



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM – SBBq

JOÃO VICTOR SOUZA RIBEIRO

**POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

CAMPO GRANDE –MS

Março de 2025

JOÃO VICTOR SOUZA RIBEIRO

**POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO
E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Fabiana Fonseca Zanoelo

CAMPO GRANDE –MS

Março de 2025

TERMO DE APROVAÇÃO

JOÃO VICTOR SOUZA RIBEIRO

POTENCIAL DE *Trichoderma* spp. NA SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

26 de Março de 2025

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a Fabiana Fonseca Zanoelo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS
(Presidente)

Prof^a. Dr^a Eliane Romanato Santarém
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr Sebastião Ferreira de Lima
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-CPCS-UFMS

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo nesta caminhada.

Agradeço a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro por me guardar e me proteger.

Agradeço à minha família por sempre estar me apoiando e dando suporte na construção de minha carreira, sou muito grato pela presença deles nessa minha caminhada.

À minha orientadora Fabiana Fonseca Zanoelo por ter me proporcionado essa pesquisa. Agradeço por toda atenção, paciência, compreensão, ensinamentos que foram agregado nesses anos de orientação, serei eternamente grato, muito obrigado.

À Profª Gi por sempre estar solucionando minhas dúvidas, pelas oportunidades de estudos que me proporcionou, e por sempre estar acolhendo a gente no laboratório.

Ao Profº Douglas Masui, por toda parceria e conhecimento compartilhado.

À Profª Bianca Obes Corrêa pelo apoio nas atividades desenvolvidas em casa de vegetação.

Agradeço aos meus amigos Thiago Medina e Quézia Melo por todo suporte e rede de apoio que me confortaram em diversos momentos dessa caminhada.

Agradeço a minha amiga e dupla de pesquisa Isa Pavão, por todos conselhos, suporte, padronização de metodologias e conhecimentos compartilhados, você auxílio para construção do cientista que sou hoje.

Agradeço ao Rodrigo Galeano pelos ensinamentos, suporte e padronizações de metodologias realizadas, sem essa cooperação a caminhada seria mais árdua.

Aos meus amigos do laboratório de bioquímica de microrganismos: Ana Simas, Nathalia Glienke, Hellen e Felipe Nascimento, por sempre estar me ajudando, e fazendo companhia.

À Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM) e professores do programa, que agregaram em meu conhecimento.

À UFMS pelo apoio, infraestrutura e oportunidade de realizar esse mestrado que abriu as portas do meu conhecimento, muito obrigado.

RESUMO

O fósforo é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal, mas a sua limitada disponibilidade, rápida imobilização e lixiviação no solo representam desafios ambientais e econômicos. Os fungos promotores de crescimento vegetal possuem a habilidade de solubilizar o fosfato complexado com outros elementos, além de produzir fitohormônios e proteger a planta de ataque de fitopatógenos. Esses fungos também podem sintetizar enzimas, como fosfatase e fitase, que auxiliam na mineralização do fosfato imobilizado em moléculas orgânicas tornando-o mais disponível para as plantas. Com o exposto até aqui, o objetivo do presente trabalho foi otimizar a solubilização de fosfato e avaliar características de promoção de crescimento vegetal por novos isolados de *Trichoderma*. O crescimento dos fungos foi realizado em meio Pikovskaya com 0,5% de fertilizantes fosfatados por 7 dias a 28 °C. Após o crescimento os inóculos foram filtrados e o sobrenadante utilizado para leitura de pH e dosagem de fósforo solúvel. Após a seleção dos fungos solubilizadores de fosfato foram avaliados parâmetros como: tempo de solubilização, fontes fosfatadas, produção de ácido indol-3-acético (AIA), sideróforos, ácidos orgânicos, e enzimas fosfatases e fitases. Por fim, foi realizado um experimento em casa de vegetação a fim de avaliar a promoção de crescimento vegetal do isolado de *Trichoderma* sp. G41 em sementes de milho (*Zea mays* ADV9339). Dentre os 22 fungos testados, o *Trichoderma* sp. G41 demonstrou ser o mais promissor apresentando solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($696,55 \mu\text{g P mL}^{-1}$), AlPO_4 ($421,98 \mu\text{g P mL}^{-1}$), e FePO_4 ($9,91 \mu\text{g P mL}^{-1}$), após 10 dias de incubação. Apresentou solubilização de diferentes fertilizantes comerciais como: termofosfato tal qual ($12,88 \mu\text{g P mL}^{-1}$); termofosfato granulado ($8,31 \mu\text{g P mL}^{-1}$); MV27 ($169,66 \mu\text{g P mL}^{-1}$) e superfosfato ($483,19 \mu\text{g P mL}^{-1}$). O fungo produziu enzimas fosfatase ácida ($4,37 \text{ U mL}^{-1}$) e fitase ($1,51 \text{ U mL}^{-1}$), sideróforos (74%), AIA ($42,197 \mu\text{g AIA mL}^{-1}$), ácidos orgânicos e apresentou tolerância de crescimento na presença de curbitox (inseticida) e atrazina (herbicida). O isolado G41 demonstrou capacidade de solubilização de fosfato mesmo sob condições de estresse, na presença de NaCl 150 mM, atingiu $949,27 \mu\text{g P mL}^{-1}$, enquanto com NaCl 300 mM, solubilizou $936,20 \mu\text{g P mL}^{-1}$. Sob estresse hídrico, obteve $452,15 \mu\text{g P mL}^{-1}$ em $-0,5 \text{ MPa}$ e $498,27 \mu\text{g P mL}^{-1}$ em -1 MPa , após 10 dias de crescimento. Em experimento realizado em casa de vegetação com milho, os tratamentos que receberam meia dose de fertilização fosfatada e inoculados com *Trichoderma* sp. G41 apresentaram um aumento de 47% na massa fresca das raízes e de 38% na parte aérea. As plantas inoculadas com o fungo apresentaram maior teor de clorofilas, carotenóides, aminoácidos e açúcares redutores. Além disso, a atividade das enzimas fosfatase ácida e fitase do solo aumentaram na presença de G41 em ambas as doses de fertilização. A hidrólise de acetato de fluoresceína demonstrou maior atividade microbiana em solo rizosférico inoculadas com o fungo. Diante do exposto, o isolado *Trichoderma* G41 demonstrou grande potencial como solubilizador de fosfato, promovendo o crescimento do milho e contribuindo para a redução do uso de fertilizantes fosfatados. Assim, destaca-se como uma alternativa sustentável para melhorar a qualidade do solo e otimizar a eficiência agrícola.

Palavras-chaves: Fungos filamentosos; Biodisponibilidade de nutrientes; Biofertilizante; FPCV.

ABSTRACT

Phosphorus is an essential element for plant growth and development; however, its limited availability, rapid immobilization, and leaching in the soil pose environmental and economic challenges. Plant growth-promoting fungi have the ability to solubilize phosphate complexed with other elements, produce phytohormones, and protect plants from phytopathogen attacks. These fungi can also synthesize enzymes, such as phosphatase and phytase, which aid in the mineralization of immobilized phosphate in organic molecules, making it more available to plants. Based on these aspects, the objective of this study was to optimize phosphate solubilization and evaluate plant growth-promoting characteristics in new *Trichoderma* isolates. Fungal growth was conducted in Pikovskaya medium with 0.5% phosphate fertilizers for 7 days at 28°C. After incubation, the inocula were filtered, and the supernatant was used for pH measurement and soluble phosphorus quantification. After selecting phosphate-solubilizing fungi, the following parameters were evaluated: solubilization time, phosphate sources, production of indole-3-acetic acid (IAA), siderophores, organic acids, and phosphatase and phytase enzymes. Finally, a greenhouse experiment was conducted to assess the plant growth-promoting effects of *Trichoderma* sp. G41 on corn (*Zea mays* ADV9339) seeds. Among the 22 fungi tested, *Trichoderma* sp. G41 proved to be the most promising, exhibiting phosphate solubilization of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (696.55 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), AlPO_4 (421.98 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), and FePO_4 (9.91 $\mu\text{g P mL}^{-1}$) after 10 days of incubation. It also solubilized different commercial phosphate fertilizers, including thermophosphate tal qual (12.88 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), granulated thermophosphate (8.31 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), MV27 (169.66 $\mu\text{g P mL}^{-1}$), and superphosphate (483.19 $\mu\text{g P mL}^{-1}$). The fungus produced acid phosphatase (4.37 U mL^{-1}) and phytase (1.51 U mL^{-1}) enzymes, siderophores (74%), IAA (42.197 $\mu\text{g mL}^{-1}$), organic acids, and exhibited growth tolerance in the presence of curbitox (insecticide) and atrazine (herbicide). *Trichoderma* sp. G41 also maintained its phosphate-solubilizing capacity under stress conditions. In the presence of NaCl 150 mM, it reached 949.27 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, while at NaCl 300 mM, it solubilized 936.20 $\mu\text{g P mL}^{-1}$. Under drought stress, it achieved 452.15 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ at -0.5 MPa and 498.27 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ at -1 MPa after 10 days of growth. In a greenhouse experiment with corn, treatments that received half the phosphate fertilizer dose and were inoculated with *Trichoderma* sp. G41 showed a 47% increase in root fresh matter and a 38% increase in shoot biomass. Inoculated plants exhibited higher chlorophyll, carotenoid, amino acid, and reducing sugar levels. Additionally, soil acid phosphatase and phytase activity increased in the presence of G41 under both fertilizer doses. Fluorescein diacetate hydrolysis indicated higher microbial activity in rhizospheric soil inoculated with the fungus. Based on these findings, *Trichoderma* sp. G41 demonstrated great potential as a phosphate-solubilizing agent, promoting corn growth and reducing the need for phosphate fertilizers. Thus, it stands out as a sustainable alternative for improving soil quality and enhancing agricultural efficiency.

Keywords: Filamentous fungi; Nutrient bioavailability; Biofertilizer; PPGF.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento vegetal pelos microrganismos (Fonte: Autoria Própria). 18
- Figura 2.** Solubilização de fosfato pelos microrganismos (Fonte: Modificado de Prabhu; Borkar; Garg, 2019) 21
- Figura 3.** *Heatmap* do tempo de solubilização em diferentes fontes de fosfato: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 37
- Figura 4.** Solubilização de fertilizantes comerciais por *Trichoderma* sp. (A) termofosfato tal qual, (B) termosfosfato granulado, (C) MV27, (D) superfosfato simples. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados pelo teste de Tukey... 39
- Figura 5.** Produção das enzimas fosfatase ácida(A) e fitase(B) em palha de arroz (P.A.); palha de milho (P.M.) e bagaço de cana (B.C.) pelos isolados de *Trichoderma*. As atividades estão expressas em unidades por mL (U mL^{-1}). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. 40
- Figura 6.** Produção de sideróforos por linhagens de *Trichoderma* sp. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados pelo teste de Tukey... 41
- Figura 7.** Produção de AIA por linhagens de *Trichoderma* sp. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados pelo teste de Tukey..... 42
- Figura 8.** Avaliação da produção de ácidos orgânicos em meio sólido com indicador de pH. 43
- Figura 9.** Tolerância a agrotóxicos pelos isolados de *Trichoderma* sp. $p < 0,001$ (****), $p < 0,01$ (***). 44
- Figura 10.** Solubilização de fosfato em condições de estresse salino (A) e hídrido (B) por *Trichoderma* sp. G41..... 45
- Figura 11.** Efeito de *Trichoderma* sp. G41 no crescimento de milho (ADV9339) em duas condições de fertilização fosfatada: T1 (controle meia dose); T2 (G41 meia dose); T3 (controle dose completa); T4 (G41 dose completa). (A) comprimento da raiz (B) altura da parte aérea (C) massa fresca da raiz (D) massa fresca da parte aérea (E) massa seca da raiz (F) massa seca da parte aérea. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. 47
- Figura 12.** Parâmetros bioquímicos de experimento em casa de vegetação testando diferentes doses fosfatadas: T1 (controle meia dose); T2 (G41 meia dose); T3 (controle dose completa); T4 (G41 dose completa). (A) clorofila total; (B) carotenóides; (C) flavonóides; (D) fenólicos; (E) aminoácidos totais; (F) açúcares redutores totais. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. 48

Figura 13. Atividade de fosfatase ácida (A); fitase (B) e atividade microbiana (C) em solo rizosférico de milho inoculadas com *Trichoderma* sp. G41 em duas doses fosfatadas: T1 (controle meia dose); T2 (G41 meia dose); T3 (controle dose completa); T4 (G41 dose completa). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey. **49**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Agrotóxicos utilizados no experimento de tolerância em meio sólido, indicando sua ação, princípio ativo (PA), volumes (mL) presente no meio, concentração [PA] seguindo a dose indicada (DI) pelos fabricantes.	30
Tabela 2. Solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e fertilizante termofosfato fino pelos isolados de <i>Trichoderma</i>	35
Tabela 3. Produção de ácidos orgânicos pelos isolados de <i>Trichoderma</i>	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Cadastro dos isolados fúngicos no SISGEN

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcento
µg	micrograma
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -nitrofenolfosfato
µL	microlitro
AIA	ácido indol-3-acético
AlPO ₄	fosfato de alumínio
BDA	ágar dextrose batata
Ca ₃ (PO ₄) ₂	fosfato de tricálcio
CAS	chrome azurol S
cm	centímetro
CMC	carboximetilcelulose
DNA	ácido desoxirribonucleico (do inglês “deoxyribonucleic acid”)
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
Fe	ferro
FeCl ₃	cloreto de ferro
FePO ₄	fosfato de ferro
FPCP	Fungos Promotores de Crescimento de Plantas
g	grama
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HClO ₄	ácido perclórico
K ₂ HPO ₄	fosfato dipotássico
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
L-trp	L-triptofano
M	molar
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
Mn	manganês
MnSO ₄ .H ₂ O	sulfato de manganês hidratado
n.º	número

N	nitrogênio
NaOH	hidróxido de sódio
NH ₃	amônia
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
P	fósforo
pH	potencial de hidrogênio iônico
TLE	<i>Trichoderma</i> liquid enzyme
x	Força g

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Fósforo	16
2.2 Microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV)	17
2.3 Solubilização e mineralização de fósforo	21
2.4 Gênero: <i>Trichoderma</i> na promoção de crescimento vegetal	23
2.5 Importância do milho (<i>Zea mays</i> L.) no Brasil.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específico	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1 Origem do isolados e manutenção dos microrganismos	27
4.2 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato por <i>Trichoderma</i> spp.....	27
4.3 Avaliação do tempo de solubilização de diferentes fontes de fosfato por <i>Trichoderma</i> spp.	27
4.5 Produção de enzimas fitase e fosfatase ácida	28
4.6 Ensaio enzimáticos	28
4.6.1 Dosagem de fitase.....	28
4.6.2 Dosagem de fosfatase ácida.....	29
4.7 Caracterização dos isolados para promoção de crescimento vegetal.....	29
4.7.1 Produção de sideróforos.....	29
4.7.2 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	30
4.8 Produção de ácidos orgânicos.....	30
4.9 Tolerância de <i>Trichoderma</i> sp. a agrotóxicos.....	30
4.10 Solubilização de fosfato em condições de estresse salino e hídrico	31
4.11 Experimento em casa de vegetação de promoção de crescimento vegetal por <i>Trichoderma</i> sp. G41 em milho	31
4.11.1 Dosagem de teor de clorofila e carotenóides	32
4.11.2 Dosagem de flavonóides totais	32
4.11.3 Dosagem de compostos fenólicos	33
4.11.4 Dosagem dos aminoácidos totais.....	33
4.11.5 Dosagem dos açúcares redutores totais.....	33
4.11.6 Dosagem de fosfatase ácida do solo	33
4.11.7 Dosagem de fitase do solo.....	34
4.11.8 Avaliação da atividade microbiana pela hidrólise de acetato de fluoresceína	34
4.12 Análise dos resultados e análise estatística	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato e fertilizantes por <i>Trichoderma</i> spp.	35

5.2 Avaliação do tempo de solubilização utilizando diferentes fontes fosfatadas por <i>Trichoderma</i> sp.	36
5.3 Solubilização de fertilizantes fosfatados por <i>Trichoderma</i> sp.	38
5.4 Produção das enzimas fitase e fosfatase ácida	39
5.5 Produção de sideróforos pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp.	40
5.6 Produção do fitohormônio ácido indol-3-acético pelos isolados de <i>Trichoderma</i> sp.	41
5.7 Avaliação da produção de ácidos orgânicos.....	42
5.8 Avaliação da tolerância a agrotóxicos por <i>Trichoderma</i> sp.	43
5.9 Solubilização de fosfato por <i>Trichoderma</i> sp. G41 sob condições de estresse.	44
5.10 Avaliação da promoção de crescimento em milho com <i>Trichoderma</i> sp. G41.....	45
5.11 Avaliação dos parâmetros bioquímicos de crescimento vegetal com <i>Trichoderma</i> sp. G41	47
5.12 Dosagem das enzimas fitase e fosfatase ácida e avaliação da atividade microbiana do solo pela hidrólise do acetato de fluoresceína.	48
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

O fósforo (P) é um elemento presente nas biomoléculas e processos metabólicos essenciais para a manutenção do ciclo de vida vegetal, compondo os fosfolípidios, DNA, RNA, ATP entre outros (SANG, 2022). No entanto, sua escassez é uma característica universal que prejudica diversos setores industriais e agropecuários, fator preocupante frente ao cenário do aumento populacional. Sua extração ineficiente e predatória das fontes naturais gera a problemática de esgotamento desse recurso previsto ainda para este século (PAVINATO et al. 2020).

Além disso, o P é um elemento altamente reativo, e na maioria das vezes não é encontrado na natureza em sua forma livre. Apenas 0,1-0,5% desse fósforo se encontra disponível no solo, na forma de íons livres de fosfato (PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$) absorvível pelas plantas (PRASAD, 2021). No entanto, o fósforo orgânico, se encontra imobilizado e indisponível em grupos ortofosfatos ligados às moléculas biológicas como o fitato, fosfolipídeos, DNA, RNA e ATP sendo liberado apenas pelo processo de mineralização (SANG, 2022).

A carência desse elemento nos solos acarretou a aplicação excessiva de fertilizantes químicos causando malefícios para o meio ambiente como a eutrofização de rios, contaminação de lençóis freáticos, mudança de pH do solo, disposição de carbono e nitrogênio, fatores os quais afetam o crescimento e desenvolvimento da microbiota do solo e assim a produtividade agrícola (PACHECO et al. 2021; VASSILEVA et al. 2022).

O fósforo é um elemento que pode ser reutilizável através da matéria orgânica, porém suas fontes não são renováveis (LAMBERS, 2021). No Brasil sua predominância está em rochas ígneas, que possuem uma vasta composição de sedimentos, logo um maior custo para obtenção do fósforo (SASABUCHI et al. 2023). Os principais produtores mundiais de fertilizantes fosfatados são: China, Estados Unidos, Marrocos e Rússia que acabam ditando os preços desse produto na comercialização. Somado a isso, o cenário de exportação desses fertilizantes se encontra em crise com a guerra e suspensão da exportação por conta do conflito entre Rússia e Ucrânia, e os países que dependem desses fertilizantes tiveram que se assegurar dos fertilizantes de outras regiões (NASTARI, 2022).

Considerando toda a dinâmica de disponibilidade do fósforo no solo, produção e comercialização, a solubilização de rochas fosfáticas por microrganismos é uma alternativa promissora, uma vez que, essa microbiota presente nos solos desempenha papel importante no ciclo ecológico do fósforo e saúde do solo (KELLY, 2023; SANG, 2022). A área que estuda os microrganismo solubilizadores de fosfato (MSF) vem se demonstrando promissora, com o uso de fungos e bactérias como solubilizadores de fosfato (MENDES et al. 2020; AMRI et al. 2023). Além

de aumentarem a disponibilidade de fósforo para as plantas, esses microrganismos também atuam na promoção do crescimento vegetal, seja pela produção de fitohormônios, pela indução de resistência sistêmica ou pela melhoria da absorção de nutrientes, contribuindo para o aumento da produtividade agrícola e a sustentabilidade dos sistemas de cultivo (ALORI et al. 2017).

A solubilização de fosfato, é um mecanismo dos microrganismos que visa disponibilizar este elemento para sua absorção, nutrição logo seu crescimento e desenvolvimento vegetal (VASSILEVA et al. 2022). Sendo assim, esses microrganismos possuem diversas habilidades para promover essa biodisponibilidade de fósforo inorgânico (Pi), como por exemplo na a produção de ácidos orgânicos, protonação de íons H⁺ e a produção de sideróforos (LÓPEZ et al. 2020). Para o fósforo orgânico (Po) imobilizado em moléculas orgânicas esses microrganismos realizam a produção de enzimas para promover o processo de mineralização de fósforo, sendo as principais enzimas conhecidas como fosfatases e fitases (ALORI et al. 2017).

Estudos com *Bacillus thuringiensis* (DUCOUSSO-DÉTREZ et al. 2024) *Pseudomonas* sp. (AMRI et al. 2023); *Trichoderma* sp. (PRASAD et al. 2023); *Taxus wallichiana* (ADHIKARI et al. 2019) demonstraram a eficiência do uso desses microrganismos para a função de solubilização, deixando o fósforo mais disponível para absorção das plantas. Contudo, os fungos se destacam quando comparados às bactérias, pois secretam mais ácidos orgânicos importantes para o processo de solubilização de fosfato. Dentre esses ácidos, estão presentes o láctico, acético, cítrico, o 2-cetoglutarato, entre outros (ALORI et al. 2017). Ademais, as enzimas fúngicas tendem a apresentar estabilidade a pH mais ácidos, podendo ser aplicadas em solos ácidos e nessas condições severas realizarem sua atividade de mineralização do fosfato de forma eficiente sem sofrerem sua desnaturação (HASSAN et al. 2019).

Portanto, far-se-á importante o estudo de microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV), como uma forma de baixo custo, eficiente e de grande sustentabilidade de uso dos bioinsumos na agricultura. O uso exacerbado de fertilizantes químicos acarreta danos ao meio ambiente, além da sua rápida imobilização no solo e difícil importação. Em vista disso, uma alternativa viável é o uso de fungos promotores de crescimento vegetal que promovem uma melhor reciclagem de nutrientes, além de melhorar a microbiota do solo, criando um microbioma harmônico para o crescimento e desenvolvimento vegetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fósforo

É fundamental que os nutrientes estejam presentes em quantidades adequadas e disponíveis para a absorção pelas plantas, o que garante o crescimento, desenvolvimento e sucesso para a produtividade de alimentos (ELBASIOUNY et al. 2022). Nesse sentido, os fertilizantes químicos se tornam fontes alternativas de nutrição e de fácil aplicabilidade. Porém, esses compostos sintéticos quando aplicados no solo tornam-se tóxicos devido sua alta reatividade e difícil degradação, sendo acumulado em solos e corpos d'água. Além disso, a composição de fertilizantes fosfatados geralmente inclui metais pesados, como cádmio (Cd) e chumbo (Pb), o que levanta sérias preocupações ambientais e de saúde humana e animal, além de ameaçar a conservação da biodiversidade do solo, tornando-se um potencial desastre para o ecossistema (ATUCHIN et al. 2023).

Os fertilizantes comumente utilizados são a base de fósforo (P); nitrogênio (N) e potássio (K) que possuem uma função insubstituível e fundamental para a vida celular. Esses nutrientes são cruciais, pois compõem macromoléculas como: a molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP), proteínas, entre outros (SOARES, 2019). Os organismos vegetais dependem desses minerais para o seu crescimento e desenvolvimento. Desse modo, N,P,K são elementos essenciais para o crescimento vegetal, fotossíntese, resistência ao estresse e inúmeras reações metabólicas (ELBASIOUNY et al. 2022; MEENA, 2019).

Na natureza o fósforo pode ser encontrado em duas formas: inorgânica (P_i) e orgânica (P_o). Em sua forma inorgânica o fósforo está presente em rochas ígneas, adsorvidos com cátions do solo ou imobilizados com argilas, representando assim cerca de 70% do conteúdo de fósforo no solo (DIPTA et al. 2019). Todavia, o fósforo orgânico se encontra imobilizado nas macromoléculas da microbiota vivente nesse solo, presente nos ácidos nucleicos, fosfolipídios e fosfoproteínas (LIU, 2021). Além disso, os vegetais armazenam fósforo na forma de fitinas, quando ligadas a elementos como magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), ou como fitato, formado em uma via lipídica para armazenamento em grãos e sementes, onde é encontrado em sua forma livre, não ionizada (PANDEY et al. 2001). O fitato armazenamento representa aproximadamente 80% do fósforo orgânico no solo (DIPTA et al. 2019).

Devido à sua alta eletronegatividade o fósforo nos solos pode existir em diversas formas, dependendo assim das características físico-químicas desse solo. Ele pode se ligar com cátions como Al^{3+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , sais e outros minerais do solo, formando compostos mais estáveis e se tornando

indisponível para a absorção pelas plantas (PAVINATO et al. 2020; LIU, 2021). A escassez desse elemento é, portanto, um indicador crítico no ecossistema.

Além disso, estados do Centro-Oeste Brasileiro se deparam com as altas concentrações de Al^{3+} em seus latossolos, o que acelera os processos de imobilização dos nutrientes presentes no solo. Logo, o fósforo se encontra nos solos do cerrado, porém, não em sua forma lábil para absorção dos organismos (PROCÓPIO; BARRETO, 2021). Ademais, o fósforo é um elemento reutilizável, mas não renovável, com projeções que fontes podem se esgotar entre os anos de 2060 e 2130 (LAMBERS, 2021; VIEIRA et al. 2019). No Brasil, a predominância desse elemento ocorre em rochas ígneas, que possuem uma composição rica de sedimentos, o que implica em um maior custo e trabalho para obtenção de fósforo (SASABUCHI et al. 2023).

Dessa forma, a rápida imobilização do fósforo, o uso excessivo de fertilizantes na agricultura, acarreta problemas ecológicos como bioacumulação, biomagnificação, eutrofização, contaminação de lençóis freáticos, mudança de pH do solo, disposição de carbono e nitrogênio, que afetam diretamente a microbiota do solo (PACHECO et al. 2021). A microbiota desempenha papel importante no desenvolvimento vegetal, participando da mineralização e solubilização de nutrientes, fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios, controle de fitopatógenos, melhorando assim qualidade do solo e a fertilização de espécies vegetais (SANG, 2022).

2.2 Microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV)

Os microorganismos presentes nos solos exercem uma influência significativa sobre o crescimento vegetal e qualidade do solo, promovendo a aquisição de nutrientes por meio do seu próprio metabolismo. Essa ação ocorre com a liberação de metabólitos primários e secundários que transformam nutrientes insolúveis do ambiente. Além disso, os microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) são reconhecidos por estimular o crescimento vegetal por meio de mecanismos diretos e indiretos (Figura 1).

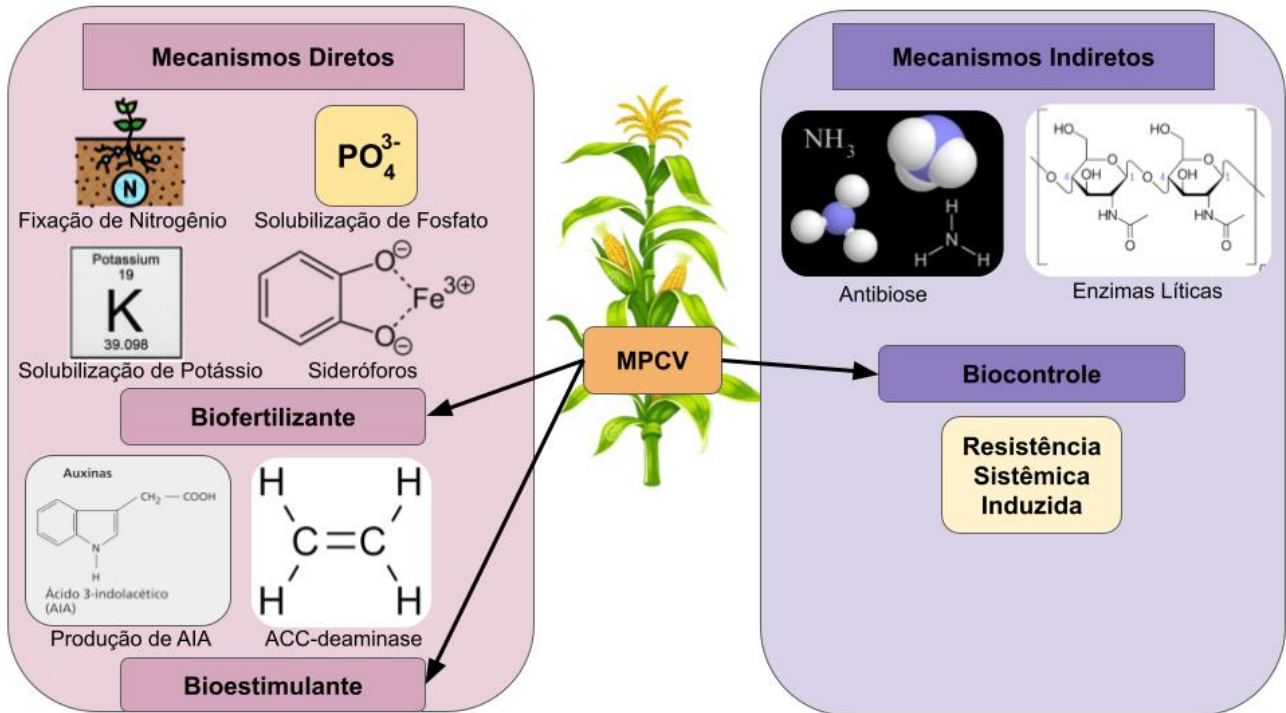


Figura 1. Mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento vegetal pelos microrganismos (Fonte: Autoria Própria).

Os mecanismos diretos estão envolvidos na biodisponibilidade de nutrientes, ao promover a ciclagem de nutrientes presentes na matéria orgânica, que serve de substrato para as enzimas produzidas pelos microrganismos. Para melhorar a qualidade do solo, é essencial diversas enzimas, capazes de liberarem diversos nutrientes e compostos orgânicos indispensáveis para qualquer forma de vida. Dessa maneira, a secreção de enzimas microbianas desempenha um papel crucial ao favorecer a ciclagem de nutrientes no solo (SOBUCKI et al. 2021).

Dentre essas enzimas podemos citar as carboidrases, enzimas responsáveis pela clivagem dos carboidratos, presentes na biomassa do solo, predominantemente composta por resíduos lignocelulósicos, como celulose, amido, xilana e pectina. Para a liberar a glicose presente nos polímeros de celulose, os microrganismos produzem enzimas extracelulares como endoglucanases, celobiohidrolases e β -glucosidases. O processo inicia-se com a ação endoglucanases (EC 3.2.1.4), que clivam aleatoriamente as ligações glicosídicas β -1-4 da celulose. Em seguida, as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) degradam os resíduos liberados, formando o dissacarídeo celobiose, que é então clivado pelas β -glucosidases (EC 3.2.1.21) para liberar glicose. Esta glicose é uma importante fonte de energia para os organismos heterotróficos na microbiota, tornando essas enzimas fundamentais na avaliação da qualidade do solo (CHAUHAN et al. 2020)

As amilases são enzimas responsáveis pela clivagem do amido, um carboidrato de reserva produzido por espécies vegetais e uma importante fonte de carboidrato (BUSI et al. 2021). A degradação do amido ocorre pela ação das enzimas do complexo amilolítico, também conhecidas como amilases (E.C 3.2.1.-). Essas enzimas extracelulares são classificadas em quatro grupos conforme sua ação: endoamilases (como as α -amilases), exoamilase (β -amilases e glucoamilases), desramificadoras e transferases. A atividade dessas enzimas resulta na formação de produtos como glicose, maltose, dextrina, oligossacarídeos (GANGADHARAN et al. 2020). Outro grupo importante, são as xilanases que degradam a xilana presente na hemicelulose da parede celular vegetal, e são responsáveis pela liberação de xilose ou xilooligossacarídeos (PUCHART et al. 2021).

Além de fornecer carboidratos, essa microbiota também disponibiliza nutrientes essenciais como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) (DOTANIYA et al. 2019). Para a liberação de fósforo imobilizado em matéria orgânica, os microrganismos produzem enzimas como as fitases e fosfatases impulsionando o processo de mineralização e ciclo biogeoquímico do fósforo (RAWAT et al. 2021)

A liberação de nitrogênio no solo ocorre através da proteólise das proteínas, realizada pelas proteases (EC 3.4.2.21-24), que quebram as proteínas em peptídeos menores. Esses peptídeos são então decompostos por peptidases, resultando na liberação de aminoácidos (GREENFIEL et al. 2020). Entre os aminoácidos liberados está o triptofano, um aminoácido aromático essencial para a produção do ácido indol-3-acético, um hormônio vegetal crucial envolvido em processos como divisão celular, promoção da rizogênese e desenvolvimento de frutos (PONS et al. 2020; SANÓ et al. 2022).

Esse fitormônio pode ser produzido por microrganismos presentes na rizosfera, a fim de promover uma comunicação entre planta-microrganismo e o sucesso da colonização endofítica (ABADI et al. 2021). Existem diferentes vias de produção do AIA, que podem ser dependentes ou independentes do L-triptofano. A via independente do L-triptofano é mais comum em plantas e bactérias, enquanto a via dependente desse aminoácido é mais frequentemente relatada em fungos (SINGH et al. 2019). Estudos com *Fusarium delphinoides* demonstraram a produção de intermediários da produção de AIA via L-triptofano sendo eles o ácido indol-3-pirúvico e triptamina (KULKARNI et al. 2013; KESWANI *al.*, 2020). A partir da produção de AIA os microrganismos estabelecem uma comunicação entre plantas e microrganismos (KESWANI et al. 2019). No entanto, fitopatógenos também realizam a produção de AIA em excesso para infecção de plantas hospedeiras (KESWANI et al. 2020).

Outra molécula importante são os sideróforos que desempenham um papel crucial na interação planta-microrganismo devido ao seu amplo espectro de atividades. Além de fornecer ferro para as plantas em solos deficientes desse nutrientes, estudos demonstram que os sideróforos também

contribuem para o controle biológico ao diminuir a disponibilidade de ferro no ambiente, o que limita o crescimento de patógenos. Além disso, promovem a liberação do fosfato complexado em fosfato de ferro promovendo uma solubilização deste nutriente especialmente em solos ácidos (ALORI et al. 2017). Esses metabólitos secundários são classificados segundo sua característica química sendo: hidroxamatos; catecolatos e carboxilatos.

O tipo mais comum é o hidroxamato, que é amplamente encontrado em diversos organismos. Esses sideróforos têm uma estrutura molecular contendo majoritariamente grupos C (=O); N(=OH) e um grupo radical com aminoácidos e derivados (SAHA et al. 2016). Os catecolatos, conhecidos como fenolatos, são produzidos especificamente por bactérias, e possuem um grupo hidroxila que permite a ligação do Fe (III) junto com os catecolatos. Por fim, os carboxilatos produzidos por fungos e bactérias, contêm grupos carboxila e hidroxila em sua estrutura, que facilitam a quelação do ferro do ambiente, tornando esses sideróforos altamente hidrofílicos. Além disso, alguns microrganismos produzem sideróforos com características mistas, combinando porções de catecolato e hidroxamatos, como é o caso do sideróforo produzido por *Rhodococcus erythropolis* (PAUL et al. 2015).

Por outro lado, os mecanismos indiretos de promoção de crescimento vegetal estão envolvidos no controle de fitopatógenos que incluem a produção de enzimas líticas degradadoras das paredes celulares dos patógenos, como quitinase e NAGase (GALEANO et al. 2024), bem como a liberação de compostos voláteis, como ácido cianídrico (RASOOL et al. 2021), e a indução de resistência sistêmica (POVEDA et al. 2020), que protege as plantas contra fitopatógenos.

Entre os microrganismos promotores de crescimento vegetal, destaca-se um subgrupo, conhecido como microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF), que possuem a habilidade de mineralizar e solubilizar o fosfato do solo, além de armazenar concentrações de fósforo em sua biomassa (ALORI et al. 2017). Essa microflora desempenha um papel crucial no ciclo biogeoquímico do fósforo no solo, aumentando a reciclagem de nutrientes ao transformar o fósforo insolúvel em formas mais solúveis, facilitando assim a absorção tanto pelos próprio microrganismos quanto pelas plantas (ETESAMI et al. 2021).

Além disso, diversos problemas estão associadas ao uso de fósforo nas atividades agrícolas. Primeiramente, o fósforo é uma fonte não renovável, e no Brasil, sua presença está predominantemente em rochas ígneas, cuja extração é financeiramente onerosa devido à sua composição (SASABUCHI et al. 2023). Em segundo lugar, os principais países que extraem e exportam fósforo, como China, Estados Unidos, Marrocos e Rússia, enfrentam desafios, especialmente no cenário atual, onde o conflito entre Rússia e Ucrânia, ambos grandes exportadores de fertilizantes, que resultou na suspensão de suas atividades de exportação e no aumento dos custos dessa prática (NASTARI, 2022). Como resultado, países como o Brasil tornam-se dependentes da

importação desses fertilizantes, o que acarreta um aumento nos preços dos alimentos. Diante desse cenário, a busca por estratégias mais sustentáveis e econômicas para a nutrição do solo e a produtividade agrícola tornou-se essencial (NASTARI, 2022; FATIMA et al. 2021). A solubilização de rochas fosfáticas por microrganismos surge como uma alternativa promissora para disponibilizar esses nutrientes, especialmente o fósforo, o segundo nutriente mais importante para o crescimento e desenvolvimento vegetal, além de promover outros mecanismos que beneficiam o organismo vegetal (PAUL et al. 2021).

2.3 Solubilização e mineralização de fósforo

Os MSF possuem mecanismos para disponibilizar o fósforo inorgânico (P_i) ou orgânico (P_o) para a absorção e nutrição vegetal (Figura 2). Através de um mecanismo de solubilização do P_i , os microrganismos produzem ácidos orgânicos como ácidos cítrico, málico, oxálico, lático, entre outros (ETESAMI et al. 2021) promovendo a liberação do P_i que está ligado a cátions (Fe^{3+} , Al^{3+} e Ca^{2+}). Além disso, através do processo de mineralização, eles produzem fosfatases e fitases, clivando o fosfato imobilizado em material orgânico.

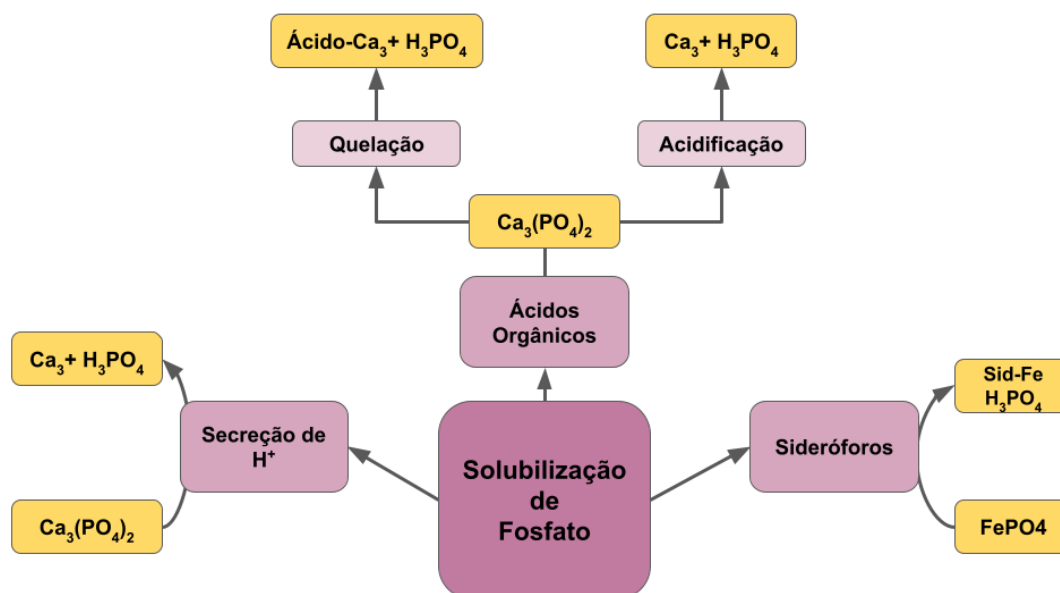


Figura 2. Solubilização de fosfato pelos microrganismos (Fonte: Modificado de Prabhu; Borkar; Garg, 2019)

Os ácidos orgânicos possuem um perfil quelante sobre os cátions, promovendo uma troca de ligantes entre o fósforo e os ácidos, formando complexos com os metais facilitando a solubilização do fósforo (RAWAT et al. 2021). Além disso, esses ácidos ocupam os sítios de ligação dos cátions, impedindo que o fósforo se ligue a esses metais, resultando em uma maior concentração de fósforo livre (BASÍLIO et al. 2022).

Os MSF produzem uma variedade de ácidos para promover a solubilização do fosfato. Em bactérias do gênero *Enterobacter* sp. foram observadas as produções dos ácidos cítrico, fumárico, cetoglutarato, málico e oxálico (ALZATE et al. 2023). No entanto, fungos se destacam nesse papel, produzindo uma diversidade ainda maior de ácidos, como: láctico, ascórbico, isocitrato, málico, cítrico, láctico (BONONI et al. 2020). Sabe-se, que os fungos prosperam em ambientes mais ácidos, logo a secreção eficiente desses ácidos favorece o processo de solubilização.

O ácido glucônico é o mais encontrado no processo de solubilização de fosfato. Ele é formado pela oxidação a partir de glicose pela enzima glicose desidrogenase, que converte a glicose em ácido glucônico. Este, por sua vez, é clivado pela enzima ácido glucônico desidrogenase, resultando em ácido 2-ceto-glucônico, capaz de acidificar a região rizosférica e disponibilizar o fosfato imobilizado (KAUR, 2021). A enzima glicose desidrogenase (GDH) é codificada pelo gene *gcd*, alvo de estudos. Além disso, o cofator essencial para essa reação, a piroquinolina quinona (PQQ), requer a ação de seis genes principais para sua síntese (*pqqA*, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD*, *pqqE*, e *pqqF*) (RAWAT et al. 2021).

Os MSF possuem outros mecanismos para solubilização, como a acidificação por excreção de prótons pela H⁺-ATPase, juntamente com a assimilação de NH₄⁺ (ETESAMI et al. 2021). A liberação de prótons no meio externo das células microbianas promove a protonação do fósforo impedindo sua ligação com os cátions, permitindo assim a sua disponibilidade e absorção (WANG et al. 2020). Além disso, a produção de sideróforos, moléculas de baixo peso molecular que possuem alta afinidade com ferro, também contribui para a liberação de fósforo complexados com cátions Fe³⁺. Esse mecanismo ocorre preferencialmente em solos mais ácidos (SAHA et al. 2016).

Simultaneamente, o fósforo presente em material biológico em decomposição pode ser clivado e absorvido pelos microrganismos e plantas, por um processo conhecido como mineralização (TIAN et al. 2021). A biomassa microbiana desempenha um papel crucial na reciclagem de nutrientes, criando um reservatório de fósforo orgânico (Po). Os microrganismos que solubilizam o fósforo inorgânico (Pi) também servem como substratos para decomposição, promovendo a mineralização do Po e de outros nutrientes (BASÍLIO et al. 2022).

Entre as enzimas envolvidas no processo de mineralização estão as fosfatases não específicas, que se diferenciam pelo pH ótimo de atividade, podendo ser classificadas como fosfatases ácidas ou alcalinas. Diversos estudos com microrganismos demonstram o aumento da atividade dessas enzimas no solo (BONONI et al. 2020; GALEANO et al. 2024). Outra enzima importante é a fitase, responsável pela liberação P_o presente no fitato, que é encontrado em abundância nos solos. Assim as fitases desempenham um papel importante na liberação do fosfato presente no inositol (LI et al. 2023). Por fim, as enzimas que clivam a ligação fósforo-carbono (C-P), denominadas como fosfonatases ou carbono-fósforo liase, têm sua atividade menos documentada no solo, mas foram

identificadas em estudos com *Bacillus* (TENGA et al. 2019), *Aspergillus* e *Penicillium* (MEHTA et al. 2019).

2.4 Gênero: *Trichoderma* na promoção de crescimento vegetal

Fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma* estão divididos no filo Ascomycota, ordem Hypocreales e família Hypocreaceae, reconhecidos como um Agente de Controle Biológico (*Biological Control Agents*; BCAs) (POVEDA; EUGUI, 2022). Podem ser encontrados em diversos ambientes, de vida livre ou colonizando a rizosfera e tecidos vegetais sem causar doenças (EL ENSHASY et al. 2020). Quando colonizando a rizosfera, o *Trichoderma* promove o crescimento vegetal com disponibilização de nutrientes, produção de fitohormônios, além de ser um excelente controlador biológico (LIMDOLTHAMAND et al. 2023; GALEANO et al. 2024).

A colonização de tecidos vegetais por fungos *Trichoderma* estabelece uma relação mutualística benéfica, onde esses microrganismos são capazes de controlar diversas doenças que afetam safras como a podridão de carvão causada pelo fungo fitopatogênico *Macrophomina phaseolina* (LARRAN et al. 2023) e a podridão causada por *Rhizoctonia solani* (MAYO- PRIETO et al. 2020). Para promover o crescimento vegetal, cepas de *Trichoderma* utilizam mecanismos relacionados à produção de metabólitos, como ácidos orgânicos, H⁺, AIA, sideróforos, além de enzimas como fosfatases e fitases, entre outros produtos do seu metabolismo (EL ENSHASY et al. 2020). Dessa forma, melhorando a qualidade do solo, com a biodisponibilidade de nutrientes que podem ser utilizados pelas plantas, com isso um melhor desenvolvimento vegetal.

Na literatura demonstra que fungos do gênero *Trichoderma* produzem auxina, como o ácido indol-3-acético, que auxilia diretamente no desenvolvimento vegetal, promovendo o crescimento radicular e melhorando a arquitetura das raízes para uma absorção mais eficiente de nutrientes (HEWEDY et al. 2022; SANÓ et al. 2022). Além disso, esses fungos têm a capacidade de produzir sideróforos, moléculas quelantes com alta afinidade pelo ferro férrico no solo. Esse mecanismo permite que plantas e fungos aumentem a captação de ferro quando ele está em baixa concentração (SANÓ et al. 2022). Os sideróforos também podem inibir o crescimento de fitopatógenos por privação de ferro e auxiliar na solubilização de fósforo quando este está na forma de FePO₄. Além disso, esses fungos aumentam a biodisponibilidade de nutrientes no solo, solubilizando fosfato, potássio e zinco através da produção de enzimas fosfatases, fitases, e ácidos orgânicos (BONONI et al. 2020; CHEN et al. 2021; HEWEDY et al. 2022).

Sabe-se que inúmeros microrganismos promovem o crescimento vegetal, em particular os *Trichoderma* têm se destacado tanto no mercado quanto na pesquisa por oferecer múltiplos benefícios, aumentando assim a utilização de produtos agrícolas a base desses microrganismos

(BERTTIOL et al. 2019; LIMDOLTHAMAND et al. 2023). A literatura apresenta diversos estudos que comprovam a eficiência de espécies de *Trichoderma*. Por exemplo, em experimentos de campo, a inoculação de *T. viride*, *T. longibrachiatum* e *T. reesei* com meia dose de fertilizante fosfatado promoveu um crescimento eficiente da soja (GALEANO et al., 2025). Além disso, *Trichoderma asperellum* demonstrou eficácia em condições salino-alcálinas, contribuindo para a redução do pH do solo, o aumento da atividade enzimática antioxidante e do teor de nutrientes, mantendo a homeostase metabólica em mudas de milho (FU et al., 2021). Também foi observado que *T. asperellum* promoveu o crescimento de milho sob condições de estresse hídrico (ESTÈVEZ-GEFFRIAUD et al., 2020).

2.5 Importância do milho (*Zea mays* L.) no Brasil

O milho é um dos principais cereais cultivados no Brasil, pertence à família *Poaceae*, com sua origem na América do Norte, possui grande capacidade de adaptação sendo assim cultivado em diferentes regiões do globo. Além disso, possui grande valor nutricional, fundamental para o setor agropecuário com valor socioeconômico, participando da produção de rações de aves e suínos, na produção de etanol, produção na alimentação humana, como farinhas e óleos (CONTINI et al. 2019).

Analogamente, o aumento populacional com estimativas de 9 bilhões de habitantes na Terra até 2050 causa a intensificação das práticas agrícolas por conta da demanda pela produção de alimentos (ELBASIOUNY et al. 2022). Em questão de produtividade, o milho é o segundo grão de maior importância no Brasil, que nas safras de 2022/2023 houve a produção de aproximadamente 131.892 milhões de toneladas de milho. Por conta disso, o Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de produção de milho (FIESP, 2019). Segundo a safra de 2022/23 os maiores produtores brasileiros são: Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais, sendo todos os estados da região Centro-Oeste (CONAB, 2024).

Por outro lado, o manejo inadequado de fertilizantes acarreta baixos níveis de produtividade, ao longo do ciclo de crescimento do milho que possui diversas fases de intensa absorção de nutrientes (GAGNON et al. 2020). Dada essa necessidade, o uso de fertilizantes é crucial na produção de milho, e são vitais para sustentar a produção global de alimentos (PRESTON et al. 2019). Com o uso excessivo dos fertilizantes fosfatados diversas problemáticas estão presentes na saúde do solo, o uso de novas tecnologias é indispensável para o aumento da aquisição de fósforo pelas plantas e assim melhor produtividade e qualidade dos solos da nossa região (BASÍLIO et al. 2022).

Portanto, o isolamento e a seleção de cepas de *Trichoderma* para estudos de potencial no controle biológico e solubilizador de fosfato são de grande importância, considerando especialmente que os produtos disponíveis no mercado ainda são bastante limitados. Dessa maneira, a utilização de

biofertilizantes a base de *Trichoderma* sp. seria uma maneira bioeconômica, ecológica e nova já que este fungo é utilizado geralmente para processos de biocontrole dando assim outra funcionalidade para os fungos presentes nesse gênero (LIMDOLTHAMAND et al. 2023).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de novos isolados de *Trichoderma* na solubilização de fosfato e promoção do crescimento vegetal.

3.2 Objetivos específico

- Selecionar isolados de *Trichoderma* com capacidade para solubilizar fosfato *in vitro*;
- Avaliar diferentes fontes de fertilizante comerciais para solubilização de fosfato;
- Otimizar a solubilização de fosfato, avaliando parâmetros como tempo e fonte fosfatada;
- Avaliar a produção das enzimas fitase e fosfatase ácida pelos fungos selecionados;
- Avaliar a presença de características relacionadas à promoção de crescimento vegetal como: produção de sideróforos e AIA;
- Avaliar a produção de ácidos orgânicos em meio sólido;
- Avaliar a tolerância a agrotóxicos por *Trichoderma* sp.;
- Avaliar a solubilização de fosfato em condições de estresse hídrico e salino com *Trichoderma* sp. G41;
- Avaliar a eficiência de *Trichoderma* sp. G41 na promoção de crescimento vegetal utilizando milho com diferentes níveis de adubação fosfatada, em casa de vegetação.

4. METODOLOGIA

4.1 Origem do isolados e manutenção dos microrganismos

Os fungos utilizados neste estudo são pertencentes a Coleção de Culturas de Fungos - Micoteca- do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande/MS, Brasil. Foram utilizados 22 isolados, todos pertencentes ao gênero *Trichoderma*. Os fungos foram mantidos através de repiques periódicos em placas de petri contendo meio sólido de Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e incubados em B.O.D. com fotoperíodo (12 horas) a 28 °C por 7 a 10 dias. Após o crescimento, os fungos foram armazenados em geladeira a 4 °C, podendo ser utilizados por um período de até 30 dias. Para o inóculo de todos experimentos, foram utilizados três discos de micélio com cinco milímetro, equivalente a uma concentração de $2,1 \times 10^8$ esporos mL⁻¹.

4.2 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp.

A capacidade dos isolados em solubilizar fosfato foi avaliada em meio líquido Pikovskaya (1948), utilizando Ca₃(PO₄)₂, e fertilizante comercial termofosfato fino (14% P₂O₅). Em frascos erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 50 mL de meio contendo: Glicose 1%; (NH₄)₂SO₄ 0,05%; NaCl 0,02%; MgSO₄.7H₂O 0,01%; KCl 0,02%; Extrato de levedura 0,05%; MnSO₄.H₂O 0,0002%; FeSO₄.7H₂O 0,0002%; Ca₃(PO₄)₂ 0,05%. As culturas foram incubadas em shaker sob agitação constante de 110 rpm por 7 dias a 28 °C. O meio foi filtrado a vácuo, centrifugado a 8.609 x g durante 10 min o sobrenadante utilizado para mensuração do pH final em pH metro digital e quantificação de P solúvel.

Para a dosagem de fósforo solúvel, o experimento foi realizado em microplacas 96 poços, nas quais foram adicionados 10 µL sobrenadante, 190 µL de água destilada e 32 µL de reagente de cor para quantificação de fósforo solúvel seguindo a metodologia descrita por Murphy & Riley (1962) utilizando o método ácido ascórbico-molibdato. O tubo controle teve a substituição do extrato por um meio não inoculado, enquanto o branco, contendo apenas água e reagente de cor, foi utilizado para ajustar o zero do espectrofotômetro (Genesys 10S- Thermoscientific). Após 10 min de reação as absorbâncias foram medidas a 880 nm utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®), sendo a concentração expressa em µg de P mL⁻¹, e KH₂PO₄ utilizado para curva padrão.

4.3 Avaliação do tempo de solubilização de diferentes fontes de fosfato por *Trichoderma* spp.

Para avaliar o tempo de solubilização de diferentes fontes fosfatadas foi realizado meio Pikovskaya (1948) seguindo metodologia do item 4.2 utilizando-se: fosfato tricálcico (Ca₃(PO₄)₂),

fosfato de alumínio (AlPO_4) e fosfato de ferro (FePO_4). As culturas foram incubadas em shaker sob agitação constante de 110 rpm e alíquotas retiradas em 3, 5, 7, 10 e 12 dias de crescimento. As amostras coletadas em diferentes tempos foram centrifugadas a $8.600 \times g$ durante 10 minutos e o sobrenadante utilizado para dosagem de fósforo solúvel como descrito no item 4.4.

4.4 Solubilização de fosfato a partir de fertilizantes fosfatados

Os quatro fungos com maior capacidade de solubilização de P (GT32, G41, G43 e G50), foram utilizados para processo de otimização. A padronização seguiu a metodologia *one-factor-at-a-time* (OFAT), a qual foi empregada para determinar um teste por vez a fim da padronização da melhor fonte fosfatada. Foram testados cinco fertilizantes fosfatados: Termofosfato fino (14% P_2O_5); Termofosfato granulado (17% P_2O_5); Termofosfato Fort Tal Qual 11% (P_2O_5); MV27 27% (P_2O_5) e e SuperFosfato (18% P_2O_5). As condições de cultivo foram as mesmas descritas no item 4.2

4.5 Produção de enzimas fitase e fosfatase ácida

A produção das enzimas fitases e fosfatases ácida, foi analisada em 50mL de meio *Trichoderma* liquid enzyme (TLE) (RAMADA et al. 2016) composto por: 0,1% de Peptona, 0,03% de ureia, 0,2% KH_2PO_4 , 0,14% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,03% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e uma solução de elementos traços a 2% contendo 0,025% FeSO_4 , 0,0085% MnSO_4 , 0,007% ZnSO_4 e 0,01% de CaCl_2 . Como fonte de carbono foram utilizados 1% de substratos de pastagem em produções agrícolas, como palha de arroz, palha de milho e bagaço de cana. Os frascos foram incubados com três discos do micélio com diâmetro de 5 milímetros e submetidos a condições de agitação constante (110 rpm) a 30 °C. Após 7 dias de crescimento os meios foram filtrados a vácuo e centrifugados a $8.600 \times g$ por 10 min. O sobrenadante obtido foi utilizado para quantificação enzimática.

4.6 Ensaio enzimáticos

4.6.1 Dosagem de fitase

Para dosagem da atividade de fitase foi utilizado o método descrito por Heinonen (1981). Em um tubo de ensaio foi adicionado 250 μL de tampão Acetato de Sódio 100 mM pH 5,0 com ácido fítico (Sigma-Aldrich) 10 mM, 45 μL de H_2O destilada e 5 μL do extrato enzimático. O material foi incubado por 30 minutos a 45 °C. Após esse período foi adicionado a solução de parada contendo 1,5 mL de H_2SO_4 5N, molibdato de amônio 10 mM e acetona nas proporções 1:1:2, e 100 μL de ácido cítrico 1 M. A absorbância foi medida a 355 nm utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®). Para a curva de calibração foi empregado uma solução de KH_2PO_4 . Uma unidade de

atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de 1 μmol de produto por minuto de reação.

4.6.2 Dosagem de fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida foi determinada conforme descrito por Leitão et al (2010) com modificações. A reação consiste em 50 μL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8, 40 μL do substrato *p*-nitrofenil fosfato (Sigma-Aldrich) 5mM e 10 μL do extrato enzimático. As amostras foram incubadas por 10 min a 37 °C, e após esse período a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de NaOH 0,1 M. Para o branco a solução da enzima é substituída pelo tampão de acetato. A absorbância foi medida a 405 nm utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®). Uma unidade de atividade (1U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de *p*-nitrofenolato por minuto. Para a realização da curva foi utilizado o *p*-nitrofenol a 36 mM e realizada leitura 410 nm.

4.7 Caracterização dos isolados para promoção de crescimento vegetal

4.7.1 Produção de sideróforos

Para preparo do meio líquido foi utilizado metodologia modificada de Czapek (1903) isento de ferro. Para isso, toda vidraria foi deixada de molho em HCl 3 M, e lavadas 3 vezes em água deionizada. Os inóculos contendo meio czapek ficaram em agitação constante de 110 rpm por 7 dias a 28 °C. Após esse período, foram retiradas aliquotas de 2 mL e centrifugadas por 10 min a 8.609 x g. A reação foi realizada em microplaca na proporção 1:1, composto por 100 μL do sobrenadante e 100 μL de CAS-Fe. Para o preparo da solução de CAS-Fe foi utilizado 25 mL de HDTMA 10 mM, 1,5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM em HCl 10 mM, 7,5 mL de CAS 2 mM e 50 mL de piperazina, completando o volume para 100 mL de solução corante CAS-Fe (SCHWYN et al.1987).

Após 45 minutos de incubação em temperatura ambiente e no escuro, a leitura foi realizada em leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®) a 630 nm. O branco foi preparado sem a adição de filtrado das culturas (amostra de referência). A porcentagem de sideróforos foi calculada subtraindo os valores de absorbância das amostras pelo valor de absorbância da amostra de referência e multiplicados por 100, utilizando a seguinte equação: $\%SU = (Ar - As) \div Ar \times 100$, onde Ar é absorbância de referência (somente solução de CAS) e As absorção da amostra (MACHUCA et al. 2003).

4.7.2 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

A capacidade dos isolados de produzir a auxina ácido indol-3-acético foi avaliada em frascos de 125 mL contendo 25 mL de meio Czapek (1903) modificado: Glicose (1%); extrato de levedura (0,1%); K_2HPO_4 (0,1%); $MgSO_4$ (0,05%); $FeSO_4$ (0,001%); pH 7.0. O meio de cultura foi suplementado com L-triptofano (L-Trp) a 5 mM (p/v) como precursor para a biossíntese do fitormônio. O inóculo foi realizado utilizando-se três discos de micélio de 5 mm da cultura, e os isolados cultivados em agitador orbital (110 rpm), por 7 dias horas a 28 °C no escuro. As alíquotas de 2 mL foram coletadas e centrifugadas durante 10 min a 8.600 x g e o sobrenadante obtido foi utilizado para quantificação do fitormônio. Em placas de 96 poços foram adicionados 100 µL do sobrenadante e 100 µL do reagente de Salkowski (2% de $FeCl_3$ 0.5 M, 98% de $HClO_4$ a 35%)(GORDON e WEBER, 1951). As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 30 min em ausência total de luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em um leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®) utilizando um comprimento de onda de 530 nm. O preparo da curva-padrão foi realizado com AIA comercial (Sigma-Aldrich®) em quantidades de 1, 5, 10, 20, 40, 80 e 100 µg mL⁻¹.

4.8 Produção de ácidos orgânicos

A produção dos ácidos orgânicos seguiu a metodologia modificada de Dezam (2017). Foi utilizado o meio sólido de solubilização Pikovskaya (1948) modificado, com a adição de 1% do indicador de pH, o verde de bromocresol. Os fungos foram inoculados e incubados em B.O.D com fotoperíodo de 12 horas a 28°C. O crescimento foi acompanhado por até 48 horas e realizado a medição do halo com auxílio de um paquímetro. O aparecimento de uma zona amarelada indica a diminuição de pH, analogamente à produção de ácidos orgânicos.

4.9 Tolerância de *Trichoderma* sp. a agrotóxicos

Foi avaliada a tolerância das cepas de *Trichoderma* a agrotóxicos como: atrazina, haloxyfop-p-metil (Glint), glifosato (ZAPP), glufosinato de amônio (G-amônio), e etiprol (Curbix). A concentração de cada produto químico no meio BDA correspondia à dose de campo indicada pelo fabricante (Tabela 1). As placas foram incubadas em BOD a 28° C com fotoperíodo de 12 horas, durante 7 dias. O diâmetro da colônia (em cm) foi medido para avaliação de crescimento com auxílio de um paquímetro. Os controles seriam o crescimento sem a presença de agrotóxicos e considerados como 100%. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 1. Agrotóxicos utilizados no experimento de tolerância em meio sólido, indicando sua ação, princípio ativo (PA), volumes (mL) presente no meio, concentração [PA] seguindo a dose indicada (DI) pelos fabricantes.

Agrotóxicos	Ação	PA	Volume	[PA]	DI
Atrazina	Herbicida	Atrazina	22,5 mL L ⁻¹	500 g L ⁻¹	4,5 L ha ⁻¹
Glint	Herbicida	Haloxifope-P-metílico	2.25 mL L ⁻¹	125 g L ⁻¹	0,45 L ha ⁻¹
ZAPP QI 620	Herbicida	N-(phosphonomethyl) glycine	10 mL L ⁻¹	620 g L ⁻¹	2,0 L ha ⁻¹
G-ammonium	Herbicida	Glufosinato-sal amônio	de 10 mL L ⁻¹	200 g L ⁻¹	2,0 L ha ⁻¹
Curbix	Inseticida	Etiprole	1,25 mL L ⁻¹	200 g L ⁻¹	0,25 L ha ⁻¹

4.10 Solubilização de fosfato em condições de estresse salino e hídrico

A solubilização de fosfato sob condições de estresse foi avaliada utilizando o meio líquido Pikovskaya (1948). Para simular estresse salino, adicionou-se NaCl nas concentrações de 150 mM e 300 mM seguindo metodologia de Galeano et al. (2023). O estresse hídrico foi mimetizado com PEG 600 nas concentrações de -0,5 MPa e -1 MPa. Aliquotas foram coletadas após 3, 5, 7 e 10 dias de crescimento, centrifugadas a $3.600 \times g$ por 3 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de fósforo solúvel, conforme descrito no item 4.2.

4.11 Experimento em casa de vegetação de promoção de crescimento vegetal por *Trichoderma* sp. G41 em milho

A fim de avaliar o efeito do isolado *Trichoderma* sp. (G41) na promoção de crescimento vegetal e melhoramento da qualidade do solo, foi realizado um experimento em casa de vegetação de sombrite com irrigação automatizada no período de agosto/2024. O fungo foi previamente crescido em meio BDA inclinado por 7 dias a 28 °C, e em seguida uma suspensão de conídios foi preparada em água destilada estéril, e a concentração ajustada para $2,1 \times 10^8$ esporos mL⁻¹ utilizando câmara de Neubauer em microscópio óptico. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e 10 repetições: (1) controle sem inoculação e meia dose de fertilizante; (2) controle sem inoculação e dose completa de fertilizante; (3) inoculação com isolado *Trichoderma* sp. G41 com meia dose de fertilizante (4) inoculação com isolado *Trichoderma* sp. G41 com dose

completa de fertilizante. A fertilização foi realizada da seguinte forma: 22,3 mg de Ureia/vaso; 50 mg de KCl/vaso; 22,23 mg de P₂O₅ (18%) para dose completa e 11,12 mg para meia dose em cada vaso.

Em 50 sementes de milho ADV 9339 foram aplicados 1 mL de suspensão com conídios do isolado *Trichoderma* sp. G41. Em vasos de capacidade de 1L foram semeadas 5 sementes de milho. Após 7 dias foi realizado o desbaste, deixando três plantas por vaso, totalizando 30 plantas por tratamento. Após 30 dias da semeadura, parte aérea e raiz das plantas foram separados para as análises dos parâmetros de crescimento. Os parâmetros avaliados foram: altura da planta, peso fresco e seco da parte aérea e da raiz, teores de clorofila, carotenóides, fenólicos, flavonóides, aminoácidos livres, açúcares redutores totais, dosagem das enzimas fitase e fosfatase ácida do solo, dosagem de FDA.

4.11.1 Dosagem de teor de clorofila e carotenóides

Para dosagem do teor de clorofila e carotenóides foram pesados 300 mg de matéria fresca das folhas de milho, foram macerados em nitrogênio líquido, após esse processo foram adicionados 1,5 mL de acetona 85%; o extrato foi armazenado em microtubo (2,0 mL) envolto com papel alumínio para preservar a amostra da entrada de luz, e centrifugado a 3600 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo falcon de 15 mL e com o *pellet* foi adicionado acetona 85% e centrifugado a 3600 x g até que houvesse o descoloramento da amostra. Após o *pellet* ficar descolorido foi acertado o volume dos tubos falcon para 10 mL com acetona e realizado a leitura em espectrofotômetro em três comprimentos de ondas diferentes: 645; 663 e 470 nm (ROSS, 1974). Para cálculo foi utilizado equação descrita por Lichtenthaler e Buschmann (2001).

4.11.2 Dosagem de flavonóides totais

Os flavonóides foram quantificados seguindo metodologia de Assis (2020) adaptada de Woisky e Salatino (1998). Para a extração da amostra foi realizada a pesagem de 300 mg de matéria fresca foliar e macerada em nitrogênio líquido. Ao material foram adicionados 5 mL de metanol 80%, em tubos falcon envoltos com papel alumínio, as amostras foram deixadas em repouso por 1 hora, centrifugadas por 3000 x g por 15 minutos, e o sobrenadantes utilizados para quantificação.

A reação foi composta por 500 µL de AlCl₃ 2% diluídos em metanol 80% (v/v); 500 µL da amostra extraída e 2500 µL de etanol P.A. Os tubos foram homogeneizados em vortex e deixados em repouso por 1 hora à temperatura ambiente. A leitura das absorbâncias foi realizada a 420 nm utilizando espectrofotômetro (Genesys 10S- Thermoscientific). O branco foi preparado com a substituição da amostra por metanol 80%. A curva padrão foi preparada com diferentes concentrações de rutina a partir de 1 mg mL⁻¹.

4.11.3 Dosagem de compostos fenólicos

Foram pesados 200 mg de matéria fresca foliar e macerados em nitrogênio líquido e adicionados 5 mL de metanol a 80%; o extrato foi transferido para falcons coberto de papel alumínio e incubados por 1 hora, centrifugados por 3000 x g por 15 min a 25 °C. Em tubos de ensaios foi preparado a reação com 2 mL de Na₂CO₃ 2%, 150 µL de Folin-Ciocalteu e 200 µL do extrato. Os tubos foram homogeneizados em vortex e mantidos em repouso por 1 h a temperatura ambiente, e leitura realizada a 750 nm em espectrofotômetro (Genesys 10S- Thermoscientific). Para o preparo da curva padrão foi utilizado ácido gálico a partir de 1 mg mL⁻¹ (ARNALDOS et al. 2001).

4.11.4 Dosagem dos aminoácidos totais

Foram pesados 200 mg de matéria fresca foliar e macerados em nitrogênio líquido e adicionados 5 mL de metanol a 80%; o extrato foi transferido para falcons coberto de papel alumínio e incubados por 1 hora, centrifugados por 3000 x g por 15 min a 25 °C. Em tubos de ensaio foi adicionados 1000 µL da solução de ninhidrina 1%, 500 µL de tampão citrato (pH 5,2), 450 µL de metanol 80%, 50 µL do extrato. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 15 minutos a 95 °C. Após a incubação foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Genesys 10S- Thermoscientific) a 570 nm, o branco foi preparado substituindo o extrato por metanol 80%. Uma curva padrão foi realizada utilizando diferentes concentrações de L-leucina (1 mg mL⁻¹)(SANDHYA, et al., 2010).

4.11.5 Dosagem dos açúcares redutores totais

Foram pesados 200 mg de matéria fresca foliar e macerados em nitrogênio líquido e adicionados 5 mL de metanol a 80%; o extrato foi transferido para falcons coberto de papel alumínio e incubados por 1 hora, centrifugados por 3000 x g por 15 min a 25 °C. Em ensaio foi realizado em microplacas pelo método de DNS, foram adicionados: 10 µL do extrato; 90 µL de água destilada e 100 µL do reagente de DNS. As amostras foram incubadas por 10 minutos a 100 °C, após esse período foi realizada leitura em (Genesys 10S- Thermoscientific) a 540 nm. O branco foi preparado substituindo o extrato por água destilada. Uma curva padrão foi realizada utilizando diferentes concentrações de glicose (1 mg mL⁻¹) (MILLER, 1959).

4.11.6 Dosagem de fosfatase ácida do solo

Para dosagem de fosfatases ácida do solo foi utilizado 100 mg de solo, 4 mL de tampão acetato de sódio, 100mM pH 5,0 e 100 µL de *p*-nitrofenol fosfato (*p*-NPP) 25 mM. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e incubadas a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida 100 µL de CaCl₂ 0,5 mM e 4 mL de NaOH 0,1 M e centrifugadas a 3000 x g por 3 min. O sobrenadante foi

utilizado para leitura a 410 nm. A curva padrão foi realizada com *p*-nitrofenol (*p*-NP) 1 mg/ mL, seguindo a metodologia de Tabatai & Bremner (1969). As atividades enzimáticas foram expressas em μg de *p*-NPP por g^{-1} de solo por h^{-1} .

4.11.7 Dosagem de fitase do solo

A realização da dosagem de fitase foi realizada com a pesagem de 25 mg de solo, 1,25 mL de tampão acetato de sódio 100mM pH 5,0 contendo ácido fítico 10 mM, homogeneizados em vortex e incubados em banho maria a 50 °C por 1 hora. Após esse período foi adicionado 1,5 mL de solução de parada descrita no item 4.7.1 e 100 μL de ácido cítrico. O material foi agitado em vortex, centrifugado a 4.000 rpm por 10 min. 200 μL do sobrenadante foi utilizado para leitura da absorbância a 355 nm em leitor de microplacas. O branco da amostra foi preparado com a adição do substrato após período de incubação e curva padrão realizada com KH_2PO_4 200 μM . As atividades enzimáticas foram expressas em mg de P por g^{-1} de solo por h^{-1} .

4.11.8 Avaliação da atividade microbiana pela hidrólise de acetato de fluoresceína

A realização da dosagem de hidrólise de FDA foi pesado 1,25 g de solo rizosférico em erlenmeyer de 125 mL, adicionados 5 mL de tampão fosfato de potássio 60 mM (pH 7,6) e 0,05 mL de FDA (2 mg/mL). Então as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora a 25° C, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL de acetona P.A., as amostras foram centrifugadas a 3000 x g por 10 min e o sobrenadante utilizado para leitura em espectrofotômetro a 490 nm. O branco é preparado sem a presença de solo. Para o preparo da curva padrão é utilizado FDA hidrolisado em diversas concentrações (0, 50, 100, 200, 300, 400), sendo o resultado expresso em μg de FDA hidrolisado por grama de solo (GHINI et al. 1998).

4.12 Análise dos resultados e análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados estão expressos em média e desvio padrão. Os dados foram analisados pelo teste t de *Student* ou análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey para análises com um tratamento ou Scott Knott para análise de diferentes tratamentos, usando Graphpad Prism 8 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA) e o software SISVAR. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato e fertilizantes por *Trichoderma* spp.

Neste estudo, 22 isolados do gênero *Trichoderma* foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ conforme demonstrado na Tabela 3. Todos isolados demonstraram solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ com valores que variam de 261,6 a 831,4 $\mu\text{g P mL}^{-1}$. No entanto as cepas: GT31; GT44, G31, G41 e G50 foram mais eficientes na dissolução do fosfato na presença de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ apresentando valores entre 762,93 a 831,46 $\mu\text{g P mL}^{-1}$. Para selecionar as cepas mais promissoras no processo de solubilização, foi empregado o fertilizante comercial termofosfato fino (14% P_2O_5), um fertilizante de difícil liberação de fosfato, refinando assim a seleção dos isolados. Também foi observado a diminuição do pH do meio de cultivo pelas estirpes avaliadas, chegando ao pH 2,71 pelo isolado G41, indicando acidificação, responsável pelo processo de solubilização do fosfato.

Em estudo com *Gongronella butleri*, foi observada uma solubilização de 417,33 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ (DOILOM et al., 2020). Já o fungo *Trichoderma gamsii* apresentou 328,4 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ (AMPERES et al., 2022). Em comparação, os isolados de *Trichoderma* spp. analisados neste trabalho demonstraram maior capacidade de solubilização, evidenciando-se como mais eficientes nesse processo em relação a *G. butleri* e *T. gamsii*.

Os fungos do gênero *Trichoderma* desempenham um papel crucial na reciclagem de nutrientes, com um foco particular na biodisponibilidade de fósforo, um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento vegetal auxiliando em processos agrícolas promovendo um sistema agroecológico sustentável (GALEANO et al., 2025; BONONI et al. 2020). Os isolados GT32; G41; G43 e G50 foram eficazes na solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e termofosfato fino, portanto selecionados para os experimentos seguintes.

Tabela 2. Solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e fertilizante termofosfato fino pelos isolados de *Trichoderma*.

Isolados	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$		Termofino	
	$\mu\text{g P mL}^{-1}$	pH	$\mu\text{g P mL}^{-1}$	pH
Controle	0,058±0,02 e	7,0 a	5,0±0,5 e	5,8 b
GT4	547,4±3,29 d	6,7 a	8,3±10 e	3,8±0,05 a
GT7	623,7±2,98 c	6,7 a	19,0±2,6 c	2,7±0,05 a
GT8	529,3±1,46 d	6,4 a	17,0±0,5 c	3,2±0,3 a

GT10	743,1±4,63 c	3,0 b	13,0±1,03 d	4,0±1,35 ab
GT12	261,6±0,18 e	6,3 a	NDA f	3,8±0,04 a
Q14	601,2±9 c	6,2 a	3,1±0,6 f	6,5±0,5 b
GT16	698,2±1 b	6,2 a	22,0±0,6 b	4,2±0,05 a
GT19	462,9±0,97 d	6,7 a	15,0±4,3 c	3,6±0,04 a
GT22	642,6±3 c	6,0 a	25,0±4,8 a	3,4±0,007 a
GT27	527,1±1 d	6,3 a	16,0±4,8 c	4,3±0,05 a
GT28	494,8±0,73 d	6,3 a	8,0±0,4 e	3,6±0,01 a
GT29	617,6±4,32 c	6,5 a	10,3±1,07 e	4,2±2,03 a
GT31	831,4±5,79 a	6,4 a	14,0±3,83 d	3,5±0 a
GT32	684,9±4 b	6,3 a	26,0±0,09 a	3,4±0,02 a
GT34	658,1±4 c	6,2 a	2,0±0,6 f	4,6±0,07 a
GT38	737,0±0,06 b	6,3 a	7,0±0,06 e	2,8±0,04 a
GT41	743,1±4 b	6,0 a	18,0±0,02 c	3,0±0,007 a
GT44	762,9±5 a	6,1 a	15,0±21 d	4,2±0,05 a
G31	831,0±6 a	6,0 a	19,0±3 c	3,0±0,05 a
G41	822,4±2 a	6,0 a	21,0±0,2 b	2,7±0,03 a
G43	674,5±2 b	6,5 a	28,4±2,43 a	3,4±0,04 a
G50	762,9±5 a	6,0 a	25,0±4 a	4,2±0,05 a

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados por Scott Knott.

5.2 Avaliação do tempo de solubilização utilizando diferentes fontes fosfatadas por *Trichoderma* sp.

A Figura 3 apresenta um *Heatmap* com os resultados da solubilização de fosfato em três períodos diferentes: 5, 7 e 10 dias, utilizando três fontes fosfatadas: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 . Os isolados GT32, G41, G43 e G50 demonstraram eficiência no processo de solubilização ao longo dos dias. O isolado GT32, após 10 dias de incubação, alcançou uma solubilização de $1028,9 \mu\text{g P mL}^{-1}$ na presença de AlPO_4 . Já o isolado G41 destacou-se ao solubilizar $696,55 \mu\text{g P mL}^{-1}$ em $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ com apenas 3 dias de crescimento. Além disso, observou-se que o perfil de solubilização variou conforme a fonte de fosfato utilizada, com altas concentrações de fósforo solúvel em $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e AlPO_4 , enquanto FePO_4 apresentou níveis mais baixos. O isolado G43, por exemplo, alcançou $279,74 \mu\text{g P mL}^{-1}$ em FePO_4 após 10 dias de crescimento.

O processo da solubilização de fosfato por microrganismos ocorre em diferentes tempos dependendo de seu crescimento, substrato disponível para seu metabolismo e também pH do meio (ALORI et al., 2017). Em trabalho de Adhikari et al. (2019) avaliaram a solubilização de diferentes fontes de fosfato por sete dias pelos fungos do gênero *Penicillium* obtendo o máximo $\mu\text{g P mL}^{-1}$, 53,3 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ e 57,11 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ para $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 , respectivamente. Neste trabalho o isolado G43 apresentou expressiva solubilização com valores de; 893,10 $\mu\text{g P mL}^{-1}$; 1137,07 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ e 230,17 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ para $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 , respectivamente com apenas cinco dias de solubilização. Esses valores representam um desempenho superior ao relatado por Adhikari et al. (2019), evidenciando o elevado potencial do isolado G43 para a solubilização de fosfato.

Além dessa eficiência em diferentes fontes fosfatadas podemos evidenciar a velocidade de solubilização quando comparados com bactérias, Sanchez-Gonzalez et al. (2023) estudando o processo de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* obteve 225 e 274 $\mu\text{g P mL}^{-1}$, respectivamente, com 8 dias de crescimento, sendo que os fungos utilizados neste trabalho solubilizaram valor maior com apenas 3 dias de solubilização, como por exemplo o isolado GT32 que obteve 747,70 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ na presença de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

Vale ressaltar que a solubilização de diferentes fontes fosfatadas é um fator importante já que solos do cerrado apresentam grande concentração de alumínio. A capacidade dos isolados de solubilizar essas fontes demonstra seu amplo espectro de aplicações, levando em consideração a característica físico-química dos solos e apresentam capacidade de atuação em solos alcalinos com presença de cálcio (LIU et al. 2021; PROCÓPIO et al. 2021).

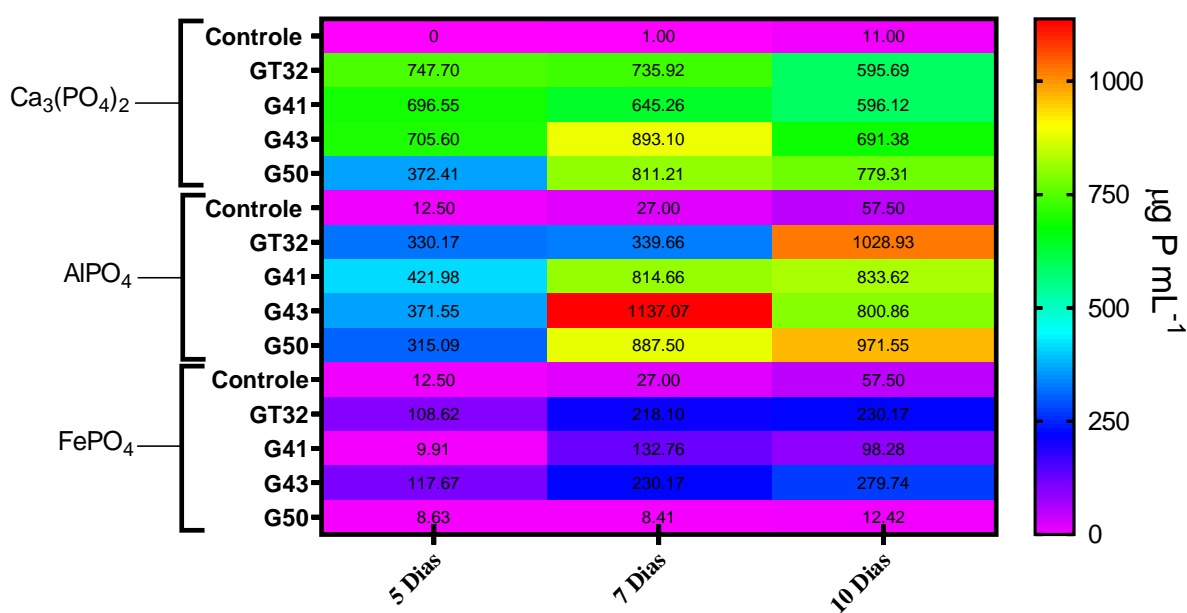


Figura 3. Heatmap do tempo de solubilização em diferentes fontes de fosfato: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 e FePO_4 .

5.3 Solubilização de fertilizantes fosfatados por *Trichoderma* sp.

Na Figura 4 é possível observar a solubilização de diferentes fertilizantes comerciais fosfatados por *Trichoderma*. Os isolados GT32 ($13.706 \mu\text{g P mL}^{-1}$), G41 ($12.887 \mu\text{g P mL}^{-1}$) e G43 ($13.060 \mu\text{g P mL}^{-1}$) demonstraram solubilização superior em comparação ao seu controle ($5,008 \mu\text{g P mL}^{-1}$) na presença do fertilizante termofosfato tal qual (Figura 4A). O mesmo foi observado na presença de termofosfato granulado (Figura 4B) e MV27 (Figura 4C). O isolado GT32 ($680,172 \mu\text{g P mL}^{-1}$) se destacou em solubilização de superfosfato simples (Figura 4D).

Cada tipo de fertilizante fosfatado possui uma cinética específica de liberação de fosfato no meio, podendo ser de liberação rápida (como MV27 27% P_2O_5 e superfosfato 18% P_2O_5) ou de liberação lenta (como termofosfato granulado 17% P_2O_5 e termofosfato fort tal qual 11% P_2O_5). Essas características podem ser aproveitadas em cada tipo de solo, como por exemplo, em solos mais pobres em fósforo são aplicados os fertilizantes com alta liberação de fósforo.

Contudo, a solubilização dos fertilizantes, também conhecidos como rochas fosfáticas, revelou-se um processo mais complexo (MENDES et al. 2020). Observou-se mais uma vez a significativa redução no pH do meio de cultivo de 7,0 para 3,0 após sete dias de inoculação com isolado G41 (dados não apresentado), sugerindo uma maior produção de ácidos orgânicos, liberação de prótons e troca gasosa (O_2/CO_2) durante o processo de respiração pelas cepas fúngicas (RAWAT et al., 2021). Os ácidos são essenciais para tornar o fosfato disponível para o crescimento e desenvolvimento dos fungos, indicando sua capacidade de viabilizar a biodisponibilidade do fosfato (KELLY et al. 2023).

Em estudo realizado por Qarni et al. (2021) com solubilização de rocha fosfática (28% P_2O_5) obteve um resultado semelhante de $693.16 \mu\text{g P mL}^{-1}$ com *Penicillium oxalicum*. Em outros trabalhos relatando a eficiência da solubilização de fertilizantes por fungos, como *Aspergillus tubingensis* apresentou uma solubilização de $510.2 \text{ mg P L}^{-1}$ e pH final chegando a 3.0 na presença de rocha fosfática (LOPEZ et al. 2020). Em trabalho de Galeano et al. (2025) os fungos *T. viridie*, *T. longibrachiatum*, *T. ressei* demonstram uma eficiente solubilização de nutrientes, destacando a capacidade de solubilização de fosfato desses isolados.

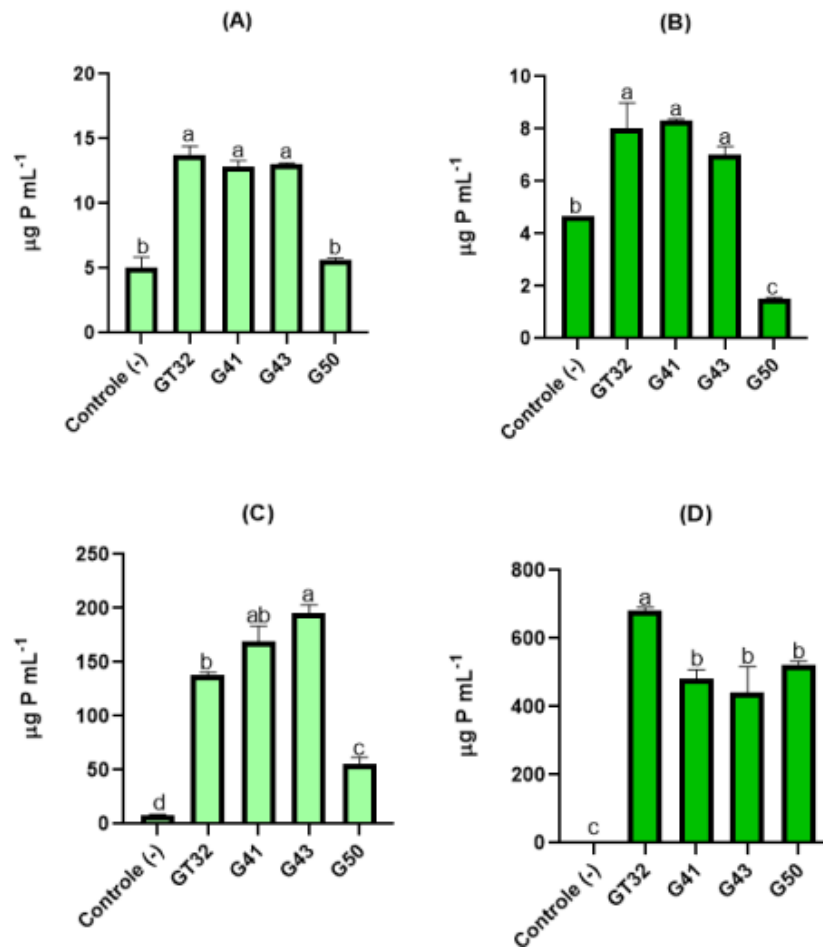


Figura 4. Solubilização de fertilizantes comerciais por *Trichoderma* sp. (A) termofosfato tal qual, (B) termosfosfato granulado, (C) MV27, (D) superfosfato simples. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados pelo teste de Tukey.

5.4 Produção das enzimas fitase e fosfatase ácida

Figura 5 apresenta a produção das enzimas fosfatase ácida e fitase pelos isolados. Os maiores níveis de fosfatase ácida foram observados nos isolados GT32 ($7,22 \text{ U mL}^{-1}$) e G50 ($7,38 \text{ U mL}^{-1}$) quando cultivados na presença de palha de milho (P.M.). Quanto à produção de fitase, todos os isolados demonstraram capacidade enzimática, com destaque para GT32 ($1,61 \text{ U mL}^{-1}$) em palha de arroz e G50 ($1,65 \text{ U mL}^{-1}$) em palha de milho. Zhao et al. (2015) demonstraram em seu trabalho com *Trichoderma asperellum* obteve-se o máximo de atividade de fitase com $0,17 \text{ U mL}^{-1}$ e $7,15 \times 10^{-3} \text{ U mL}^{-1}$ para fosfatase, demonstrando mais uma vez que os isolados presentes neste estudo foram melhores produtores dessas enzimas, portanto alavancando o processo de mineralização do P_o .

Os substratos utilizados foram aqueles presentes nas principais pastagens de plantações, como palha de arroz, palha de milho e bagaço de cana. As enzimas são importantes no processo de mineralização de P_o do ciclo ecológico do fósforo. O P_o imobilizado em membranas biológicas, ácidos

nucleicos e fitato é retirado por meio de enzimas fosfatases e fitases produzidas por organismos decompositores. Dessa forma, o P_o pode retornar para o ambiente para que seja absorvido tanto pelo organismo vegetal como microbiota, favorecendo a saúde do solo (SANG, 2023).

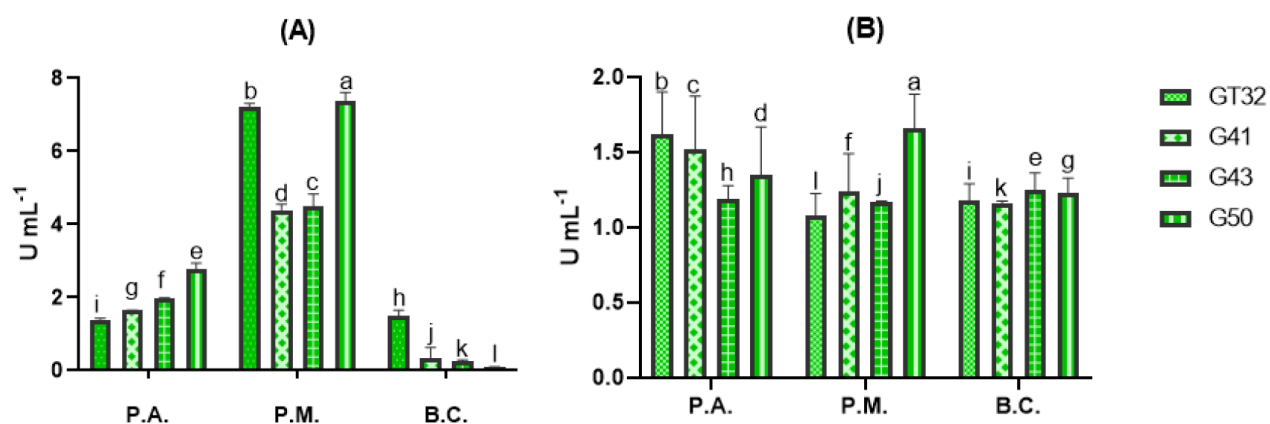


Figura 5. Produção das enzimas fosfatase ácida (A) e fitase(B) em palha de arroz (P.A.); palha de milho (P.M.) e bagaço de cana (B.C.) pelos isolados de *Trichoderma*. As atividades estão expressas em unidades por mL (U mL⁻¹). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

5.5 Produção de sideróforos pelos isolados de *Trichoderma* sp.

Conforme apresentado na Figura 6, os isolados GT32, G41, G43 e G50 produziram 75%, 74%, 67% e 57% de U sideróforos, respectivamente. Galeano et al. (2023) relataram a produção de 48% de sideróforos pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. *Aspergillus* sp. e *Lecanicillium* sp. produziram 63.7 e 60.6 % de sideróforos, respectivamente (CHAUDHARY et al. 2023). Esses resultados são inferiores aos descritos neste trabalho, salientando a qualidade e versatilidade de promotores de crescimento vegetal dos isolados de *Trichoderma* estudados.

Sideróforos são moléculas de baixo peso molecular que possuem ação quelante de metais. Essas moléculas estão presente em diversos papéis no solo, e importantes no controle biológico impedindo a absorção de Fe por agentes patogênicos, biorremediação de solos com altas concentrações de metais, e por fim no promovendo diretamente o crescimento vegetal se ligando metais complexados, como fosfato de ferro e fosfato de alumínio e assim disponibilizando o P para absorção (ETESAMI et al. 2021).

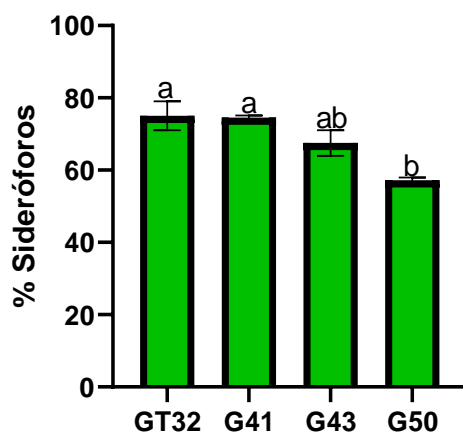


Figura 6. Produção de sideróforos por linhagens de *Trichoderma* sp. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados pelo teste de Tukey.

5.6 Produção do fitohormônio ácido indol-3-acético pelos isolados de *Trichoderma* sp.

Os três isolados de *Trichoderma* sp. demonstraram a produção de AIA conforme demonstrado na Figura 7, enquanto que o isolado G43 foi o único que não produziu AIA. O ácido indol-3-acético, uma auxina vegetal que auxilia diretamente no desenvolvimento radicular vegetal, melhorando a estrutura das raízes promovendo uma melhor absorção de nutrientes e água (SANÓ et al. 2022). A produção desse fitormônio se encontra por duas vias: a independente de triptofano e a dependente desse aminoácido. Para os fungos é encontrado na literatura geralmente a produção pela via dependente de triptofano (KESWANI et al. 2020).

Abdenaceu et al. (2022) com *Trichoderma harzianum* obteve a produção de 21.15 ug mL^{-1} de AIA nomeando-o como efetivos biofertilizantes, no entanto as cepas de *Trichoderma* spp. utilizados nesse trabalho apresentaram o dobro da produção do fitohormônio. Galeano et al. (2023) avaliaram a produção de AIA pelo fungo *Aspergillus niger* observaram a produção na presença de triptofano (0,1%) com $32,65 \text{ ug AIAI mL}^{-1}$. Além disso, outros parâmetros também foram avaliados como pH e tempo de incubação sendo o pH ótimo de 5,0 e o melhor tempo de produção com 4 dias de crescimento, fatores o qual modulam a produção do fitohormônio (GALEANO et al. 2021)

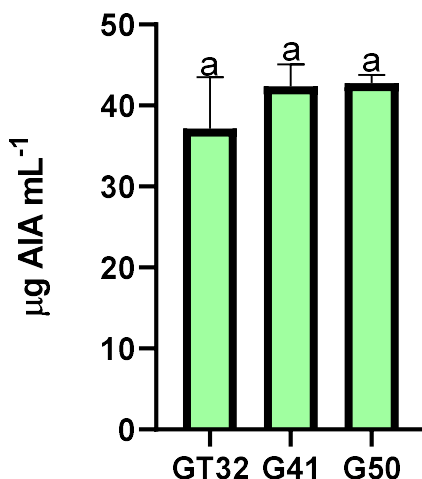


Figura 7. Produção de AIA por linhagens de *Trichoderma* sp. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados pelo teste de Tukey.

5.7 Avaliação da produção de ácidos orgânicos

Os isolados selecionados apresentaram a produção dos ácidos orgânicos com apenas 48 horas de crescimento, alcançando valores de pH na escala de 3,45-4,29, conforme observado na Tabela 4. O isolado GT32 se destacou na produção de ácidos orgânicos, atingindo o pH final de 3,45 (+++). Dezam et al. (2017) demonstraram êxito com esse experimento na produção de ácidos orgânicos utilizando 35 isolados fúngicos, sendo o melhor pertencente ao gênero *Aspergillus* sp. Chaudhary et al.(2023) também demonstraram que os isolados fúngicos do gênero *Aspergillus* sp. e *Lecanicillium* sp. diminuíram o pH do meio indicando o aparecimento da zona amarelada.

A produção de ácidos orgânicos, é um dos principais mecanismos no processo de solubilização de fosfato, que auxiliam na redução do pH, e conseqüentemente promovem a liberação do fosfato complexado. Essas moléculas orgânicas, provenientes do metabolismo fúngico, atuam como agentes quelantes, liberando o fosfato complexado tornando-o disponível para absorção pelas plantas (MENDES et al. 2020). Vale ressaltar que os fungos se destacam no processo de solubilização por produzirem uma ampla variedade de ácidos orgânicos, em comparação com as bactérias, que tendem a produzir menos ácidos orgânicos e, conseqüentemente, promover uma diminuição menos significativa do pH, mantendo o meio alcalino e impedindo uma solubilização eficaz dos nutrientes (ALORI et al. 2017).

A eficácia de microrganismos nos processo de dissolução do fosfato é assunto de grande atenção. Em trabalho de Mendes et al. (2020) relataram a solubilização de rocha de Crandallite (3.9% P₂O₅) utilizando ácido sulfúrico obtendo 9 mg P L⁻¹, enquanto que com ácido oxálico produzidos por fungos solubilizadores de fosfato obteve 18 mg P L⁻¹ evidenciando a eficácia dos fungos filamentosos

e seus ácidos orgânicos no processo de solubilização de fosfato. O gênero *Aspergillus* é mundialmente conhecido e aplicado em indústrias pela sua produção de ácidos orgânicos (YANG et al. 2017). Portanto, neste trabalho demonstra que fungos do gênero *Trichoderma* também seria uma alternativa viável para produção desses ácidos. Além disso, o gênero, que já é amplamente utilizado nas atividades agrícolas como controlador biológico e poderia apresentar outra aplicabilidade, na biodisponibilidade de nutrientes através da solubilização de fosfato (P) (SANGOR et al. 2023), potássio (K) (JIAO et al. 2023) e zinco (Zn) (CHAUDHARY et al. 2023).

Tabela 3. Produção de ácidos orgânicos pelos isolados de *Trichoderma*.

Isolados	Halo(mm)	pH final
GT32	+++	3,45
G41	++	3,71
G43	++	3,89
G50	++	4,29

OBS: (+) diâmetro do halo ≥ 5 mm; (++) diâmetro do halo ≥ 25 mm; (+++) diâmetro do halo ≥ 50 mm.

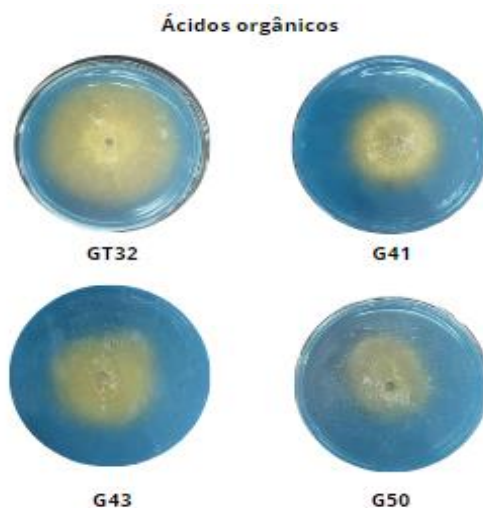


Figura 8. Avaliação da produção de ácidos orgânicos em meio sólido com indicador de pH.

5.8 Avaliação da tolerância a agrotóxicos por *Trichoderma* sp.

Todos os isolados demonstraram crescimento no meio contendo o inseticida Curbix (88%) e o herbicida Atrazina (89%) (Figura 9). Para que os isolados (microorganismos) se tornem um possível produto biológico agrícola precisam apresentar algumas características como crescer em ambientes

que são aplicados ou já foram contaminados por agrotóxicos (WIDMER et al. 2019). Limdolthamand et al. (2023) avaliaram a compatibilidade dos isolados *Trichoderma* sp. em diferentes agrotóxicos, obteve uma inibição de 42%-55% com produtos à base de pirasclotrobina (fungicida). Resultados diferentes foram observados por Widmer et al. (2019) com *Trichoderma asperellum* que demonstrou crescimento com inibição apenas de 25 % na presença de agrotóxicos contendo trifloxistrobina (fungicida). Dessa forma, evidenciando a tolerância dos fungos do gênero *Trichoderma* com agrotóxicos, além de que demonstra que esses isolados podem ser aplicados em áreas foliares junto aos agrotóxicos ou mesmo o tratamento de semente em sulcos (GALEANO et al. 2023).

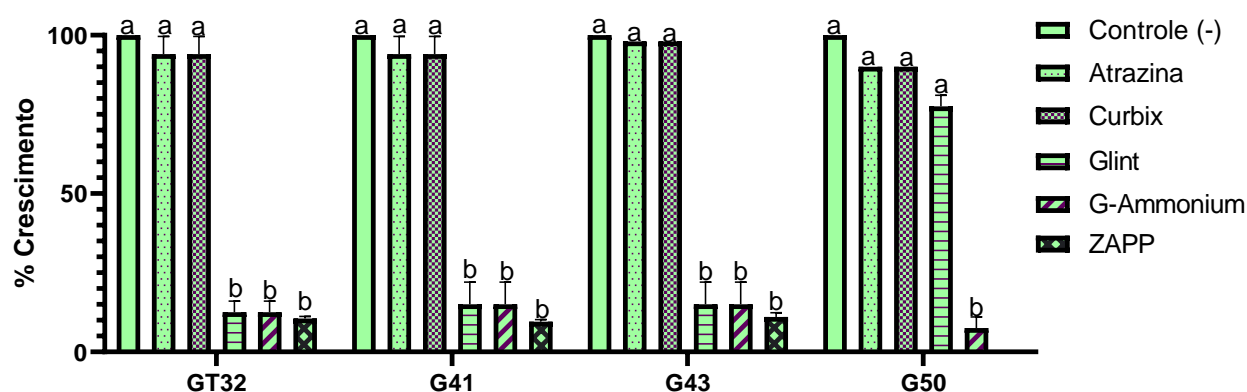


Figura 9. Tolerância a agrotóxicos comerciais pelos isolados de *Trichoderma*. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados pelo teste de Tukey.

5.9 Solubilização de fosfato por *Trichoderma* sp. G41 sob condições de estresse.

Para avaliar a solubilização de fosfato sob condições de estresse salino e hídrico, o isolado G41 foi selecionado. Conforme demonstrado na Figura 10, nas duas concentrações de estresse salino — 150 mM e 300 mM de NaCl — o isolado demonstrou capacidade de solubilizar fosfato ao longo dos dez dias de experimento, alcançando a maior taxa de solubilização aos sete dias, com 1155,17 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ na concentração de 300 mM de NaCl. Por outro lado, sob estresse hídrico (Figura 10B) induzido por PEG 600 nas concentrações de -0,5 MPa e -1 MPa, observou-se um padrão crescente de solubilização ao longo dos dias, atingindo o valor máximo de 498,27 $\mu\text{g P mL}^{-1}$ após dez dias de incubação na concentração de -1 MPa.

Em trabalho com *Aspergillus tubingensis* e *Talaromyces islandicus* a presença de NaCl (3%) reduziu de forma expressiva as concentrações de fósforo solúvel apresentando 495,1 mg L^{-1} de fósforo solúvel (LÓPEZ et al. 2020). As concentrações de NaCl afetam negativamente a capacidade de solubilização, fato que não ocorreu com o isolado G41. Além disso, o PEG demonstrou ser um potente inibidor da solubilização de fosfato, padrão encontrado também em trabalho de Tandon et al. (2020) com o fungo *Trichoderma koningiopsi*.

As intensificações das atividades agrícolas, o uso extremo do solo, como outras atividades antropogênicas podem causar a salinidade e falta de água em solos agrícolas. Esses estresses abióticos afetam a biodisponibilidade de nutrientes, logo a absorção pelas plantas (TANDON et al., 2020). O isolado *Trichoderma* sp. G41 demonstrou ultrapassar esses problemas, a salinidade não houve efeito em sua solubilização, já o estresse hídrico diminuiu os níveis de fósforo solúvel mas não a ponto de interromper o processo.

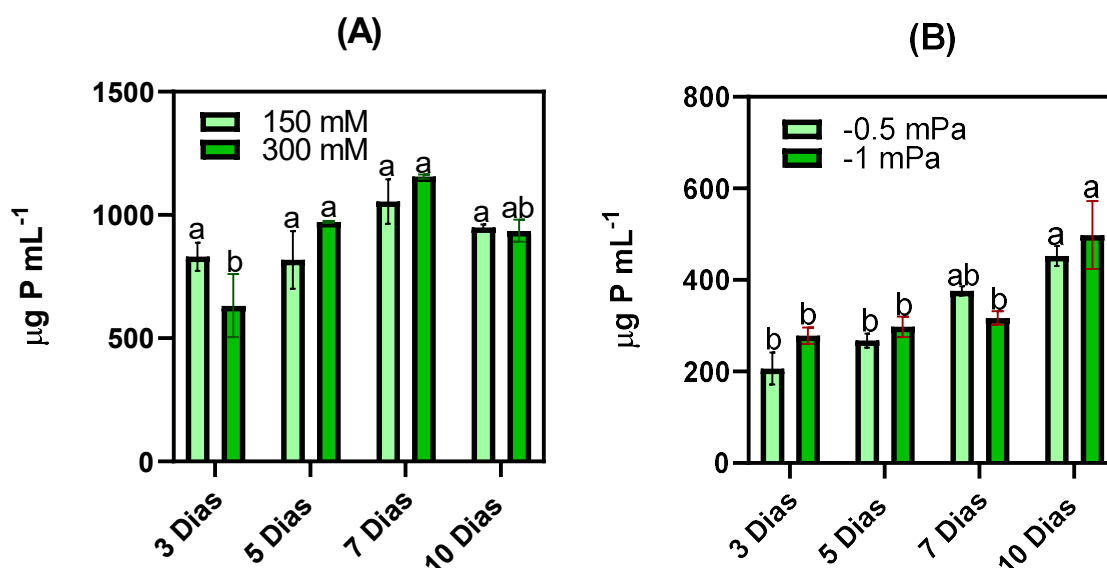


Figura 10. Solubilização de fosfato em condições de estresse salino (A) e hídrico (B) por *Trichoderma* sp. G41. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados pelo teste de Tukey.

5.10 Avaliação da promoção de crescimento em milho com *Trichoderma* sp. G41

Com a finalidade de explorar a capacidade de promoção de crescimento vegetal com ênfase no processo de solubilização de fosfato do isolado G41 foi selecionado para o teste em casa de vegetação. Foram utilizadas sementes de milho ADV9339 com diferentes doses de fertilização fosfatada. De acordo com resultados obtidos apresentados na Figura 11 a inoculação do isolado G41 em meia dose de fosfato (T2) proporcionou maior comprimento de raiz (13%) de parte aérea (9%) assim como um aumento na massa fresca da raiz (47%) e de parte aérea (38%), quando comparado com o controle meia dose (T1). Os resultados obtidos, demonstram que em meia dose de fertilização o fungo conseguiu proporcionar o crescimento vegetal através de sua efetiva solubilização de fosfato presente no solo.

HUSSAIN et al. (2024) relataram em seu trabalho com *Aspergillus niger* um aumento de 12% e 41% no tamanho de raiz e parte aérea, respectivamente, em conjunto um aumento também na massa fresca e seca de milho. Em um estudo com *Pleurotus ostreatus*, foi avaliado o crescimento de milho João Victor Souza Ribeiro

utilizando rocha fosfática, resultando em um aumento na massa fresca e seca, além de maior comprimento de raiz e parte aérea (MAHARANA et al. 2020). Esses resultados indicam o potencial do isolado G41 como promotor de crescimento vegetal, estando alinhados com os efeitos observados para outros microrganismos relatados na literatura.

Um trabalho com *Aspergillus brasiliensis* e *Aspergillus sydowii* demonstrou um aumento na concentração de fósforo nas plantas mesmo quando utilizadas 50% da dose recomendada de fertilizante foi utilizada (BARON et al. 2020). Isso evidencia a capacidade desses microrganismos em promover a biodisponibilidade de nutrientes, oferecendo uma estratégia eficaz para mitigar o uso excessivo de fertilizantes.

O isolado G41 se destacou pela elevada eficiência na solubilização de diferentes fontes fosfatadas, além da produção de fitases, fosfatase ácida, AIA, sideróforos e ácidos orgânicos. Também demonstrou compatibilidade com agrotóxicos amplamente utilizados em campo, e solubilização em condições de estresse salino e hídrico, evidenciando sua resistência e adaptabilidade. Além disso, o estudo de Galeano et al. (2024) evidenciou a forte ação antifúngica do isolado, com inibição significativa do crescimento de *Macrophomina phaseolina* (54,4%), *Sclerotinia sclerotiorum* (70%) e *Fusarium solani* (76,3%), consolidando seu papel como agente de biocontrole contra importantes fitopatógenos. Os experimentos em casa de vegetação confirmaram sua capacidade de promover o crescimento vegetal, reforçando seu potencial como bioinsumo promissor para uma agricultura mais sustentável e eficiente.

Os fungos do gênero *Trichoderma* sp. têm se destacado por sua eficácia em processos de controle biológico, sendo já amplamente utilizados no mercado brasileiro (MACENA et al. 2020). A busca por novos isolados de *Trichoderma* sp. com potencial de solubilização de fosfato para aplicação como bioinsumos é essencial para ampliar a oferta nacional desses microrganismos. Com a perspectiva de um aumento no uso de insumos biológicos na agricultura, busca-se promover práticas agrícolas mais sustentáveis, menos prejudiciais ao meio ambiente e alinhadas com princípios ecológicos e bioeconômicos, especialmente diante dos desafios impostos pelo aquecimento global.

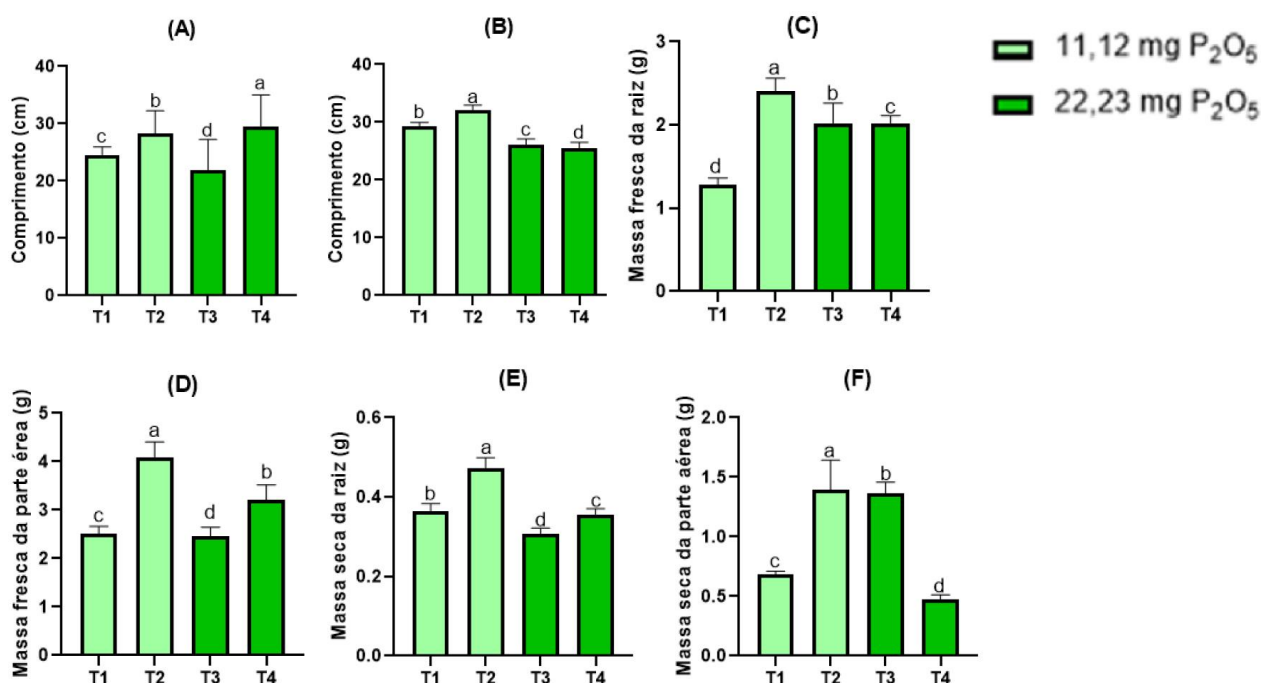


Figura 11. Efeito de *Trichoderma* sp. G41 no crescimento de milho (ADV9339) em duas condições de fertilização fosfatada: T1 (controle meia dose); T2 (G41 meia dose); T3 (controle dose completa); T4 (G41 dose completa). (A) comprimento da raiz (B) altura da parte aérea (C) massa fresca da raiz (D) massa fresca da parte aérea (E) massa seca da raiz (F) massa seca parte aérea. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

5.11 Avaliação dos parâmetros bioquímicos de crescimento vegetal com *Trichoderma* sp. G41

Os parâmetros bioquímicos foram avaliados para determinar os teores de clorofila total (A), carotenóides (B), flavonóides (C), fenólicos (D), aminoácidos totais (E) e açúcares redutores totais (F), conforme demonstrado na Figura 12. O tratamento com meia dose de fertilização, combinado com a inoculação do isolado G41, resultou em um aumento de 41% na clorofila total (Figura 12A), 32% nos carotenóides (Figura 12B), 86% nos aminoácidos totais (Figura 12E) e 47% nos açúcares redutores totais (Figura 12F).

O aumento da clorofila, carotenóides e açúcares redutores totais está relacionado ao crescimento das raízes e da parte aérea, uma vez que o desenvolvimento dessas estruturas permite uma melhor absorção de água e nutrientes, favorecendo, o processo fotossintético (ZHANG et al. 2020). Além disso, os pigmentos como clorofila e carotenóides são elementos essenciais na fotossíntese, capturando a luz necessária para a produção de energia (GHANI et al. 2022). Os resultados obtidos neste estudo indicam uma melhor taxa fotossintética nas cultivares inoculadas com o *Trichoderma* sp. G41. Esses microrganismos secretam hormônios, como o AIA, cuja produção foi detectada pelo isolado, conforme descrito no item 5.6, o que melhora a arquitetura radicular e, conseqüentemente, a absorção de nutrientes essenciais como fósforo e magnésio (MALIK et al. 2022).

Para flavonóides, a dose completa de fertilização (T4) resultou na maior produção (32%) desse pigmento em comparação ao controle (T3) (Figura 12C). Além disso, os compostos fenólicos e flavonóides atuam como agentes antioxidantes, auxiliando as plantas na defesa contra estresses ambientais (ELKELISH et al. 2020). Estudos com *Trichoderma* sp. demonstraram um aumento nesses compostos, sugerindo que esses fungos ajudam a combater espécies reativas de oxigênio, promovendo, um melhor crescimento e protegendo as plantas contra o estresse oxidativo (YUSNAWAM et al. 2019).

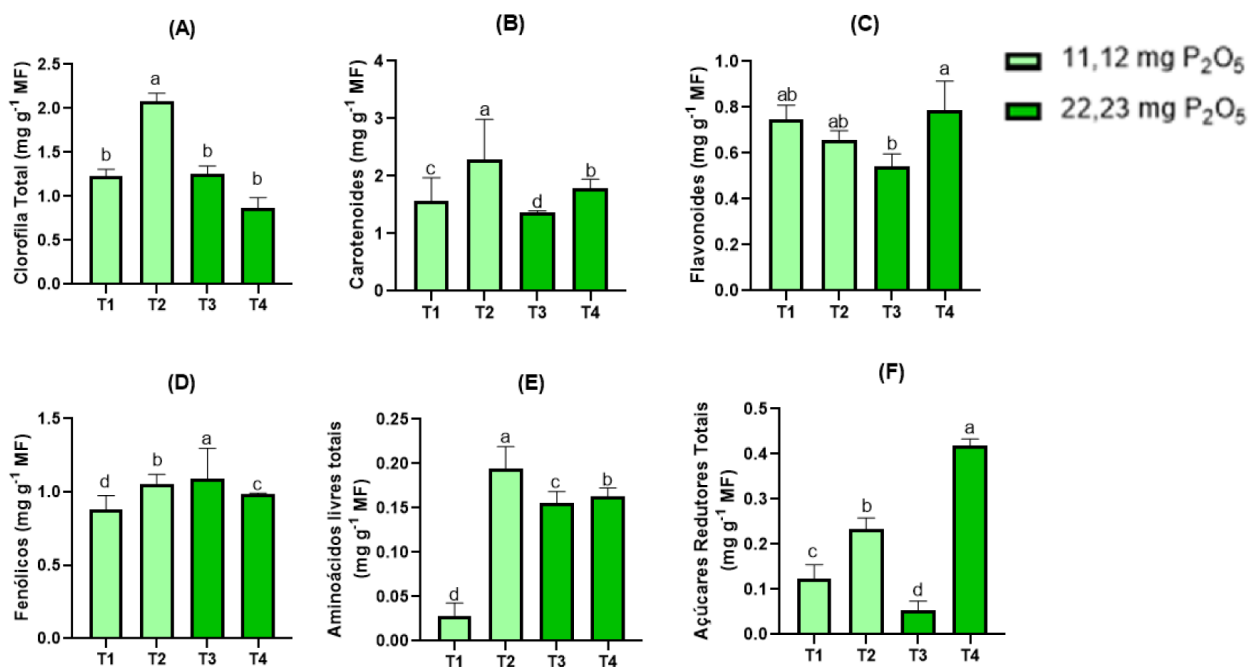


Figura 12. Parâmetros bioquímicos de experimento em casa de vegetação testando diferentes doses fosfatadas: T1 (controle meia dose); T2 (G41 meia dose); T3 (controle dose completa); T4 (G41 dose completa). (A) clorofila total; (B) carotenóides; (C) flavonóides; (D) fenólicos; (E) aminoácidos totais; (F) açúcares redutores totais. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

5.12 Dosagem das enzimas fitase e fosfatase ácida e avaliação da atividade microbiana do solo pela hidrólise do acetato de fluoresceína.

A atividade de fosfatase ácida do solo (Figura 13A) mostrou um aumento de 16% em ambas as doses de fertilização quando inoculadas com *Trichoderma* sp. G41. Quanto à fitase (Figura 13B), houve um aumento de 25% na meia dose de fertilizante e 8% na dose completa, também com a inoculação de G41. Esse incremento pode estar associado à melhoria da qualidade do solo promovida pelo isolado de *Trichoderma* sp. G41. Para complementar, utilizamos a metodologia de hidrólise do acetato de fluoresceína (FDA) para avaliar a atividade microbiana no solo, que envolve a ação de proteases, lipases e esterases inespecíficas, resultou em um aumento de 63 % (meia dose) e 11% (dose completa) quando inoculadas com *Trichoderma* sp. G41.

A atividade dessas enzimas no solo é fundamental, pois elas desempenham um papel crucial no processo de mineralização do fósforo. Com a maior disponibilidade desse nutriente, as plantas apresentaram um crescimento fisiológico superior e melhorias nos parâmetros bioquímicos, como observado neste estudo. Bononi et al. (2020) também relataram a atividade dessas enzimas em solo rizosférico de soja inoculadas com *Trichoderma* sp., destacando sua importância na promoção do crescimento vegetal. Em outro estudo, dosagens de fitase rizosférica obteve um aumento de aproximadamente 20% em fosfato presente no solo quando inoculadas com *Aspergillus flavus* (SADAF et al. 2022). Portanto, o estudo de enzimas microbianas no solo é de suma importância pois as mesmas são essenciais para promoção de ciclos biogeoquímicos, podendo ser exploradas para aplicação sustentável em plantios agrícolas (AHMED et al. 2021).

Tao et al. (2022) obtiveram $44,98 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ de hidrólise do FDA em solos não poluídos, sendo que o o inóculo de *Trichoderma* obteve $305 \mu\text{g}$ de FDA g^{-1} de solo seco h^{-1} demonstrando uma alta atividade microbiana.

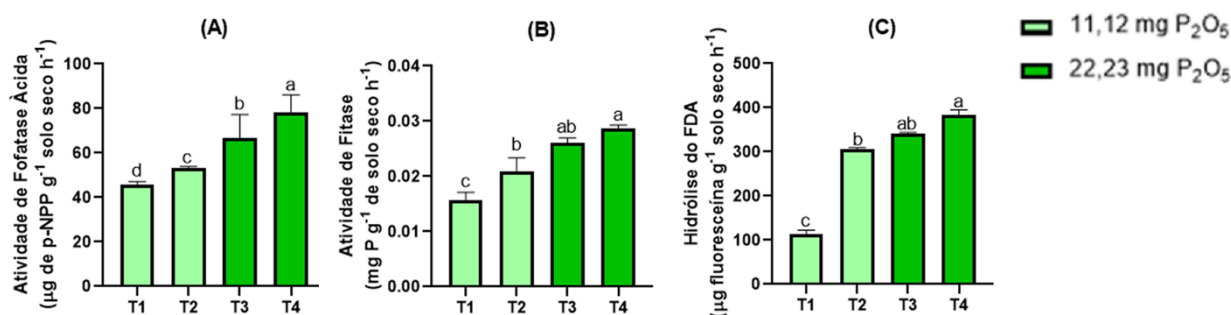


Figura 13. Atividade de fosfatase ácida (A); fitase (B) e atividade microbiana (C) em solo rizosférico de milho inoculadas com *Trichoderma* sp. G41 em duas doses fosfatadas: T1 (controle meia dose); T2 (G41 meia dose); T3 (controle dose completa); T4 (G41 dose completa). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos pelo teste de Tukey.

6. CONCLUSÃO

Os isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram uma notável capacidade de solubilizar diferentes fontes fosfatadas de Ca^{2+} , Al^{3+} e Fe^{3+} , além de fertilizantes comerciais. Os isolados GT32, G41, G43 e G50 destacaram-se como os mais promissores, sendo selecionados para testes adicionais de promoção de crescimento vegetal. Os isolados produziram fitase, fosfatase, ácidos orgânicos e sideróforos. GT32, G41 e G50 também sintetizaram AIA. Além disso, mostraram tolerância a agrotóxicos e solubilização em condições de estresse salino e hídrico.

Em casa de vegetação, o isolado G41 promoveu o crescimento superior de raízes e parte aérea de milho ADV9339, especialmente com meia dose de fertilização fosfatada. As plantas inoculadas apresentaram maior teor de clorofila, carotenóides, aminoácidos e açúcares redutores. Também houve um aumento significativo nas atividades de fosfatase ácida, fitase e na atividade microbiana. Com base nesses resultados, o isolado *Trichoderma* sp. G41 mostrou-se um eficiente promotor de crescimento vegetal e um promissor bioinsumo para uma agricultura mais sustentável.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADI V, et al. 2021. Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. **Journal of Applied Microbiology** 131: 898-912. 2021
- ABDENACEUR, R. et al. Effective biofertilizer *Trichoderma* sp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. **International Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 817–829. 2022.
- ADHIKARI, P. et al. Phosphate solubilization potential of endophytic fungi isolated from *Taxus wallichiana* Zucc. roots. **Rhizosphere**, v. 9, p. 2–9. 2019.
- AHMED, Bulbul et al. Phytate and microbial suspension amendments increased soybean growth and shifted microbial community structure. **Microorganisms**, v. 9, n. 9, p. 1803. 2021.
- ALORI, E. T.; et al. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology Frontiers Media S.A.** 2017.
- ALZATE, Y. et al. An insight into the role of the organic acids produced by *Enterobacter* sp. strain 15S in solubilizing tricalcium phosphate: in situ study on cucumber. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 1. 2023.
- AMPERES, M. et al. Harnessing the phosphate-solubilizing ability of *Trichoderma* strains to improve plant growth, phosphorus uptake and photosynthetic pigment contents in common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 45, p. 102510–102510. 2022.
- ASSIS, R. M. A. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic manure enhance growth and accumulation of citral, total phenols, and flavonoids in *Melissa officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 112981. 2020.
- ARNALDOS, T.L. et al. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria ×ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, v. 113, n. 3, p. 315–322. 2001.
- ATUCHIN, Victor V. et al. Microorganisms for bioremediation of soils contaminated with heavy metals. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 864. 2023.
- BAI, Zhaohai et al. Optimizing phosphorus fertilizer use to enhance water quality, food security and social equality. **Resources, Conservation and Recycling**, Volume 203, p. 107400. 2024
- BASÍLIO, F. et al. Multiple modes of action are needed to unlock soil phosphorus fractions unavailable for plants: The example of bacteria- and fungi-based -tilizers. **Applied Soil Ecology**. 2022.
- BARON, N. C. et al. First report of *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus brasiliensis* as phosphorus solubilizers in maize. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 863–870. 2018.

- BETTIOL, W. Et al. Uso atual e perspectivas do *Trichoderma* no Brasil. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (ed.). *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília, DF: **Embrapa**, p. 21-44. 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254. 1976.
- BONONI, L. et al. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* sp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1. 2020.
- BUSI, M. V. et al. Characterization of SdGA, a cold-adapted glucoamylase from *Saccharophagus degradans*, **Biotechnol. Rep.** v. 30. 2021
- CAPPUCCINO, J.C., SHERMAN, N. In: Microbiology: A Laboratory Manual, third ed. **Benjamin/Cumming Pub. Co.**, pp. 125–179. 978-0805310528. 1992.
- CHAUHAN, P. S. Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101498. 2020.
- CHAUDHARY, R. et al. Finger Millet (*Eleusine coracana*) Plant–Endophyte Dynamics: Plant Growth, Nutrient Uptake, and Zinc Biofortification. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 973. 2023.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Milho. Histórico Semanal Milho. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analisesdo>
- CONTINI, E. et al. Milho -Caracterização e Desafios Tecnológicos. **Embrapa**. 2019
- CZAPEK, F. Weitere Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Schimmelpilze. **Beiträge zur Physiologie und Morphologie der niederen Pflanzen**, 1, 225-242. 1903.
- DEZAM, A. P. G. et al. Microbial production of organic acids by endophytic fungi. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 282–287. 2017.
- DIPTA, B. et al. Obliteration of phosphorus deficiency in plants by microbial interceded approach. **Symbiosis**. 2019.
- DOILOM, M. et al. Screening of Phosphate-Solubilizing Fungi From Air and Soil in Yunnan, China: Four Novel Species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11. 2020.
- DOTANIYA, M. L. et al. Role of Soil Enzymes in Sustainable Crop Production. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 569–589. 2019.
- DUCOUSSO-DÉTREZ, A. et al. Cultural techniques capture diverse phosphate-solubilizing bacteria in rock phosphate-enriched habitats. **Frontiers in Microbiology**, v. 15. 2024.

- ELBASIOUNY, H. et al. Plant Nutrition under Climate Change and Soil Carbon Sequestration. **Sustainability**, v. 14, n. 3, p. 914. 2022.
- EL ENSHASY, H. A. et al. *Trichoderma*: Biocontrol Agents for Promoting Plant Growth and Soil Health. Em: [s.l.] **Agriculturally Important Fungi for Sustainable Agriculture**, p. 239–259. 2020.
- ELKELISH, A. A. et al. Pretreatment with *Trichoderma harzianum* alleviates waterlogging-induced growth alterations in tomato seedlings by modulating physiological, biochemical, and molecular mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 171, p. 103946. 2020.
- ETESAMI, H.; JEONG, B. R.; GLICK, B. R. Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphate–Solubilizing Bacteria, and Silicon to P Uptake by Plant. **Frontiers in Plant Science Frontiers Media S.A.** 2021.
- FAO. The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 244. 2018.
- FATIMA, F. Et al. Relevance of phosphate solubilizing microbes in sustainable crop production: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 19, p. 9283–9296. 2022.
- GALEANO, R. M. S. et al. Plant growth promoting potential of endophytic *Aspergillus niger* 9-p isolated from native forage grass in Pantanal of Nhecolândia region, Brazil. **Rhizosphere**, v. 18, p. 100332. 2021.
- GALEANO, R. M. S. et al. *Penicillium chrysogenum* strain 34-P promotes plant growth and improves initial development of maize under saline conditions. **Rhizosphere**, v. 26, p. 100710–100710. 2023.
- GALEANO, R. M. S. et al. New Strains of *Trichoderma* with Potential for Biocontrol and Plant Growth Promotion Improve Early Soybean Growth and Development. **Journal of Plant Growth Regulation**. 2024.
- GAGNON, B. et al. Validation and use of critical phosphorus concentration in maize. **European Journal of Agronomy**, v. 120, p. 126147. 2020.
- GANGADHARAN, D. et al. Recapitulation of stability diversity of microbial α -amylases. **Amylase**. v. 4, p. 11-23. 2020.
- GHANI, M.I. et al. . Arbuscular mycorrhizal fungi and dry raw garlic stalk amendment alleviate continuous monocropping growth and photosynthetic declines in eggplant by bolstering its antioxidant system and accumulation of osmolytes and secondary metabolites. **Front. Plant Sci.**, 13, 849521. 2022.
- GHINI, R.; MENDES, M. D. L.; BETTIOL, W. Método de hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador de atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 24, p. 239-242. 1998.

- GORDON, S. A. ; WEBER, R. P. Colorimetric Estimation of Indol Acetic Acid. **Plant Physiology**, v. 26, n. 1, p. 192–195. 1951.
- GHOSH, Swapan Kr; BERA, Tanmay; CHAKRABARTY, Ananda M. Microbial siderophore—A boon to agricultural sciences. **Biological Control**, v. 144, p. 104214. 2020.
- GREENFIELD, L. M. et al. Is soluble protein mineralisation and protease activity in soil regulated by supply or demand? **Soil biology & biochemistry**, v. 150, p. 108007–108007. 2020.
- GRIMM, P. W. ; ALLEN, P. J. Promotion by Zinc of the Formation of Cytochromes in *Ustilago sphaerogena*. **Plant Physiology**, v. 29, n. 4, p. 369–377. 1954.
- HASSAN, N. et al. Fungi in acidic fire: A potential source of industrially important enzymes. **Fungal Biology Reviews Elsevier Ltd**. 2019.
- HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, v.113, p.313-317. 1981.
- HUANG, R. et al. Plant-microbe networks in soil are weakened by century-long use of inorganic fertilizers. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1464–1475. 2019.
- HUSSAIN, Iqbal et al. Phosphate solubilizing *Aspergillus Niger* PH1 ameliorates growth and alleviates lead stress in maize through improved photosynthetic and antioxidant response. **BMC Plant Biology**, v. 24, n. 1, p. 642. 2024..
- JIAO, H. et al. Screening of rhizosphere nitrogen fixing, phosphorus and potassium solubilizing bacteria of *Malus sieversii* (Ldb.) Roem. and the effect on apple growth. **Journal of Plant Physiology**, v. 292, n. 154142, p. 154142–154142. 2024.
- KAUR, C.; SELVAKUMAR, G.; UPRETI, K. K. Organic Acid Profiles of Phosphate Solubilizing Bacterial Strains in the Presence of Different Insoluble Phosphatic Sources Under In vitro Buffered Conditions. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 1006–1015. 2021.
- KELLY, J. et al. Optimization of oxalic acid production by fungi for biotechnological solubilization of rock phosphate. **Scientia Agrícola**, v. 80. 2023.
- KESWANI, C. et al. Readdressing the biosafety issues of plant growth promoting rhizobacteria. **Science of the Total Environment**, v. 690, p. 841–852. 2019.
- KESWANI, C. et al. Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 1013–1034. 2020.
- KULKARNI, G. B. et al. Indole-3-acetic acid biosynthetic pathway and aromatic amino acid aminotransferase activities in *Pantoea dispersa* strain GPK. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 340–347. 2013.

- LARRAN, S. et al. Endophytic *Trichoderma* strains increase soya bean growth and promote charcoal rot control. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, mar. 2023.
- LAMBERS, H. Phosphorus Acquisition and Utilization in Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 73, n. 1. 2021.
- LEITÃO, V. O. et al. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1083–1088. 2010.
- LIMDOLTHAMAND, S. et al. Biocontrol efficacy of endophytic *Trichoderma* sp. in fresh and dry powder formulations in controlling northern corn leaf blight in sweet corn. **Biological Control**, v. 181, p. 105217. 2023.
- LI, H-P; HAN, Q-Q; LIU, Q-M; et al. Roles of phosphate-solubilizing bacteria in mediating soil legacy phosphorus availability. **Microbiological Research**, p. 127375. 2023.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4.3.1–F4.3.8. 2001.
- LIU, D. Root developmental responses to phosphorus nutrition. **Journal of Integrative Plant Biology Blackwell Publishing Ltd**. 2021.
- MACENA, A. M. F. et al. Antagonism of *Trichoderma*-based biofungicides against Brazilian and North American isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* and growth promotion of soybean. **BioControl**, v. 65, p. 235–246. 2020.
- MACHUCA, A. et al. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 177–181. 2003.
- MALIK, J.A. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi isolated from highly saline “sabkha habitat” soil alleviated the NaCl-induced stress and improved *Lasiurus scindicus* Henr. growth. **Agriculture**, 12, 337. 2022.
- MAGELA, M. L. M. Fontes de matéria orgânica na composição de fertilizantes organominerais pelezados na cultura do milho. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2017.
- MAHARANA, R. et al. Biosolubilization of rock phosphate by *Pleurotus ostreatus* with brewery sludge and its effect on the growth of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 395–410. 2020.
- MEENA, Amrit Lal et al. Carbon, nitrogen and phosphorus mineralization as influenced by type of organic residues and soil contact variation in vertisol of Central India. **Agricultural Research**, v. 9, p. 232-240. 2020.

- MENDES, G. O. et al. Oxalic acid is more efficient than sulfuric acid for rock phosphate solubilization. **Minerals Engineering**, [s. l.], v. 155, n. May, p. 106458. 2020.
- MEHTA, P. et al. Endophytic Fungi: Role in Phosphate Solubilization. **Advances in Endophytic Fungal Research**, p. 183–209. 2019.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, 31(3), 426-428, 1959
- MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 27, p. 31–36. 1962.
- NASTARI, P. M.. A crise na Ucrânia e a dependência da importação de fertilizantes. **AgroANALYSIS**, v. 42, n. 5, p. 16–14. 2022.
- PACHECO, I. et al. Microbial consortium increases maize productivity and reduces grain phosphorus concentration under field conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 232–237. 2021.
- PAVINATO, P. S. et al. Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1. 2020.
- PAUL, S. et al. Effect of Seed Bio-priming with *Trichoderma viride* Strain BHU-2953 for Enhancing Soil Phosphorus Solubilization and Uptake in Soybean (*Glycine max*). **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, n. 2, p. 1041–1052. 2021.
- PAUL, A.; DUBEY, R. Characterization of protein involved in nitrogen fixation and estimation of Co-factor. **International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology**, v. 2, p. 89–97. 2015.
- PANDEY, A. et al. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**. v. 77, n. 3, p. 203-214. 2001.
- PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. **Mikrobiologiya**, v. 19, p. 362–370. 1948.
- PONS, S. et al. Phytohormone production by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10. 2020.
- POVEDA, J. et al. Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture. **Biological Control Academic Press Inc.** 2022.
- PRASAD, A. et al. Qualitative and quantitative estimation for phosphate solubilizing ability of *Trichoderma* isolates: A natural soil health enhancer. **Materials Today: Proceedings**, v. 81, p. 360–366. 2023.

- PRESTON, C. L. et al. Corn Response to Long-Term Phosphorus Fertilizer Application Rate and Placement with Strip-Tillage. **Agronomy Journal**, v. 111, n. 2, p. 841–850. 2019.
- PROCÓPIO, L.; BARRETO, C. The soil microbiomes of the Brazilian Cerrado. **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, n. 6, p. 2327–2342. 2021.
- PUCHART, V. et al. Xylanases of glycoside hydrolase family 30 – An overview . **Biotechnology Advances**. 2021.
- QARNI, A. et al. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Rock Phosphate Mines and Their Potential Effect for Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 13, n. 4, p. 2151. 2021.
- QIN, S. et al. Improving radish phosphorus utilization efficiency and inhibiting Cd and Pb uptake by using heavy metal-immobilizing and phosphate-solubilizing bacteria. **Science of the Total Environment**, v. 868. 2023.
- RASOOL, A. et al. Plant growth promoting and antifungal asset of indigenous rhizobacteria secluded from saffron (*Crocus sativus* L.) rhizosphere. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p. 104734. 2021.
- RAMADA, M. H. S. et al. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**, v. 16, n. 3, p. 477–490. 2016.
- RAWAT, P. et al. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. 2020.
- SADAF, N. et al. Harnessing the Phytase Production Potential of Soil-Borne Fungi from Wastewater Irrigated Fields Based on Eco-Cultural Optimization under Shake Flask Method. **Agriculture**, v. 12, n. 1, p. 103. 2022.
- SAHA, M.; et al. Siderophores and their potential applications: a review. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 23, p. 3984–3999. 2016.
- SANG, Y. et al. Phosphorus-Solubilizing Capacity of *Mortierella* Species Isolated from Rhizosphere Soil of a Poplar Plantation. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2361–2361. 2022.
- SANÓ, L. et al. *Trichoderma longibrachiatum* as a biostimulant of micropropagated banana seedlings under acclimatization. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 190, p. 184–192. 2022.
- SANCHEZ-GONZALEZ et al. Effect of pH and Carbon Source on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains in Pikovskaya Medium. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, p. 49–49. 2022.
- SANDHYA, V.; ALI, Sk. Z.; GROVER, Minakshi; et al. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regulation**, v. 62, n. 1, p. 21–30, 2010.

- SASABUCHI, I. T. M. et al. Sustentabilidade no uso de fósforo: uma revisão bibliográfica com foco na situação atual do estado de são paulo, **Brasil. Quimica Nova**, v. 46, n. 2, p. 185–198. 2023.
- SCHWYN, B. ; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56. 1987.
- SINGH, H. B. et al. Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms: discovery and applications 1. ed. **Springer-Nature, Singapore**:. p. 392. 2019.
- SOARES, José C. et al. Preserving the nutritional quality of crop plants under a changing climate: importance and strategies. **Plant and Soil**, v. 443, p. 1-26. 2019.
- SOBUCKI, L. et al. Contribution of enzymes to soil quality and the evolution of research in Brazil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45. 2021.
- TABATABAI, M. A. et al. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 1, n. 4, p. 301–307. 1969.
- TENG, Z. et al. Characterization of phosphate solubilizing bacteria isolated from heavy metal contaminated soils and their potential for lead immobilization. **Journal of Environmental Management**, v. 231, p. 189–197. 2019.
- TIAN, J. et al. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical p cycle. **Biology MDPI AG**. 2021.
- TAO, K. et al. Kinetics and catalytic efficiency of soil fluorescein diacetate hydrolase under the pesticide parathion stress. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. 144835. 2021.
- VASSILEVA, M. et al. Fungi, P-Solubilization, and Plant Nutrition. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1716. 2022.
- VIEIRA, B.S. et al. Combination of phytase and citric acid, but not phytase alone, ensures regular rates of growth and bone mineralization in quails under severe phosphorus restriction. **J Anim Physiol Anim Nutr**. p. 1- 9. 2019.
- WANG, Y. Y.; LI, P. S.; ZHANG, B. X.; WANG, Y. P.; MENG, J.; GAO, Y. F.; HE, X. M.; HU, X. M. Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability. **Bioresources**, v. 15, p. 2560–2578. 2020.
- WIDMER, T. L. Compatibility of *Trichoderma asperellum* isolates to selected soil fungicides. **Crop Protection**, v. 120, p. 91–96. 2019
- YANG, L.; LÜBECK, M.; LÜBECK, P. S. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 33–49. 2017.
- YUSNAWAN, E. et al. Effect of soybean seed treatment with *Trichoderma virens* on its growth and total phenolic content. **AIP conference proceedings**. 2019.

ZHANG, F. et al. The application potential of *Trichoderma* T-soybean containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate for maize production. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 110, p. 101475–101475. 2020.

ZHAO, L. et al. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588–1597. 2015.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AE5129A

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AE5129A**
Usuário: **UFMS**
CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Trichoderma longibrachiatum

Trichoderma viride

Trichoderma reesei

Trichoderma sp

Título da Atividade: **Fungos filamentosos do gênero Trichoderma isolados do solo e região rizosférica da soja com potencial para biocontrole e promoção de crescimento vegetal**

Equipe

FABIANA FONSECA ZANOELO	UFMS
Rodrigo Mattos Silva Galeano	UFMS
Giovana Cristina Giannesini	UFMS
Douglas Chodi Masui	UFMS
Clarice Rossatto Marchetti	UFMS

Marivaine da Silva Brasil	UFMS
Ana Lorena de Oliveira Simas	UFMS
Samanta Monção Silva	UFMS
Nelciele Cavaliere de Alencar Guimarães	UFMS
Nathalia Nunes Glienke	UFMS
João Victor Souza Ribeiro	UFMS
Isabela Pavão Vargas	UFMS
Izabella Marques de Assis	UFMS
Hellen Natália Cardoso Malheiro	UFMS

Data do Cadastro: **02/02/2024 12:41:03**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:09** de **30/08/2024**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**