, G. L.; CHEE, A. AH.; SPIERS, T. M.; HILL R. A. *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. **Forest Pathology**, v. 42, nº 1, p. 75-78. 2012.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer - Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**. v. 61, p. 33-36, 1972.

ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: UFV, 45 p. 1999.

SAITO, L. R. Aspectos dos efeitos do fungo *Trichoderma* spp. no biocontrole de patógenos de culturas agrícolas. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**. Paraná, v. 2, nº. 3, p. 203-213. 2009.

SALAS-MARINA, M. A.; SILVA-FLORES, M. A.; URESTI-RIVERA, E. E.; CASTRO-LONGORIA, E.; HERRERA-ESTRELLA, A.; CASAS-FLORES, S. Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. **European Journal of Plant Pathology**. v. 131, p. 15–26. 2011.

SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido indol-3-butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, nº. 6, p. 966-972. 2010.

SANTOS, J. B.; GAVILANES, M. L. Botânica. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds). **Feijão**. 2ª.ed. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 41-65. 2006.

SARAVANAKUMAR, K.; ARASU, V. S.; KATHIRESAN, K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. **Aquatic Botany**. v. 104, p. 101-105. 2013.

SEAB – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Feijão**: Análise da Conjuntura Agropecuária. Out. de 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/fejiao_2012_13.pdf>. Acesso em: 17 de Jan. de 2014.

SEGARRA, G.; VAN DER ENT, S.; TRILLAS, I.; PIETERSE, C. M. J. MYB72: a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. **Plant Biology**, v. 11, p.90-96. 2009.

SHORESH, M. e HARMAN, G.E. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. **Plant Physiology**, v. 147, nº 4, p. 2147-2163. 2008.

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

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling

Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**. v. 95, p. 76-84. 2005.

SILVA, H. T.; RODRIGUES, J. D.; COSTA, J. G. da. Influência do sombreamento causado pelo milho na anatomia da folha de feijoeiro de diferentes hábitos de crescimento: I. estômatos e tricomas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 23, nº. 12, p. 1387-1400. 1988.

SILVA, V. N. da; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, p. 1609-1618. 2011.

SMITH, W. K.; VOGELMANN, T. C.; DELUCIA, E. H.; BELL, D. T.; SHEPHERD, K. A. Leaf form and Photosynthesis: do leaf structure and orientation interact to regulate internal light and carbon dioxide? **Bioscience**, Washington. 1997.

SOAVE, J.; MOARES, S. A. de. Medidas de controle de doenças transmitidas por sementes. *In*: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. da S. (Ed.) **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 480 p. 1987.

SOUZA, R. F. de; FAQUIN, V.; FERNANDES, L. A.; AVILA, F. W. de. Nutrição fosfatada e rendimento do feijoeiro sob influência da Calagem e adubação orgânica. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 30, nº. 4, p. 656 -664. 2006.

SPENCER, W.; TEERI, J. Acclimation of photosynthetic phenotype to environmental heterogeneity. **Ecology**, v. 75, p. 31-314. 1994.

STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 175, p. 257-263. 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 820 p. 2009.

VEY, A. R.; HOAGLAND, R. E.; BUTT, T. M. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. *In*: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. (ed.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problem and Potential*. **CABI**, Wallingford, p. 311-346. 2001.

VIEIRA, C. **O feijoeiro comum**: cultura, doenças e melhoramento. Viçosa, MG: UFV, 220 p. 1967.

VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Eds). **Feijão**. 2º.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, p. 41-65. 2006.

VIEIRA, E. H. N., RAVA, C. A. **Sementes de feijão**: produção e tecnologia. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 600 p. 2000.

VINALE, F., SIVASITHAMPARAM, K., GHISALBERTI, E. L., MARRA, R., WOO, S. L., LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1-10. 2008.

WANDER, A. E.; GAZZOLA, R.; GAZZOLA, J. RICARDO, T. R.; GARAGORRY, F. L. Características nutricionais, produção e comércio mundial de feijões. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.27, n°.1/3, p.11-28. 2010.

WEINDLING, R. *Trichoderma lignorum* a parasite of other soil fungi. **Phytopathology**, v. 22, p. 837-845. 1932.

WINDHAM, M.T.; ELAD, Y.; BAKER, R. A. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 76, p. 518-521. 1986.

WOO, S.L. SCALA F.; RUOCCO M.; LORITO M. The Molecular Biology of the Interactions between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. **Phytopathology**, v. 96, n° 2, p. 181-185. 2006.

WUTKE, E. B.; BRUNINI, O.; BARBANO, M. T. Estimativa de temperatura base e graus-dia para feijoeiro nas diferentes fases fenológicas. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 55-61. 2000.

YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **The Journal of Experimental Biology** v. 208, p. 2819-2830. 2005.

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas spingae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7343–7353. 2003.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A. K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant Soil**, v. 235, p. 235–242. 2001.

ZILLI, J. E.; NECHET, K. DE L.; VIEIRA, B. de A. H.; VITAL, M. S. **Diversidade de microrganismos do solo com potencial biotecnológico**. Boa Vista-RR: Universidade Federal de Roraima/Embrapa Roraima, 2008.

11. ANEXOS

Induction of growth on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by the beneficial fungi *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum*

Suyá Samara Moreira¹, Murillo Lobo Junior², Maria Helena Rezende¹ and Cirano José Ulhoa^{1*}.

¹*Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74001-970, Brazil.*

²*Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, GO, CEP 75375 -000 Brazil.*

*Corresponding author: ulhoa@ufg.br

Abstract

The present study was carried out to evaluate the effect on anatomic and morphologic aspects of *Phaseolus vulgaris* (common bean) after inoculation with fungus of the genus *Trichoderma*. Morphological parameters as size of the root, root volume, dry mass and leaf area were analyzed, such as anatomical parameters like quantitative analysis of the thickness of the mesophyll and epidermis of the leaf blade, and the alteration of the structural characteristics of the root. The obtained data suggest that changes occurred in the biomass of the dried plant, leaf area, length and volume of the root in most of the analyzed stages. However, in thickness of mesophyll analyses, a significant difference was found only in stages V4 and R7. Among the parameters analyzed, isolates of *T. harzianum* ALL42 and T22 was those who shows a bigger difference when compared with the control.

Keyword: *Trichoderma*; common bean; leaf; root; growth promotion.

1. Introduction

Phaseolus vulgaris L., the common bean, is one of the most ancient cultivated crops in the world. It is of social, economic and dietary importance in many countries, principally in South America, Africa and Asia (Torres et al., 2009). The bean are important in the Brazilian diet to be rich in proteins and iron, low in lipids, sodium, rich in vitamin B complex and minerals foods. Due to its composition beans provides several health benefits is indicated for the prevention of diseases such as heart disorders, obesity and diabetes (Geil and Anderson, 1994). In Brazil, beans are grown by both small farmers, who use low technological level in the production process, as for rural entrepreneurs highly technical in a total area of approximately 4 million hectares with an average yield of 876 kg / ha (IBGE, 2006). However, most of this production is used to attend to the domestic market. To meet the growing demand in Brazil the government has imported beans mainly from Argentina and China. The Brazilian Ministry of Agriculture (CONAB, 2012) estimated for 2011/12 a dry bean production of 3.14 million tons, with each hectare of planted soil yielding 855 Kg. These values are 8% percent lower than those obtained for the previous years (2010/2011). This decrease was mainly due diseases, pests and climatic conditions in some producing regions.

In order to increase productivity levels of the bean in Brazil, new technologies are being developed and tested. In this sense, our research group has previously worked with the isolation, identification and characterization of *Trichoderma* strains isolated from Brazilian Cerrado soil (Almeida et al., 2007; Lopes et al., 2012; Geraldine et al., 2012; Qualhato et al., 2013). *Trichoderma* spp. have been widely studied as a biocontrol agent and are presently marketed as active ingredients of bio-pesticides, biofertilizers, growth enhancers and stimulants of natural resistance (Woo et al., 2013). *Trichoderma* spp. are rhizosphere-competent, being able to colonize and grow in association with plant shoots and roots as previously described for cucumber, cotton, maize, tomato, pepper, lettuce, bean and other plants (Vinale et al., 2006). Plant growth enhancement by *Trichoderma* strains is as a result of different mechanisms such as exudation of plant growth regulators, solubilization of phosphates, availability of micronutrient and minerals such as iron, manganese and magnesium, and production of other metabolites that have important role in plant growth (Harman et al., 2012). The purpose of current experiment was to determine the effects of *Trichoderma harzianum* (T22 and ALL42) and *Trichoderma asperellum* (T34) on growth of beans (*P. vulgaris* L.) under greenhouse conditions. Dry weight, root volume, root length and leaf area of the plants and some morphological changes on beans plants were investigated.

2. Materials and methods

2.1 Fungal preparation

The samples of *Trichoderma harzianum* (AL42 and T22) and *Trichoderma asperellum* (T34) belong to the EMBRAPA-CNPAF culture collection. The *Trichoderma* species used in this study were isolated from different agroecosystems of the Brazilian Cerrado, growing mainly on common beans (Lopes et al. 2012; Geraldine et al., 2013). The microorganisms were maintained on potato dextrose agar (PDA) plates at 28° C prior to use in the experimental procedures.

The isolates were cultured in 250 ml Erlenmeyer flasks containing previously autoclaved (121° C, 40 min) parboiled rice (15 g per flask). The vials were kept in a BOD incubator at 25° C with a 12-h photoperiod for seven days, to stimulate profuse sporulation. Subsequently, the colonized rice was carefully washed with autoclaved distilled water to obtain a suspension of conidia. Conidial densities in the suspension were determined by use of a hemacytometer under a light microscope.

2.2 Experimental conditions

Beans grains were surface sterilized by immersing in 70 % ethanol for 2 min, washed several times with sterile distilled water and dried with paper towels. The seeds were then soaked in 50 ml of a suspension (10^7 conidia ml⁻¹) of each of the *Trichoderma* strains (ALL42, T22 and T34) and incubated 30 min. Control seeds were soaked in an equal volume of distilled water. Treated and untreated control seeds were directly sown into towers of PVC (25 cm in diameter X 60 cm long) filled with vermiculite. The towers were placed on a bench in greenhouse. All tests were repeated once and included three replicates per treatment. The effects of *Trichoderma* strains on the growth of beans seedlings were evaluated after 32 days (R5 stage) from sowing. Six beans seedlings from each treatment were removed from towers and planting mix was gently washed off of the root system.

To determine the unit leaf area meter Area Meter Model LI - 3100 was used. Shoots and roots were dried 43° C for four days to obtain dry weight determinations. Morphological analysis of the root system, were performed via WinRhizo Pro 2007 system (Regent Instr. Inc.) coupled to a professional scanner Epson 10000 XL.

2.3 Statistical analysis

The treatments were arranged in a randomized complete block design with six seedling plots with three replicates of each treatment. Data were statistically analyzed using F-test (5%) and Scott-Knott test (5%).

3. Results and discussion

Table 1. Dry mass of plants (g) of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to treatments. Means followed by the same letter within the same column do not differ at 5% significance level by the Scott-Knott test.

	Dry mass of plants (g)				
	V2	V4	R5	R7	R8
Control	0,16 b	0,71 c	1,92 c	7,00a	13,22 a
T22	0,25 ab	1,18 ab	2,59 b	9,03a	9,80 ab
ALL42	0,26 a	1,30 a	3,59 a	6,92a	14,21 a
T34	0,26 a	1,04 b	2,72 b	7,88a	5,21 b
Mean	0,23	1,06	2,70	7,71	10,61
CV%	13,67	8,15	8,26	29,32	24,23

Control: untreated bean plants. T22: T. harzianum; ALL42: T. harzianum; T34: T. asperellum. Stages of development: V2: the stage where the first leaves appear; V4: the stage where the third trifoliolate leaf appears; R5: Pre-flowering stage; R8: Filling of the pods, R9: Maturation.

Beans are grown in different soil types, but is sensitive to various biotic and abiotic factors that may limit the development and production of dry beans (Santos and Gavilanes, 2006; Vieira and Borém, 2006). The association of *Trichoderma* spp. and common bean reflects the importance of the symbiosis between plants and microorganisms, which was observed naturally in the ecosystem and that instigates studies in order to improve the development and growth of the plants. In this study we observed that beans plants treated with *Trichoderma* spp. showed an increase in the final dry mass in most stages analyzed (Table 1). The best results were found with samples treated with *T. harzianum* ALL42 where observed an increase of 86 % (stage R5) when compared to the control. According to Gomes and Paiva (2004), the dry weight of shoots

indicates the vigor of the plant and dry mass of roots determines the ability of plants to survive and initial growth in the field. Bae et al. (2009) demonstrate that colonization of seedlings of cocoa (*Theobroma cacao* L.) by *T. hamatum* caused an increase in root and its fresh and dry weight.

Table 2. Root Volume (cm³) of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to the treatments. Means followed by the same letter within the same column do not differ at 5% significance level by the Scott-Knott test.

	Root Volume (cm ³)				
	V2	V4	R5	R7	R8
Control	0,077 b	0,541 b	0,972 bc	2,470a	2,790 ab
T22	0,132 a	1,062 a	1,715 a	2,000a	3,290 ab
ALL42	0,092 b	1,048 a	1,558 ab	2,560a	3,590 a
T34	0,066 b	0,641 b	0,860 c	2,280a	2,390 b
Mean	0,092	0,823	1,276	2,330	2,018
CV%	15,360	12,740	17,930	10,980	19,360

Control: untreated bean plants. *T22:* *T. harzianum*; *ALL42:* *T. harzianum*; *T34:* *T. asperellum*. Stages of development: *V2:* the stage where the first leaves appear; *V4:* the stage where the third trifoliolate leaf appears; *R5:* Pre-flowering stage; *R8:* Filling of the pods, *R9:* Maturation.

As seen in Table 2, beans plants treated with *Trichoderma* spp. showed an increase in root volumes in most stages analyzed mainly those treated with isolates of *T. harzianum* T22. For example, in the V4 stage an increase of 96 % was observed when compared with the control. A similar results were observed by Harman (2000) with the isolated of *T. harzianum* T22 that promotes an increase in root length and volume in soybean (*Glycine max*), tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and corn (*Zea mays*). Chacón et al. (2007) showed that tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) inoculated with *T. harzianum*, had their root system colonized by the fungus, resulting in increased proliferation of roots and consequent increase in fresh weight and air by leaf. *Trichoderma* spp. cause changes in root architecture by increasing the surface area consequently altering the physiology of the plant, resulting in many benefits, such as resistance to stress water, nitrogen fertilizer uptake, resistance to pathogens and efficiency photosynthetic.

Table 3. Root length (cm) of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to treatments. Means followed by the same letter within the same column do not differ at 5% significance level by the Scott-Knott test.

	Root length (cm)				
	V2	V4	R5	R7	R8
Controle	118,22 b	526,62 b	1088,60 b	922,20 c	1791,30a
T22	178,86 a	1091,67 a	1469,30 ab	1757,60 ab	1512,10a
ALL42	129,87 ab	1067,87 a	1641,60 a	1238,70 bc	1999,90a
T34	113,17 b	701,46 b	948,10 b	1833,10 a	1527,30a
Mean	139,05	846,90	1286,91	1437,87	1707,63
CV%	17,61	13,16	14,97	14,21	18,31

Control: untreated bean plants. T22: T. harzianum; ALL42: T. harzianum; T34: T. asperellum. Stages of development: V2: the stage where the first leaves appear; V4: the stage where the third trifoliolate leaf appears; R5: Pre-flowering stage; R8: Filling of the pods, R9: Maturation.

Table 4. Leaf area (cm) of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to treatments. Means followed by the same letter within the same column do not differ at 5% significance level by the Scott-Knott test.

	Leaf area (cm)				
	V2	V4	R5	R7	R8
Control	52,31a	192,31 b	421,23 c	1463,11 b	1052,09 b
T22	68,15a	322,94 a	628,73 ab	2074,06 a	1271,53 ab
ALL42	57,10a	328,42 a	681,98 a	1332,92 b	1527,90 a
T34	61,52a	375,87 a	530,45 bc	1454,50 b	566,48 c
Mean	59,77	304,88	565,60	1458,23	1105,25
CV%	11,32	9,34	8,48	33,92	11,19

Control: untreated bean plants. T22: T. harzianum; ALL42: T. harzianum; T34: T. asperellum. Stages of development: V2: the stage where the first leaves appear; V4: the stage where the third trifoliolate leaf appears; R5: Pre-flowering stage; R8: Filling of the pods, R9: Maturation.

The results reported in Table 3 describe significant differences in root length of bean plants treated with *Trichoderma* spp. in most stages analyzed. According with Saravanakumar et

al. (2013), *T. harzianum* is capable of promoting the growth of gray mangrove (*Avicennia marina*) by increasing the root length, due to their ability to solubilize nutrients such as phosphorus. The results obtained in this study corroborate the data obtained by different authors, since the values described in Table 4 showed that there was significant difference in leaf area in bean plants treated with *Trichoderma* spp. in most stages analyzed, especially in the stage R5, R7 and R8 treated with *T. harzianum*. The leaf area of a plant is known to be indicative of plant development, since the photosynthetic process depends on the capture of light energy and its conversion into chemical energy (Portes et al., 2003). Inbar et al. (1994) working with the isolate of *T. harzianum* T203, realized that there was a 96% increase in leaf area of cucumber seedlings grown in treated substrate, consistent with the results of this work. Carvalho Filho et al. (2008), working with *Trichoderma* spp. as growth promoter in seedlings of eucalyptus noticed a growth shoots inoculation with isolates of *T. harzianum*, including leaf area. In the same study, it was observed that isolates of these genus has the potential to control the fungus *Cylindrocladium*, with the indirect effect of interference on plant growth. Yedidia et al. (2001) found that cucumber plants treated with *T. harzianum* showed a significant increase in leaf area, compared to control. Work performed by Kleifeld and Chet (1992) with application of *Trichoderma* spp. showed significant increases in the percentage of germination, leaf area and the dry weight of plants.

Table 5. Thickness of the adaxial epidermis (mM) cross-section of the leaflet blade of *Phaseolus vulgaris* L. in relation to treatments. Means followed by the same letter within the same column do not differ at 5% significance level by the Scott-Knott test.

	Thickness of the adaxial epidermis (μm)				
	V2	V4	R5	R7	R8
Control	41,57a	39,59a	41,32a	39,08a	42,39a
T22	41,45a	38,94a	39,45a	38,25a	41,36a
ALL42	42,53a	39,86a	39,39a	40,74a	39,35a
T34	41,61a	38,43a	39,53a	39,32a	41,03a
Mean	41,79	39,2	39,92	39,35	41,03
CV%	3,89	4,84	2,7	4,43	2,46

Control: untreated bean plants. T22: *T. harzianum*; ALL42: *T. harzianum*; T34: *T. asperellum*. Stages of development: V2: the stage where the first leaves appear; V4: the stage where the third trifoliolate leaf appears; R5: Pre-flowering stage; R8: Filling of the pods, R9: Maturation.

Table 6. Thickness of the abaxial epidermis (μm) cross-section of the leaflet blade *Phaseolus vulgaris* L. in relation with treatments. Means followed by the same letter within the same column do not differ at 5% significance level by the Scott-Knott test

Thickness of the abaxial epidermis (μm)					
	V2	V4	R5	R7	R8
Control	39,42a	38,94a	39,73a	39,74a	39,98a
T22	39,46a	39,60a	42,58a	39,59a	40,87a
ALL42	39,05a	38,43a	39,51a	39,18a	41,56a
T34	39,89a	39,86a	38,86a	39,30a	40,49a
Mean	39,45	40,45	40,17	39,45	40,72
CV%	5,12	4,61	6,39	2,84	4,32

Control: untreated bean plants. T22: T. harzianum; ALL42: T. harzianum; T34: T. asperellum. Stages of development: V2: the stage where the first leaves appear; V4: the stage where the third trifoliolate leaf appears; R5: Pre-flowering stage; R8: Filling of the pods, R9: Maturation.

Table 7. Mesophyll thickness (μm) cross-section of the leaflet blade *Phaseolus vulgaris* L. in relation with treatments. Means followed by the same letter within the same column do not differ at 5% significance level by the Scott-Knott test

Mesophyll thickness (μm)					
	V2	V4	R5	R7	R8
Control	342,48a	256,40 b	369,90a	330,92 b	287,53a
T22	377,77a	374,56 a	353,11a	324,23 ab	281,63a
ALL42	363,28a	334,21 a	325,20a	406,89 a	286,01a
T34	346,38a	351,30 a	346,32a	310,63 b	267,39a
Means	357,47	329,11	348,63	343,17	280,64
CV%	9,14	6,46	11,39	9,76	15,44

Control: untreated bean plants. T22: T. harzianum; ALL42: T. harzianum; T34: T. asperellum. Stages of development: V2: the stage where the first leaves appear; V4: the stage where the third trifoliolate leaf

Regarding the thickness of the adaxial and abaxial epidermis of the leaflet blade no significant difference in treatments were observe (Tables 5 and 6). The thickness of the mesophyll higher values in plants treated with *Trichoderma* spp. stages in V2, V4 and R7, but was only significant at 1% and 5% in V4 in R7 where there was a difference between means. The highest average was presented by *T. harzianum* T22 in V4 showing 46% increase in the thickness of mesophyll compared to control (Table 7). In studies conducted by McClendon (1962) and Jurik (1986) demonstrated that there is a close correlation between photosynthetic capacity and leaf thickness. A variety of environmental factors can cause changes in the structural and functional characteristics of the leaves, causing alterations in the pattern of growth and production plants (Björkman, 1981).

Silva et al., (1988) observed that the arrangement of the constituent tissues of the mesophyll, palisade and spongy parenchyma was not modified by available radiation resulting from the cultivation system used in coffee plants (*Coffea arabica* L.), however, thicknesses of these tissues and leaf blade were increased in the presence of higher levels of radiation than under shade, reporting the influence of environment on the growth of bean plants. Alves et al., found a reduction in the thickness of the mesophyle of leaves of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) in urban areas compared to rural surroundings, indicating an adaptive environment which has high concentrations of toxic gases strategy. However, there is no data in the literature to the present work no quantitative analysis of the thickness of the mesophyll and epidermis of the leaf blade in bean plants treated with *Trichoderma*.

Acknowledgements

This work was funded by FINEP (Research and Projects Financing) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and The State of Goiás Research Foundation (FAPEGO).

References

- Almeida FB, Cerqueira FM, Silva RN, Ulhoa CJ. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnol Lett* 2007; 29: 1189-1193.
- Alves ES, Tresmondi F, Longui EL. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. (*Myrtaceae*) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. *Acta Botanica Brasílica*. 2008; 22: 241-248.

- Bae H, Sicher RC, Kim MS, Kim S-H, Strem MD, Melnick RL, Bailey BA. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. *Journal of Experimental Botany* 2009; 60: 3279–3295.
- Björkman O. Responses to different quantum flux densities. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H. *Encyclopedia of plant physiology*. Berlin: Springer-Verlag, New Series 1981; 12A: 57-107.
- Carvalho Filho MRT, Menêzes JE, Mello SCM, Santos RP dos. Avaliação de isolados de *Trichoderma* no controle da mancha foliar do Eucalipto *in vitro* e quanto a esporulação em dois substratos sólidos. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; 2008.
- Chacón MR, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell, A, Delgado-Jarana, J. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology* 2007; 10: 19-27.
- CONAB -Acompanhamento de safra brasileira: grãos, oitavo levantamento. Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab; 2012.
- Geil PB, Anaderson JW. Nutrition and health implications of dry beans: a review. *Journal of the American College of Nutrition*, Clearwater 1994; 13 (6): 549-558.
- Geraldine AM, Lopes FAC, Carvalho DDC, Barbosa ET, Rodrigues AR, Brandão RS, Ulhoa CJ, Junior ML. Cell wall-degrading enzymes and parasitism of sclerotia are key factors on field biocontrol of white mold by *Trichoderma* spp. *Biological Control* 2013; 67: 308-316.
- Gómez I, Chet I, Herrera-Estrella A. Genetic diversity and vegetative compatibility among *Trichoderma harzianum* isolates. *Molecular and General Genetics* 1997; 256: 127-135.
- Harman GE. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T 22. *Plant Disease* 2000; 84: 377-393.
- Harman GE, Herrera-Estrella AH, Horwitz BA, Lorito M. Special issue: *Trichoderma*. *Basic Biology to Biotechnology and Microbiology* 2012; 158: 1-2.
- Inbar J, Abramsky M, Cohen D, Chet I. Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings growth under commercial conditions. *Euro. J. Plant Pathol.* 1994; 100: 337- 346.
- Jurik TW. Temporal and spatial patterns of specific leaf weight in successional northern hardwood tree species. *American Journal of Botany* 1986; 73: 1083-1092.
- Lopes FAC, Steindorff AS, Geraldine AM, Brandão RS, Monteiro VN, Júnior ML, Coelho ASG, Ulhoa CJ, Silva RN. Biochemical and metabolic profiles of *Trichoderma* strains isolated from common bean crops in the Brazilian Cerrado, and potential antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Fungal Biology* 2012; 116: 815-824.
- McClendon JH The relationship between the thickness of deciduous leaves and their maximum photosynthetic rate. *American Journal of Botany* 1962; 49: 320-322.
- Portes TA, Carvalho SIC de, Kluthcouski J. Aspectos fisiológicos das plantas cultivadas e análise de crescimento da *Brachiaria* consorciada com cereais. In: Kluthcouski J, Stone LF, Aidar H. (Ed.). *Integração lavoura-pecuária*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; 2003: 303-330.
- Qualhato TF, Steindorf AS, Brandão RS, Jesuino RSA, Ulhoa CJ. Mycoparasitism studies of *Trichoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters* 2013; 35(9): 1461-1468.

- Santos JB, Gavilanes ML. Botânica. In: Vieira C, Paula Júnior TJ, Borém A. (Eds). Feijão. 2ª.ed. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa; 2006: 41-65.
- Saravanakumar K, Arasu VS, Kathiresan K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. Aquatic Botany 2013; 104: 101-105.
- Silva HT, Rodrigues JD, Costa JG da. Influência do sombreamento causado pelo milho na anatomia da folha de feijoeiro de diferentes hábitos de crescimento: I. estômatos e tricomas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 1988; 23 (12) 1387-1400.
- Torres AR, Cursino L, Muro-Abad JI, Gomes EA, Araujo. EF, Hungria M, Cassini STA. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas gerais, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2009; 40: 852-856.
- Vieira C, Paula Júnior TJ, Borém A. (Eds). Feijão. 2ª.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa; 2006: 41-65.
- Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti EL, Lorito M, Sivasithamparam K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Lett Appl Microbiol. 2006; 43: 143-8.
- Woo SL, Scala F, Ruocco M, Lorito M. The Molecular Biology of the Interactions between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. Phytopathology 2006; 96 (2): 181-185.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas spingae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. Applied Environmental Microbiology 2003; 69: 7343–7353.

14-Mar-2014

Dear Dr. ULHOA:

Your manuscript entitled "Induction of growth on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by the beneficial fungi *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum*" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the *Current Microbiology*.

Your manuscript ID is CMB-14-03-0271.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://mc.manuscriptcentral.com/cm> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/cm>.

Thank you for submitting your manuscript to the *Current Microbiology*.

Sincerely,

Current Microbiology Editorial Office