



JANAÍNA BARROS SIQUEIRA MENDES

***Trichoderma* INCREMENTA O CRESCIMENTO E A
FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO NITROGÊNIO EM PLANTAS
NODULADAS DE FEIJÃO-CAUPI**

**TERESINA – PI
2017**

JANAÍNA BARROS SIQUEIRA MENDES

***Trichoderma* INCREMENTA O CRESCIMENTO E A FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO
NITROGÊNIO EM PLANTAS NODULADAS DE FEIJÃO-CAUPI**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora

Profa. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues

Coorientadora

Profa. Dra. Aurenívia Bonifácio de Lima

**TERESINA – PI
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

M538t Mendes, Janaína Barros Siqueira
Trichoderma incrementa o crescimento e a fixação simbiótica
do nitrogênio em plantas noduladas de feijão-caupi / Janaína
Barros Siqueira - 2017.
71 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Fede-
ral do Piauí, Teresina, 2017.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Artenisa Cerqueira Rodrigues

1. Bactérias diazotróficas 2. Fungos 3. Sinergismo I. Título


CDD 631.52


JANAÍNA BARROS SIQUEIRA MENDES

***Trichoderma* INCREMENTA O CRESCIMENTO E A FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO
NITROGÊNIO EM PLANTAS NODULADAS DE FEIJÃO-CAUPI**

APROVADA em 17 de março de 2017.

Comissão Julgadora:


Prof^ª. Dra. Maria Jaislanny Lacerda e Medeiros Nogueira – CCE/UFPI


Prof. Dr. José Evando Aguiar Beserra Júnior – CCA/UFPI


Prof^ª. Dra. Artenisa Cerqueira Rodrigues – CCA/UFPI
(Orientadora)


Prof^ª. Dra. Aurenívia Bonifácio de Lima – CCN/UFPI
(Coorientadora)

TERESINA – PI
2017

Aos meus filhos Mariana e Lucas, que este trabalho possa servir de motivação e exemplo de que vale sempre a pena investirmos em nossos conhecimentos e em novos desafios.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meus caminhos abençoando minha vida.

Aos meus pais Francisco Siqueira e Ione Eurídice Mendes pelo exemplo e apoio constantes.

Ao meu esposo Jorge Tajra pela motivação e aos nossos filhos Mariana Tajra e Lucas Tajra meus amores, aos meus irmãos, cunhados(as) e sobrinho pela dedicação, torcida, apoio e carinho.

A minha avó Gesília Lobato Rocha que publicou um livro aos 92 anos, me incentivando aos estudos.

As professoras Dra. Artenisa Rodrigues e Dra. Aurenívia Lima, pela orientação, ensinamentos passados e dedicação a esse trabalho.

A Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Agricultura Tropical que me acolheu como aluna e me deu condições de concluir esse mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

Aos professores Dr. Maruzanete Melo e Dra. Solange França que além da amizade me dedicaram atenção e orientação.

Ao corpo docente do PPGA-AT, em especial aos professores: Dr. Ademir Araújo, Dr. Adeodato Salviano, Dr. Aécio Bezerra, Dr. Evando Beserra Júnior, Dr. Jadson Antunes, Dr. Luiz Alfredo Nunes, Dra. Poliana Soares, Dra. Regina Gomes e Dra. Vilma Santos pelos ensinamentos e amizade.

Aos funcionários da pós-graduação, Sr. Vicente Paulo, Allan Sousa, Sr. Luiz Silva, César Silva e Ângela Morais.

A todos os amigos do curso de Pós-graduação em Agronomia – Agricultura Tropical, em especial aos das turmas 2014 e 2015 (Vicente Paulo da Costa Neto, Samara Raquel Sousa, Samia Pinto, Enayra Sousa, João Pedro Aquino, José Monteiro Mota, Nilza Carvalho, Carlos Aydano, Maristella Pessoa, Pedro Guimarães, Laydson Amorim, Luiz Carlos Melo Júnior, Antonio Gomes Neto, Dalya Barros, Mynor García, Rosalba Rodrigues e Glenda Silveira) pelo apoio, horas de estudos, momentos de alegrias vividos.

Aos meus queridos antigos amigos e amigas que sentiram minha falta nesse período, mas sempre me incentivando, em especial Ana Selma, Jany Carvalho,

Joelma Nascimento, Liz Elizabeth Meireles, Cláudia Cesar, Cristiane Lopes, Carlota Soares, Janice Cronemberger e Rosilene Moreira.

Aos novos amigos conquistados, Jéssica Silva, Raquel Veras, Gerusa Santos, Sandra Rocha, Ana Carolina, Ediel Antunes, Abel Borges, Nilvania Maria, obrigada pelo apoio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo; Pablianne Horrana, Daniela Sousa, Hildete Leal, Lanessa Silva, Tulio Giovanni, Kaleby Henrique, Carlos Diego, Raphaella Larissa, Silvia Braz, Bruno Aquino e Claudiana Pereira pela convivência e auxílio na execução dos ensaios.

À JCO Indústria e Comércio de fertilizantes em nome do Dr. Magno Rodrigues pela disponibilidade dos isolados de *Trichoderma* e orientações sempre que recorrente.

A empresa Coca-Cola Brasil Solar^{BR} Grupo de Teresina-PI, pela doação das garrafas utilizadas nos experimentos.

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucreenergético (RIDESA) coordenada pelo Professor Dr. Francisco de Alcântara Neto.

Ao professor Nelson Alencar por ceder o espaço na casa de vegetação para instalação do experimento.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia, Lindomar Uchôa e Manoel Carvalho; do Laboratório de Fitossanidade, Dona Antônia Farias e do Laboratório de Solos Sr. Carlos e Sr. Ted Arrais e ao Leandro de Miranda Santos do Departamento de Graduação em Química por todo apoio na execução dos trabalhos de laboratório.

E a todos que contribuíram para que eu concluísse essa jornada, o meu muito obrigada!

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”

Cora Coralina

“Por mais difíceis que as coisas possam parecer, acredite, são apenas difíceis, não impossíveis”

Autor desconhecido

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Importância econômica do feijão-caupi.....	16
2.2 A fixação biológica do nitrogênio	17
2.3 Aspectos importantes da relação entre rizóbios e leguminosas	18
2.4 <i>Trichoderma</i> : aspectos gerais.....	19
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO I	24
PERFIL METABÓLICO E ENZIMÁTICO DE ISOLADOS DE <i>Trichoderma asperelloides</i> , <i>T. asperellum</i> E <i>T. harzianum</i>	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 Isolados de <i>Trichoderma</i>	27
2.2 Solubilização de fosfato por isolados de <i>Trichoderma</i>	28
2.3 Produção de ácido indol-3-acético (AIA).....	28
2.4 Atividade de enzimas extracelulares.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1 Solubilização de fosfato por isolados de <i>Trichoderma</i>	30
3.2 Produção de ácido indol-3-acético (AIA).....	32
3.3 Atividade das enzimas extracelulares de <i>Trichoderma</i>	33
4 CONCLUSÃO	35
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
CAPÍTULO II	39
CRESCIMENTO E PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI COINOCULADAS COM RIZÓBIO E <i>Trichoderma</i> spp.....	39
RESUMO.....	39
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	42
2.1 Obtenção dos microrganismos e preparo dos inoculantes	42
2.2 Implantação, condução e coleta do experimento.....	43
2.3 Obtenção das variáveis de crescimento	43
2.4 Quantificação dos pigmentos fotossintéticos	44
2.5 Delineamento experimental e análise estatística	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 Variáveis relacionadas ao crescimento vegetativo	45

3.2	Varição dos pigmentos fotossintéticos nas plantas de feijão-caupi	50
4	CONCLUSÕES	53
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	CAPÍTULO III	57
	FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS DE FEIJÃO-CAUPI COINOCULADAS COM <i>Bradyrhizobium</i> E <i>Trichoderma</i>	57
	RESUMO	57
	ABSTRACT	58
1	INTRODUÇÃO	59
2	MATERIAL E MÉTODOS	60
	2.1 Obtenção dos microrganismos e preparo dos inoculantes	60
	2.2 Implantação e condução do experimento	61
	2.3 Determinações	61
	2.4 Delineamento experimental e análise estatística	62
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4	CONCLUSÃO	69
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Concentração do ácido indol-3-acético (AIA) produzido por *Trichoderma asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); *T. asperellum* (UFPI-77) e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92) crescidos em meio de cultura líquido BD com triptofano. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 33

Capítulo II

Figura 1. Taxa de crescimento absoluto (A) e relativo (B) de plantas de feijão-caupi cv. Tumucumaque inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (BR) ou coinoculadas com BR 3267 e *Trichoderma asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92). Na figura, os números indicam o isolado de *Trichoderma* que foi combinado com BR 3267. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunha absoluta (TA). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 45

Figura 2. Comprimento da raiz (A) e diâmetro do caule (B) de plantas de feijão-caupi cv. Tumucumaque inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (BR) ou coinoculadas com BR 3267 e *Trichoderma asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92). Na figura, os números indicam o isolado de *Trichoderma* que foi combinado com BR 3267. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunha absoluta (TA). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 47

Figura 3. Massa seca da parte aérea (A) e da raiz (B) de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (BR) ou coinoculadas com BR 3267 e *Trichoderma asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92). Na figura, os números indicam o isolado de *Trichoderma* que foi combinado com BR 3267. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunha absoluta (TA). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 48

Figura 4. Relação parte aérea/raiz (A) e alocação de biomassa (B) em plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (BR) ou coinoculadas com BR 3267 e *Trichoderma asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92). Na figura, os números indicam o isolado de *Trichoderma* que foi combinado com BR 3267. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunha absoluta (TA). Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Em B, letras minúsculas iguais (em cada partição) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 49

Figura 5. Teor de clorofila *a* (A) e clorofila *b* (B) em plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (BR) ou coinoculadas com BR 3267 e *Trichoderma asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92). Na figura, os números indicam o isolado de *Trichoderma* que foi combinado com BR 3267. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunha absoluta (TA). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 50

Figura 6. Teor de clorofila total (A) e relação clorofila *a/b* (B) em plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (BR) ou coinoculadas com BR 3267 e *Trichoderma asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com

BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92). Na figura, os números indicam o isolado de *Trichoderma* que foi combinado com BR 3267. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunha absoluta (TA). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)..... 51

Figura 7. Teor de carotenoides (A) e antocianinas (B) em plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 (BR) ou coinoculadas com BR 3267 e *Trichoderma asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92). Na figura, os números indicam o isolado de *Trichoderma* que foi combinado com BR 3267. Plantas não inoculadas foram utilizadas como testemunha absoluta (TA). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)..... 52

Capítulo III

Figura 1. Número (A) e massa seca (B) de nódulos de plantas de feijão-caupi cv. Tumucumaque inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 ou coinoculadas com BR 3267 e *T. asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-78). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)..... 65

Figura 2. Nodulação específica (A) e nitrogênio acumulado na parte aérea (B) de plantas de feijão-caupi cv. Tumucumaque inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 ou coinoculadas com BR 3267 e *T. asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77) ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-78). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$). 66

Figura 3. Eficiência agrônômica (A) e simbiótica (B) de plantas de feijão-caupi cv. Tumucumaque inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 ou coinoculadas com BR 3267 e *T. asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77); ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-78). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)..... 67

Figura 4. Eficiência de fixação do nitrogênio de plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 ou coinoculadas com BR 3267 e *T. asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); com BR 3267 e *T. asperellum* (UFPI-77); ou com BR 3267 e *T. harzianum* (UFPI-78). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)..... 68

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Informações gerais sobre os isolados de <i>Trichoderma</i>	28
Tabela 2. Solubilização de fosfato pelos isolados de <i>Trichoderma</i>	31
Tabela 3. Atividade das enzimas extracelulares amilase, celulase, lipase e pectinase de isolados de <i>Trichoderma</i> avaliadas em meio de cultura específico.	34

Capítulo II

Tabela 1. Informações gerais de <i>Trichoderma</i> spp. selecionados.	42
---	----

Capítulo III

Tabela 1. Informações gerais dos <i>Trichoderma</i> spp. selecionados.	60
Tabela 2. Caracterização fisiológica de plantas de feijão-caupi inoculadas com <i>Bradyrhizobium</i> sp. BR 3267 ou coinoculadas com BR 3267 e isolados de <i>Trichoderma asperelloides</i> (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96), <i>T. asperellum</i> (UFPI-77) ou <i>T. harzianum</i> (UFPI-78).	63

RESUMO

A hipótese de que a aplicação de *Trichoderma* incrementa a fixação do nitrogênio (N) pelo *Bradyrhizobium* e, portanto, desenvolvimento do feijão-caupi foi testada neste estudo. Inicialmente, isolados de *T. asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); *T. asperellum* (UFPI-77); e *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92) foram avaliados quanto aos seus perfis metabólicos e enzimáticos e constatou-se que são capazes de solubilizar fosfato, produzir AIA e liberar as enzimas líticas amilase, lipase, celulase, protease e pectinase. No experimento I, o crescimento e teor de pigmentos fotossintéticos de plantas de feijão-caupi cv. Tumucumaque inoculado com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) ou coinoculado com BR 3267 e *Trichoderma* spp. (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-44, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-77, UFPI-78, UFPI-92 ou UFPI-96) foram avaliados. As coinoculações resultaram em dez pares simbióticos. As plantas foram cultivadas em condições axênicas na casa de vegetação e irrigadas com solução nutritiva isenta de N até a coleta (aos 42 dias). Plantas coinoculadas com BR 3267 e UFPI-04, BR 3267 e UFPI-44 ou BR 3267 e UFPI-92 exibiram menor taxa de crescimento absoluto e ausência de nódulos radiculares. Plantas coinoculadas com BR 3267 e UFPI-02 exibiram maior taxa de crescimento relativo e massa seca da parte aérea, enquanto aquelas coinoculadas com BR 3267 e UFPI-78 exibiram incremento no comprimento da raiz, diâmetro do caule, relação parte aérea/raízes e no teor de clorofila total e carotenoides. No experimento II, plantas de feijão-caupi inoculadas com BR 3267 ou coinoculadas com BR 3267 e *Trichoderma* spp. (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-77, UFPI-78 ou UFPI-96) foram avaliadas quanto a eficiência da simbiose e da fixação simbiótica de N. As coinoculações resultaram em sete pares simbióticos. As plantas foram cultivadas nas mesmas condições do experimento I. As plantas coinoculadas com BR 3267 e UFPI-02 exibiram valores superiores de nodulação específica, N acumulado e eficiência simbiótica. A eficiência da fixação de N foi superior nas plantas coinoculadas com BR 3267 e UFPI-02, BR 3267 e UFPI-76 ou BR 3267 e UFPI-96. As plantas de feijão-caupi coinoculadas com rizóbio-*Trichoderma* exibiram melhor desenvolvimento indicando que houve sinergismo entre os microrganismos. Conclui-se que *Trichoderma* incrementa o desenvolvimento e teor de pigmentos fotossintéticos bem como a fixação simbiótica do N em plantas noduladas de feijão-caupi.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas, Fungos, Sinergismo.

ABSTRACT

The hypothesis that the application of *Trichoderma* increases the nitrogen (N) fixation by *Bradyrhizobium*, and therefore, development of cowpea was tested in this study. Initially, isolates of *T. asperelloides* (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-96); *T. asperellum* (UFPI-77); and *T. harzianum* (UFPI-44, UFPI-78, UFPI-92) were evaluated for their metabolic and enzymatic profiles and were found to be able to solubilize phosphate, to produce AIA and to release the lytic enzymes amylase, lipase, cellulase, protease and pectinase. In the experiment I, growth and content of photosynthetic pigments of cowpea plants cv. Tumucumaque inoculated with *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) or coinoculated with BR 3267 and *Trichoderma* spp. (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-04, UFPI-44, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-77, UFPI-78, UFPI-92 or UFPI-96) were evaluated. The coinoculations resulted in ten symbiotic pairs. Plants were cultivated under axenic conditions in greenhouse and irrigated with N-free nutrient solution until collection (at 42 days). Plants coinoculated with BR 3267 and UFPI-04, BR 3267 and UFPI-44 or BR 3267 and UFPI-92 showed lower absolute growth rate and absence of root nodules. Plants coinoculated with BR 3267 and UFPI-02 exhibited higher relative growth rate and shoot dry mass, while those coinoculated with BR 3267 and UFPI-78 showed increase in root length, stem diameter, shoot/root ratio and total chlorophyll content and carotenoids. In the experiment II, cowpea plants inoculated with BR 3267 or coinoculated with BR 3267 and *Trichoderma* spp. (UFPI-01, UFPI-02, UFPI-74, UFPI-76, UFPI-77, UFPI-78 or UFPI-96) were evaluated for efficiency of symbiosis and of the symbiotic N fixation. The coinoculations resulted in seven symbiotic pairs. The plants were grown under the same conditions of the experiment I. Plants coinoculated with BR 3267 and UFPI-02 exhibited higher values of specific nodulation, accumulated N and symbiotic efficiency. The N fixation efficiency was higher in the plants coinoculated with BR 3267 and UFPI-02, BR 3267 and UFPI-76 or BR 3267 and UFPI-96. Cowpea plants coinoculated with rhizobia-*Trichoderma* exhibited better development indicating that there was synergism between the microorganisms. It is concluded that *Trichoderma* increases the development and content of photosynthetic pigments as well as the symbiotic N fixation in nodulated plants of cowpea.

Keywords: Diazotrophic bacteria, Fungi, Synergism.

1 INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias nodulíferas diazotróficas, também chamadas de rizóbio, são microrganismos capazes de realizar a fixação biológica do nitrogênio (FBN) quando em simbiose com leguminosas e, portanto, podem disponibilizar nitrogênio em formas assimiláveis para estas plantas (DIVITO; SADRAS, 2014; FIGUEIREDO et al., 2016). A simbiose leguminosa-rizóbio permite que estas plantas cresçam em solos pobres em nitrogênio (FIGUEIREDO et al., 2016). Além disso, a simbiose leguminosa-rizóbio também pode ser utilizada como uma alternativa econômica e ecologicamente viável para incrementar a produção agrícola de leguminosas, principalmente nas culturas do feijão-caupi, feijão comum e soja (RODRIGUES et al., 2015; BOUKAR et al., 2016). De modo geral, a FBN executada pelos rizóbios em associação com leguminosas agronomicamente importantes pode proporcionar aumento de 20 a 35% na produtividade vegetal (FIGUEIREDO et al., 2016).

A utilização de microrganismos visando aumentar a produção agrícola é uma demanda crescente da sociedade atual (OLIVARES et al., 2013). A prática de inocular as espécies vegetais com *Trichoderma* tem crescido mundialmente e se justifica pelo fato deste fungo apresentar capacidade de sintetizar e liberar substâncias indutoras do crescimento vegetal que podem, portanto, incrementar o crescimento e desenvolvimento das culturas (HARMAN, 2011; MACHADO et al., 2012; MWEETWA et al., 2016), além de propiciar maior absorção e translocação de nutrientes pelas espécies vegetais (BROTMAN et al., 2010; VENTURI; KEEL, 2016). Plantas de feijão comum, lótus e aveia preta exibiram incremento na fixação do nitrogênio atmosférico e no crescimento vegetativo quando coinoculadas com rizóbio e *Trichoderma* (MACHADO et al., 2012; KUMAR et al., 2013). Em contrapartida, não foi registrado aumento na biomassa ou na produtividade de grãos de feijão-caupi coinoculado com *Rhizobium* e *Trichoderma* (MWEETWA et al., 2016).

Os trabalhos com *Trichoderma* apresentam resultados controversos e reforçam a necessidade de que mais estudos sejam realizados na busca de identificar isolados eficientes e biocompatíveis com rizóbio. As interações biológicas se mostram importantes ferramentas para aumentar a biomassa vegetal, FBN e produtividade de plantas agronomicamente importantes e, portanto, a combinação rizóbio-*Trichoderma* merece destaque. Baseado na hipótese de que a presença do *Trichoderma* induz o aumento da FBN realizada por *Bradyrhizobium* em simbiose com feijão-caupi e, conseqüentemente, ocorram melhorias no crescimento e desenvolvimento destas

plantas. O presente estudo objetivou caracterizar isolados de *Trichoderma* e avaliar o efeito destes isolados na FBN realizada por *Bradyrhizobium* em simbiose com feijão-caupi bem como o desenvolvimento destas plantas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância econômica do feijão-caupi

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] pertence à família Fabaceae amplamente distribuída no mundo e bem adaptada às regiões tropicais e subtropicais (ALCANTARA et al., 2014). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão-caupi e as regiões Norte e Nordeste se destacam com 82% da produção brasileira (FREITAS et al., 2014; CONAB, 2016). No estado do Piauí ocorrem duas safras anuais de produção do feijão-caupi, sendo a segunda safra com maior produtividade (acima de 500 kg ha⁻¹; CONAB, 2016). Utilizada na alimentação humana e animal, o feijão-caupi apresenta grãos ricos em proteína (aproximadamente 25% do grão), carboidratos, fibras, ácido fólico e quantidades significativas de importantes minerais (FREIRE FILHO et al., 2012; BOUKAR et al., 2016). Além dos grãos, as folhas frescas e vagens imaturas do feijão-caupi também são utilizadas como alimento humano e animal (ALCANTARA et al., 2014).

O cultivo de feijão-caupi apresenta baixa produtividade em relação a outros feijões, especialmente ao feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), e isso se deve, principalmente, a escassez e irregularidade das chuvas, baixa fertilidade do solo e ao baixo nível tecnológico empregado no cultivo destas plantas (FREIRE FILHO et al., 2012; ALCANTARA et al., 2014). O feijão-caupi é frequentemente cultivado em sistema convencional e o manejo inadequado deste sistema pode resultar em problemas para a microbiota do solo e na redução do crescimento radicular e produtividade desta cultura (FREIRE FILHO et al., 2012; FREITAS et al., 2014). Assim, é evidente a necessidade de investimentos em tecnologias que promovam o aumento da produtividade do feijão-caupi, tais como o melhoramento genético visando plantas adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas, resistentes às situações de estresse e mais eficientes na fixação biológica do nitrogênio (FBN) (TORRES et al., 2015; BOUKAR et al., 2016).

2.2 A fixação biológica do nitrogênio

O nitrogênio é um macronutriente de baixa disponibilidade no solo e apresenta-se como fator preponderante para o aumento da produtividade de várias culturas, dentre elas o feijão-caupi (FIGUEIREDO et al., 2016). Contornar a baixa disponibilidade de nitrogênio no solo com a aplicação de fertilizantes nitrogenados, apresenta custo elevado e pode não atingir os resultados esperados devido as perdas por volatilização e lixiviação dos compostos nitrogenados (OLIVARES et al., 2013; SOUZA et al., 2015). Uma alternativa de baixo custo e ecologicamente viável é a fixação do nitrogênio atmosférico realizada por bactérias diazotróficas, ou rizóbios, quando em simbiose com leguminosas (DIVITO; SADRAS, 2014; FIGUEIREDO et al., 2016). O termo 'rizóbio' foi utilizado originalmente para designar bactérias do gênero *Rhizobium* (LARANJO et al., 2014); entretanto, 12 gêneros são reconhecidos como rizóbios – com destaque para *Bradyrhizobium* (WEIR, 2016).

A simbiose entre o rizóbio e a leguminosa é uma interação benéfica e tem início com o reconhecimento da célula microbiana pelas células epidérmicas das raízes da planta hospedeira (RELLÁN-ÁLVAREZ et al., 2016). Após o reconhecimento, cria-se uma linha de infecção que transmite as bactérias às camadas de células internas do sistema radicular das leguminosas e, finalmente, ocorre a formação dos nódulos (RELLÁN-ÁLVAREZ et al., 2016). O estabelecimento da simbiose, portanto, requer uma infecção bem-sucedida das raízes de leguminosas pelo rizóbio (MURRAY, 2011). O nódulo fornece um nicho protegido e nutrição abundante para as bactérias (REMIGI et al., 2016) e é neste novo órgão que o N₂ atmosférico é fixado e convertido em formas assimiláveis às plantas pela FBN (OLIVARES et al., 2013). Desta forma, a simbiose com rizóbio permite às leguminosas crescerem em solos pobres em nitrogênio (FIGUEIREDO et al., 2016).

A FBN é um processo de extrema relevância do ponto de vista ambiental perdendo apenas para a fotossíntese em ordem de importância para a manutenção da biosfera (OLIVARES et al., 2013). Além disso, o estímulo da FBN como forma de incrementar a produção de leguminosas agronomicamente importantes é uma prática frequente em sistemas agrícolas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; FIGUEIREDO et al., 2016). Fatores como a especificidade entre o microrganismo e a cultivar inoculada, condições ambientais (pH, temperatura etc.) e situações de estresse (deficiência de nutrientes, metais pesados etc.) (FERREIRA et al., 2014); deficiência de macronutrientes como fósforo (P), potássio (K) e enxofre (S) tem impactos diretos e

negativos no crescimento dos rizóbios, na formação e funcionamento dos nódulos e ainda afeta o crescimento do hospedeiro o qual reduz a exportação de carboidratos para o rizóbio (OLIVARES et al., 2013; DIVITO; SADRAS, 2014).

2.3 Aspectos importantes da relação entre rizóbios e leguminosas

A FBN afeta positivamente o crescimento das leguminosas, ou seja, o aumento na disponibilidade de nitrogênio assimilável induz nas plantas uma melhor taxa de crescimento (RODRIGUES et al., 2012; FIGUEIREDO et al., 2016). Entretanto, o estabelecimento da simbiose rizóbio-leguminosa é fortemente controlado pelo hospedeiro e diretamente relacionado com o sucesso da seleção do microrganismo simbiote (OLIVARES et al., 2013). Por exemplo, o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) estabelece simbiose com várias espécies de *Rhizobium* (*R. etli*, *R. freirei*, *R. giardinii* sv. *phaseoli*, *R. leguminosarum* sv. *phaseoli* e *R. tropici*) (DALL'AGNOL et al., 2013), enquanto que o feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é eficientemente nodulado por bactérias do gênero *Bradyrhizobium* (*B. icense*, *B. paxllaeri* e *B. yuanmingense*) (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2013; MATSUBARA; ZÚÑIGA-DÁVILA, 2015). O feijão-caupi é nodulado eficientemente por *Bradyrhizobium*, principalmente por *Bradyrhizobium* sp. BR 3267 – uma estirpe-elite utilizada como inoculante em cultivos comerciais desta leguminosa (SIMÕES-ARAÚJO et al., 2016).

A eficiência da FBN e da simbiose rizóbio-leguminosa pode ser aumentada com a coinoculação com outros microrganismos, tais como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e até fungos promotores de crescimento de plantas (FPCP) (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; REGO et al., 2015). Por exemplo, plantas de feijão comum coinoculadas com *R. phaseoli* e *Bacillus* spp.; com *R. phaseoli* e *Pseudomonas* spp.; *Rhizobium* sp. e *Pseudomonas fluorescens*; ou com *R. etli* e *Azospirillum brasilense* apresentam incremento no crescimento (p. ex. nodulação e massa seca das plantas) e em aspectos metabólicos (p. ex. fixação e assimilação do nitrogênio e absorção de fósforo) (STAJKOVIC et al., 2011; SAMAVAT et al., 2012). Plantas de *Amorpha canescens*, uma leguminosa de pradaria, coinoculada com rizóbio e com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) apresentaram aumento significativo de 120 e 130% no número e na massa seca de nódulos, respectivamente, em relação as plantas inoculadas apenas com o rizóbio (LARIMER et al., 2014).

Os efeitos positivos de fungos promotores de crescimento de plantas (FPCP) na simbiose rizóbio-leguminosa não são bem documentados. FPCP são fungos não-patogênicos, filamentosos e saprófitos não simbióticos que vivem livremente na rizosfera ou na superfície das raízes vegetais e que promovem o crescimento das plantas (NAZNIN et al., 2014). A capacidade de estimular o sistema de resistência das plantas e, portanto, suprimir o ataque de fitopatógenos é uma característica compartilhada por BPCP e FPCP (VENTURI; KEEL, 2016). Dentre os FPCP, merece destaque as espécies pertencentes aos gêneros *Cladosporium*, *Penicillium*, *Phoma* e *Trichoderma* (SRIVASTAVA et al., 2012; VENTURI; KEEL, 2016). Os isolados de *Trichoderma* são robustos agentes no controle biológico frequentemente utilizados para controlar vários microrganismos fitopatogênicos e também induzem aumento na produtividade de várias culturas (LEE et al., 2016).

2.4 *Trichoderma*: aspectos gerais

Os fungos do gênero *Trichoderma* são microrganismos filamentosos, saprófitos e/ou endofíticos e anamórficos que apresentam esporulação abundante, conídios pequenos, unicelulares e de fácil disseminação (DRUZHININA et al., 2011; VENTURI; KEEL, 2016). Estes fungos são bem adaptados a diferentes tipos de ambientes e isso provavelmente resulta da sua capacidade de crescer rapidamente independente das condições do ambiente e de resistir a diferentes tipos de compostos químicos nocivos (JAVAID; ALI, 2011). O *Trichoderma* está presente em quase todos os solos agricultáveis, sendo, portanto, amplamente estudados pela sua atuação positiva no biocontrole de doenças vegetais e ativação de vias de sinalização do sistema de defesa vegetal (HARMAN, 2011; HERMOSA et al., 2013; VENTURI; KEEL, 2016). Além disso, estes fungos são eficientes no controle de fitopatógenos por apresentarem capacidade de liberar antibióticos e enzimas extracelulares na rizosfera (JAVAID; ALI, 2011).

Os microrganismos benéficos presentes no solo, tais como *Trichoderma*, possuem relevante papel na manutenção e sustentabilidade do solo (VENTURI; KEEL, 2016) e são capazes de aumentar o crescimento das plantas, protegê-las de doenças e estresses abióticos e, conseqüentemente, aumentar a produtividade vegetal (STAJKOVIC et al., 2011). Por exemplo, plantas de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) inoculadas com *Trichoderma* e crescidas em solos deficientes em fósforo exibiram incremento na massa fresca e seca da parte aérea e das raízes (KAPRI;

TEWARI, 2010). Já plantas de pepino (*Cucumis sativum* L.) apresentaram maior tolerância ao estresse salino quando inoculadas com *T. asperellum* (ZHAO; ZHANG, 2015). Em plantas de lentilha (*Lens culinaris* L.) coinoculadas com *R. leguminosarum* e *T. harzianum* registrou-se aumento na taxa de germinação, na massa seca da parte aérea e raízes e no número de nódulos (HANNAN et al., 2012).

Como já mencionado, os isolados de *Trichoderma* apresentam grande relevância agrícola e ambiental por atuarem como promotores do crescimento de várias espécies vegetais. Estes fungos possuem mecanismos que justificam a sua atuação benéfica, tais como a capacidade de alterar os níveis de fitormônios nos tecidos vegetais, produzir a enzima aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase), sintetizar sideróforos e solubilizar fosfato e micronutrientes (HERMOSA et al., 2013). Ao colonizar as raízes, *Trichoderma* produz e libera auxinas que promovem o crescimento e alongamento radicular (HERMOSA et al., 2013). Além disso, estes fungos são capazes de produzir enzimas hidrolíticas (amilase, quitinase, lipase etc.) e compostos fungitóxicos (terpenos, terpenoides etc.) que atuam na manutenção da sanidade das espécies vegetais (HARMAN, 2011; HERMOSA et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2013; MALMIERCA et al., 2015).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA, R. M. C. M.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; ROCHA, M. M.; CARVALHO, J. S. Eficiência simbiótica de progenitores de cultivares brasileiras de feijão-caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 1-9, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2012.
- BOUKAR, O.; FATOKUN, C. A.; HUYNH, B. L.; ROBERTS, P. A.; CLOSE, T. J. Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, article 757, 1-13, 2016.
- BROTMAN, Y.; GUPTA, K. J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, p. R390-R391, 2010.
- CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira de Grãos**: Terceiro levantamento (Safra 2016/17). Brasília: CONAB. v. 4. pp. 1-156. 2016.
- DALL'AGNOL, R. F.; RIBEIRO, R. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; ROGEL, M. A.; DELAMUTA, J. R. M.; ANDRADE, D. S.; MARTÍNEZ-ROMERO; E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei* sp. nov., a symbiont of *Phaseolus vulgaris* that is very effective at fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4167-4173, 2013.