

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -  
AGRONOMIA

ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. OBTIDOS DE RAÍZES DE  
GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* Camb.) PARA  
PROMOÇÃO DO SEU CRESCIMENTO *IN VITRO*

Autora: Máira Paixão Resende

Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

RIO VERDE – GO

março - 2013

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS -  
AGRONOMIA

ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. OBTIDOS DE RAÍZES DE  
GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* Camb.) PARA  
PROMOÇÃO DO SEU CRESCIMENTO *IN VITRO*

Autora: Maíra Paixão Resende

Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

Dissertação apresentada como parte das exigências  
para a obtenção do título de Mestre em Ciências  
Agrárias no Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde

RIO VERDE – GO

março - 2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)**  
**Ficha elaborada por Igor Yure Ramos Matos – Bibliotecário CRB 1 - 2819**

R341i Resende, Maíra Paixão.

Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de raízes de Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Camb.) para promoção do seu crescimento *in vitro* / Maíra Paixão Resende. - 2013.  
72 f.: il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie.

Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde, 2013.

Inclui lista de figuras, abreviaturas e tabelas.

1. *Trichoderma* spp.
  2. Fungos
  3. Guanandi.
  4. *Calophyllum brasiliense*
- I. Edson Luiz Souchie, orientador. II. Título.

CDU: 631.461:582.28

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. OBTIDOS DE RAÍZES DE  
GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* Camb.) PARA  
PROMOÇÃO DO SEU CRESCIMENTO *IN VITRO***

Autora: Máira Paixão Resende  
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias – Área de concentração  
Ciências Agrárias – Ciências Agrárias

APROVADA em 28 de março de 2013.

Prof. Dr. Marcos Antônio Soares  
*Avaliador externo*  
UFMT/Cuiabá

Dra. Flávia Dionísio Pereira  
*Avaliadora interna*  
Bolsista PNPd – IF Goiano/RV

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me capacitado executar esta etapa de minha carreira acadêmica e pelas inúmeras providências durante este período.

À Gláucia Rodrigues Paixão Resende, Ariovaldo Monteiro de Resende, Lenara Paixão Resende Araújo e Thiago Souza de Araújo, minha família, pelo incentivo e apoio.

Ao Professor Dr. Edson Luiz Souchie, pela orientação, amizade, confiança e por todas as decisões tomadas visando sempre vencer as “barreiras do mal”.

Aos meus coorientadores: Professor Dr. Marcos Antônio Soares, pelo companheirismo e importantes sugestões no desenrolar dos trabalhos; e Professor Dr. Fabiano Guimarães Silva, por providenciar “reagentes” indispensáveis ao início dos procedimentos laboratoriais.

À Luciana Cristina Vitorino, Isabel Cristina Mendonça Cardoso Jakoby, Flávia Dionísio Pereira e Ísis Danielle Sousa, pelas enormes contribuições nos Laboratórios.

Aos meus colegas de trabalho da Fesurv - Universidade de Rio Verde, pelo incentivo e compreensão nos momentos de minha ausência, principalmente a grande amiga Débora Cabral Machado e Helemi Oliveira Guimarães Freitas.

Aos verdadeiros amigos, pelas orações e torcida pelo sucesso em cada etapa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Não são raras as pessoas que chegam ao topo, são raras as que chegam com mãos limpas e coração puro”.*

**Gilliard Lima**

## **BIOGRAFIA DA AUTORA**

Maíra Paixão Resende, natural de Goiânia – GO, filha de Glaucia Rodrigues Paixão Resende e Ariovaldo Monteiro de Resende, graduada em Ciências – Licenciatura Plena Habilitação em Biologia pela Fesurv – Universidade de Rio Verde e especialista em Biotecnologia pela Universidade Federal de Lavras. Em julho de 2011, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia (Mestrado) do IF Goiano – Campus Rio Verde.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO GERAL.....	11
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1 Guanandi ( <i>Calophyllum brasiliense</i> Camb.) .....	13
1.2 Microrganismos e o desenvolvimento vegetal.....	15
1.3 <i>Trichoderma</i> spp. ....	16
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
3.OBJETIVOS GERAIS.....	25
CAPÍTULO I – ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> spp. ENDOFÍTICOS E RIZOSFÉRICOS DE GUANANDI ( <i>Calophyllum brasiliense</i> CAMBESS)	

RESUMO .....	27
1. INTRODUÇÃO .....	28
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
2.1 Amostragem.....	30
2.2 Isolamento de fungos rizosféricos.....	31
2.3 Isolamento de fungos endofíticos.....	31
2.4 Identificação dos isolados fúngicos.....	32
2.5 Determinação da capacidade de solubilização de fosfato <i>in vitro</i> .....	32
2.5.1 Teste qualitativo.....	32
2.5.2 Teste quantitativo.....	32
2.6 Análise estatística.....	33
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4. CONCLUSÕES.....	37
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS POR ISOLADOS FÚNGICOS DO GÊNERO *Trichoderma* DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* CAMBESS)

RESUMO.....	46
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1. Produção de Ácido Indol Acético (AIA).....	49
2.1.1. Cultivo dos isolados de <i>Trichoderma</i> spp. em meio líquido.....	49
2.1.2. Determinação de AIA.....	49
2.2. Produção de Citocinina e Giberelina.....	49
2.2.1. Cultivo dos isolados.....	49
2.2.2. Germinação de sementes de rabanete.....	50
2.2.3. Determinação da produção de citocinina e giberelina.....	50
2.3. Análise estatística.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50

4. CONCLUSÕES.....	52
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

CAPÍTULO III – PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* CAMBESS) INOCULADAS COM FERMENTADOS DE ISOLADOS FÚNGICOS

RESUMO.....	57
1. INTRODUÇÃO.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
2.1. Aquisição do material vegetal .....	60
2.2. Preparo dos inoculantes fúngicos para inoculação dos explantes de guanandi.	60
2.3. Estabelecimento <i>in vitro</i> .....	61
2.4. Análise estatística.....	62
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4. CONCLUSÃO.....	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1 – Teor de P solubilizado por isolados fúngicos do gênero <i>Trichoderma</i> em meio líquido, na presença de fosfato de cálcio, ferro e alumínio.....	36
CAPÍTULO II	
Tabela 1 - Síntese de ácido indol acético (AIA) por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. endofíticos e rizosféricos de guanandi, em meio BD adicionado de triptofano (1%).....	50
Tabela 2 - Síntese de citocinina e giberelina por isolados de <i>Trichoderma</i> spp. endofíticos e rizosféricos de guanandi.....	51
CAPÍTULO III	
Tabela 1 - Percentual de contaminação dos explantes guanandi ( <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess) aos 30 e 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> . Rio Verde, GO, 2013.....	65

Tabela 2 - Crescimento de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) com o uso de fermentados de fungos aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*.

Rio Verde, GO, 2013..... 66

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO 1	
Figura 1 - Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos a partir da rizosfera de guanandi coletado em área de preservação permanente, em Rio Verde, GO. Esporos: RC14M: C – 25,19 $\mu$ , L – 16,41 $\mu$ ; RC15M: C – 25,07 $\mu$ , L – 18,05 $\mu$ ; RC24M: C – 24,47 $\mu$ , L – 15,89 $\mu$ ; RC25M: C – 25,54 $\mu$ , L – 16,89 $\mu$ ; RC27M: C – 27,11 $\mu$ , L – 15,78 $\mu$ ; RC28M: C – 26,91 $\mu$ , L – 16,94 $\mu$ ; RC30M: C – 28,58 $\mu$ , L – 19,20 $\mu$ ; RC83M: C – 28,92 $\mu$ , L – 17,57 $\mu$ (C = comprimento, L = largura).....	34
Figura 2 - Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. obtidos a partir do interior das raízes de guanandi coletado em área de preservação permanente, em Rio Verde, GO. Esporos: EC9M: C – 28,39 $\mu$ , L – 18,81 $\mu$ ; EC10M: C – 29,33 $\mu$ , L – 17,54 $\mu$ ; EC11M: C – 25,77 $\mu$ , L – 16,16 $\mu$ ; EC12M: C – 25,31 $\mu$ , L – 17,53 $\mu$ (C = comprimento, L = largura).....	35

## CAPÍTULO III

- Figura 1 - Isolamento de fungos endofíticos e rizosféricos de guanandi e obtenção do sobrenadante (fermentado)..... 61
- Figura 2 - Inoculação dos explantes de guanandi em meio MS adicionado de fermentado obtido do cultivo de fungos selecionados..... 62
- Figura 3 - Explantes de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) com 15 dias de incubação com os diferentes fermentados, oriundos de isolados fúngicos. A) *T. asperellum* (autoclave); B) *T. asperellum* (filtro); C) RC28M (autoclave); D) RC28M(filtro). E) EC12M (autoclave); F) EC12M(filtro); G)RC82M (autoclave); H)RC82M(filtro); I) Controle. Rio Verde-GO, 2012..... 63
- Figura 4 - Explantes de guanandi com 30 dias de incubação com os diferentes fermentados oriundos de isolados fúngicos. A) *T. asperellum* (autoclave); B) *T. asperellum* (filtro); C) RC28M (autoclave); D) RC28M (filtro). E) EC12M (autoclave); F) EC12M (filtro); G) RC82M (autoclave); H) RC82M (filtro); I) Controle. Rio Verde-GO, 2012..... 64
- Figura 5 - Explantes de guanandi com 60 dias de incubação com os diferentes fermentados oriundos de isolados fúngicos. A) *T. asperellum* (autoclave); B) *T. asperellum* (filtro); C) RC28M (autoclave); D) RC28M (filtro). E) EC12M (autoclave); F) EC12M (filtro); G) RC82M (autoclave); H) RC82M (filtro); I) Controle. Rio Verde-GO, 2012..... 64

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Al	:	Alumínio
AlPO <sub>4</sub>	:	Fosfato de alumínio
BD	:	Caldo Batata Dextrose
BDA	:	Ágar Batata Dextrose
Ca	:	Cálcio
CaHPO <sub>4</sub>	:	Fosfato de cálcio
Fe	:	Ferro
FePO <sub>4</sub>	:	Fosfato de Ferro
MSF	:	Microrganismos solubilizadores de fosfato
NT	:	Não testado
TSMC	:	<i>Trichoderma</i> Selective Medium with Captan
UFC	:	Unidade formadora de colônia

## RESUMO GERAL

O guanandi possui uma série de características indicando uma excelente escolha para uso em programas de reflorestamento. O estabelecimento de estratégias para a obtenção de mudas, de maneira maximizada em escala comercial, vem se tornando indispensável para o sucesso na produção de espécies arbóreas de interesse. A interação de plantas com alguns microrganismos pode aumentar ou mesmo promover seu crescimento e desenvolvimento. Neste sentido, destacam-se fungos do gênero *Trichoderma*, por possuírem habilidades como a supressão de doenças, a solubilização de fosfatos e a produção de fitormônios. Objetivou-se com o presente trabalho: a) isolar fungos do gênero *Trichoderma* de raízes e rizosfera de mudas de guanandi, cultivadas em viveiro e coletadas em campo; b) avaliar o potencial destes em solubilizar fosfatos de cálcio, ferro e alumínio; c) avaliar a habilidade de sintetizar os fitormônios auxina, citocinina e giberelina; d) determinar o efeito de “fermentados” dos isolados no crescimento e desenvolvimento de guanandi *in vitro*. Constatou-se a capacidade de alguns isolados em solubilizar fosfatos em diferentes proporções, produzir o fitormônio auxina e sua eficiência na promoção do crescimento de guanandi *in vitro*.

## GENERAL ABSTRACT

*Calophyllum brasiliense* Cambess has several characteristics that become an excellent choice for use in reforestation programs. The establishment of strategies to obtain seedlings in commercial scale is becoming essential for success in the production of tree species of interest. The plant microorganism interaction can promote the plant growth. In this way, *Trichoderma* fungi are interesting due to their abilities such as disease suppression, phosphate solubilization and phytohormones production. This work aimed to: a) isolate *Trichoderma* fungi from the *C. brasiliense* root and rhizosphere, growth under nursery conditions and field; b) evaluate their potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates; c) evaluate their ability to product auxin, citocinin and giberelin; d) determine the effect of fungi fermented on growth of *C. brasiliense* under *in vitro* conditions. Some fungi isolates have the capacity to solubilize phosphates in different proportions as well as to produce auxin. Their efficiency on plant growth promotion under *in vitro* conditions was also detected.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess)

Espécie arbórea brasileira abundante em ambientes ciliares. Dentre as plantas típicas destes locais, o guanandi possui ampla distribuição, ocorrendo desde a América Central até o litoral sul do Brasil. Taxonomicamente, pertence a divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Theales e família Clusiaceae (Guttiferae) e possui características que permitem sua recomendação para a recomposição de vegetação nativa e manejo de áreas marginais a cursos d'água (Marques e Joly, 2000a).

Quando adulto, o guanandi possui de 40 a 45 m de altura, alcançando até 180 cm de diâmetro, copa redonda com folhas verde-escuras, galhos obliquamente ascendentes, cilíndrico e base cônica. A casca é áspera, cinzenta, dura e com estreitas fissuras longitudinais. As folhas são simples, inteiras, opostas, oblongo-lanceoladas de 5 a 18 cm de comprimento e 2,5 a 5 cm de largura, base coneiforme e obrusa, ápice acuminado e glebas com pecíolos de 1 a 2,5 cm de comprimento (Navarro, 2007).

No Brasil, tem alto valor econômico pela larga utilização para os mais diversos fins, tais como construção civil, marcenaria, construção naval (Lorenzi, 1992). Segundo Navarro, (2007), a análise econômica se refere a situação real para o reflorestamento, considerando variações como os preços de venda futuros da madeira, custos de implantação e manutenção do reflorestamento com guanandi, constatou o custo total de R\$ 7.388.283,16 do reflorestamento na área de 185,1 ha, respondendo financeiramente a 18,68% das receitas a serem obtidas no projeto Florestal que visa a venda da madeira, obtendo a receita total de R\$ 39.555.425,76 ao final de 20 anos, com receita média anual de R\$ 1.977.771,29. O projeto de reflorestamento com guanandi é viável mesmo calculando o aumento simultâneo de 20% sobre os custos de produção.

O guanandi, com sua biomassa, pode contribuir para melhorar a fertilidade do solo em sistemas silvipastoris, uma vez que demonstra melhor desempenho entre as espécies classificadas como tardias (Melotto et al., 2009). É também uma planta comumente conhecida pelo seu poder medicinal, sendo usada para tratamento de reumatismo, varicoses, hemorróidas, úlceras crônicas e para processos inflamatórios (Júnior et al., 2005; Noldin et al., 2006; Souza et al., 2009; Lemos et al., 2012). De acordo com Gasparoto et al. (2005), extratos brutos obtidos das folhas e galhos possuem atividade moluscicida, sendo fator crucial para o controle da esquistossomose, podendo representar uma alternativa barata, além de evitar a poluição do meio ambiente, diferente de moluscicidas sintéticos que causam problemas de toxicidade, contaminação ambiental e resistência dos caramujos.

O guanandi possui vantagens sobre outras espécies pela capacidade de se desenvolver em locais com saturação hídrica, sendo frequentemente encontrado em ambientes em que o solo é permanentemente ou periodicamente inundado (Marques e Joly, 2000b). Nestes locais, ocorre menor diversidade de espécies em relação às florestas com outros tipos de solo (Reis et al., 2009).

O estabelecimento de estratégias de conservação de ecossistemas florestais, bem como a produção de mudas para programas de reflorestamento se torna indispensável em virtude da redução e fragmentação de populações naturais (Botrel et al., 2006), sendo de fundamental importância estabelecer ações eficientes para a propagação da mesma (Silva et al., 2010).

Para a produção de mudas de guanandi, Artur et al. (2007) constataram que a calagem e a adubação com esterco bovino não são necessárias. Na implantação de florestas de produção ou de proteção, conhecer a intensidade luminosa ideal para a

espécie é um fator fundamental. Especificamente, o guanandi apresenta melhor desenvolvimento inicial com intensidade de 50% de sombreamento (Laura et al., 2009). Quanto à germinabilidade, 30°C é a temperatura ótima para germinação, sendo que temperaturas baixas a inibem, mas não causam danos irreversíveis às sementes (Nery et al., 2007).

Segundo Santos et al. (2008a), de acordo com o comportamento de espécies arbóreas em resposta à fertilização fosfatada, o guanandi possui lento crescimento, implicando em um menor desenvolvimento radicular e exploração do solo e com baixa capacidade de absorção de fósforo (P), comparando com as demais espécies.

Para a produção de mudas de guanandi em escala comercial, é indispensável o planejamento de estratégias para otimizar sua produção, visando reduzir o tempo de produção, aumentar as chances de obtenção de indivíduos mais vigorosos e evitar técnicas dispendiosas.

## 1.2 Microrganismos e o desenvolvimento vegetal

Os microrganismos podem atuar de forma a melhorar ou mesmo promover o desenvolvimento de plantas, sendo que, isolados endofíticos de um hospedeiro podem, inclusive, facilmente colonizar hospedeiros de espécies distintas de *Annona* (Silva et al., 2006). Considerando a vasta biodiversidade microbiana e especificidade nas colonizações de plantas hospedeiras, o perfil químico de espécies endofíticas ainda é pouco estudado, mas já é possível afirmar que o entendimento destas interações pode resultar no estabelecimento de fontes alternativas de substâncias de interesse para a humanidade, bem como a redução da contaminação ambiental pela atividade agrícola (Santos et al., 2008b). Acredita-se que espécies endofíticas podem ter evoluído a partir de fungos patogênicos possuidores de longos períodos de latência ou que perderam sua virulência (Wang et al., 2007). Segundo Ma et al. (2011), os microrganismos endofíticos podem ser eficientes no estabelecimento de plantas em programas de remediação em solos contaminados por metais pesados.

A interação benéfica microrganismo-planta pode depender, dentre vários outros fatores, do ambiente, da espécie microbiana, do genótipo e do estado fisiológico da planta, induzindo assim a resistência sistêmica contra patógenos, como demonstrado por Tucci et al. (2011) em tomate, usando cepas de *Trichoderma*. Mecanismo como este pode ter contribuição significativa para a planta, potencializando a expressão de alguns

genes de resistência em pepino, inoculado com *Trichoderma asperellum* (Shoresh et al., 2005).

A ação sinérgica de fungos deste gênero e de outras espécies microbianas pode ser de fundamental importância para respostas benéficas às plantas (Mathivanan et al., 2005). As interações com outros organismos podem ter surgido pela evolução resultante de várias formas de parasitismo em outros fungos, combinado ao amplo oportunismo ambiental (Druzhinina et al., 2011).

Os nutrientes indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento das plantas muitas vezes não se encontram de forma disponível no solo. Assim, destaca-se a relevância de uma parcela da comunidade microbiana edáfica por sua habilidade em mineralizar fósforo (P) orgânico e solubilizar P inorgânico, permitindo a liberação deste elemento assimilável às plantas (Souchie e Abboud, 2007).

Atualmente, é comum o uso de inoculantes comerciais de diferentes espécies microbianas que beneficiam algumas culturas vegetais de interesse, sendo sua eficiência geralmente dependente de fatores, como o tipo de substrato e o estágio de desenvolvimento vegetal no momento da inoculação (Mwangi et al., 2013).

O isolamento seletivo e inoculação destes microrganismos pode ser uma alternativa promissora como biofertilizantes na produção vegetal em sistemas agrícolas mais sustentáveis visando, principalmente, favorecer a ação sinérgica entre várias estirpes (Esitken et al., 2010; Stefan et al., 2013).

### 1.3 *Trichoderma* spp.

Fungos do gênero *Trichoderma* são encontrados naturalmente em solos e se destacam pela alta versatilidade no seu ciclo de vida e interações com outros organismos, além de possuírem habilidades como a promoção do crescimento de plantas, decomposição da matéria orgânica e antagonismo eficiente contra fitopatógenos.

Ampla diversidade metabólica é verificada neste gênero, sendo esta uma justificativa para avaliar a eficácia de cepas como inoculantes para maximizar a formação de mudas de espécies arbóreas de interesse. Tais microrganismos, pela produção de metabólitos secundários, podem reduzir a mortalidade de mudas

dependendo da densidade do inóculo (Vinale et al., 2008a; Carvajal., 2009; Hohmann et al., 2011)

Vários pesquisadores têm dedicado seus estudos para entender as diversas razões da capacidade de *Trichoderma* spp. proteger espécies vegetais, sendo este amplamente comercializado como biopesticida e biofertilizante (Vinale et al., 2008b). Analisando a espécie *Trichoderma harzianum*, Adams et al. (2007) constataram seu potencial para uso em revegetação e estabilização de solo, em locais com vegetação arbórea cultivada para rebrota e produção de biocombustíveis. Segundo Altomare et al. (1999), essa espécie possui a capacidade para solubilizar e, em alguns casos, quelar compostos de nutrientes de distintas plantas.

De acordo com Sofo et al. (2012), *Trichoderma harzianum* T-22 possui capacidade de promover o crescimento radicular de porta-enxerto de *Prunus cerasus* x *Prunus canescens* estimulando maior área radicular para sua colonização, reforçando assim o comportamento simbiótico e o aumento da capacidade de absorção de água e nutrientes pela planta.

Cinco isolados de *Trichoderma harzianum* foram avaliados por Rawat et al. (2011) em associação com plantas de trigo, em condições de estresse salino, sendo este um fator abiótico limitante para a produtividade da cultura envolvendo estresse osmótico e deficiência de nutrientes. Observou-se o fato da colonização das raízes por estes fungos resultar em alívio das condições ambientais adversas, produzindo fitormônios de crescimento, solubilização de nutrientes não disponíveis e aumento da concentração de enzimas antioxidantes. Estes não somente produzem metabólitos benéficos, como também induzem as plantas a produzirem compostos para sua própria defesa.

De acordo com Silva Filho e Vidor (2001), o potencial de solubilização de microrganismos depende dos fatores nutricionais do substrato. Fungos do gênero *Trichoderma* são indicados como eficientes para solubilizar fosfatos e incrementar a fertilidade do solo e o crescimento de plantas de mangue (Saravanakumar et al., 2013).

Segundo Bae et al. (2009), um isolado endofítico, *Trichoderma hamatum*, colonizando a raiz de *Theobroma cacao*, favoreceu o crescimento radicular resultando em maior aquisição de água e, conseqüentemente, protelou os efeitos negativos do estresse hídrico. Em plantas de *Arabidopsis*, foi observado estímulo ao desenvolvimento de raízes laterais e aumento da produção de biomassa, com a inoculação do fungo *Trichoderma virens*, pela maior produção de auxina, um

fitormônio que desempenha um papel chave no desenvolvimento do vegetal (Cornejo et al., 2009).

Foi demonstrado por Souza et al. (2008) que a espécie *Trichoderma stromaticum*, mesmo considerada uma indutora de resistência a fitopatógenos como *Moniliophthora perniciosa*, foi incapaz de induzir a resistência e o crescimento de plantas de cacau, possivelmente pelos níveis de resistência induzida não serem suficientes para bloquear a infecção do patógeno ou pela resistência sistêmica adquirida a *M. perniciosa* não ocorrer em cacau. A indução da resistência e a promoção do crescimento de plantas não é uma característica unificada em todo o gênero e a atividade no controle biológico de *Trichoderma stromaticum* não está envolvida nestes processos (Souza et al., 2008).

A influência no crescimento de plantas pode ser pelos compostos orgânicos voláteis oriundos de microrganismos. Hung et al. (2013) demonstraram o efeito destes compostos voláteis emitidos por *Trichoderma* spp. em *Arabidopsis thaliana* e concluíram que há eficiência na promoção do crescimento vegetal, sem contato físico entre as espécies. Tais compostos representam uma nova fronteira na seleção de fungos (Morath et al., 2012).

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P.; DE-LEIJ, F. A. A. M.; LYNCH, J. M. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediate growth promotion of Crack Willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal contaminated soil. **Microbial Ecology**, v. 54, p. 306-313, 2007.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2926–2933, 1999.

ARTUR, A. G.; CRUZ, M. C. P.; FERREIRA, M. E.; BARRETTO, V. C. M.; YAGI, R. Esterco bovino e calagem para formação de mudas de guanandi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 843-850, 2007.

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

BOTREL, M. C. G.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D.; PINTO, S. I. C.; MOURA, M. C. O.; ESTOPA, R. A. Caracterização genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. **Revista Árvore**, v. 30, p. 821-827, 2006.

CARVAJAL, L. H.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 615-631, 2009.

CORNEJO, H. A. C.; RODRIGUEZ, L. M.; PENAGOS, C. C.; BUCIO, J. L. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral roots growth an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, p. 1579-1592, 2009.

DRUZHININA, I. S.; SEIBOTH, V. S.; ESTRELLA, A. H.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C. M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 749-759, 2011.

ESITKEN, A.; YILDIZ, H. E.; ERCISLI, S.; DONMEZ, M. F.; TURAN, M.; GUNES, A. Effect of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 62-66, 2010.

GASPAROTTO Jr., A.; BRENZAN, M. A.; PILOTO, I. C.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; RODRIGUES FILHO, E.; FERREIRA, A. G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida do *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 28, p. 575-578, 2005.

HOHMANN, P.; JONES, E. E.; HILL, R. A.; STEWART, A. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings. **Fungal Biology**, v. 115, p. 759-767, 2011.

HUNG, R.; LEE, S.; BENNETT, J. W. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. **Fungal Ecology**, v.6, p. 19-26, 2013.

JUNIOR, A. G.; FERREIRA, I. C. P.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; JACOMASSI, E.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 24, p. 371–376, 2005.

LAURA, V. A.; MELOTTO, A. M.; BOCCHESI, R. A. Efeito de sombreamento no desenvolvimento de mudas de *Calophyllum brasiliense* Cambess. Clusiaceae – Guttiferae. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, p. 3889-3892, 2009.

LEMO, L. M. S.; MARTINS, T. B.; TANAJURA, G. H.; GAZONI, V. F.; BONALDO, J.; STRADA, C. L.; SILVA, M. G.; DALL’OGLIO, E. L.; JÚNIOR, P. T. S.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 432-439, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum. 1992. 352p.

MA, Y.; PRASAD, M. N. V.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 248-258, 2011.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Germinação e crescimento de *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma espécie típica de florestas inundadas. **Acta Botanica Brasileira**, v. 14, p.113-120, 2000a.

MARQUES, M. C. M.; JOLY, C. A. Estrutura e dinâmica de uma população de *Calophyllum brasiliense* Camb. em floresta higrófila do sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 23, p. 107-112, 2000b.

MATHIVANAN, N.; PRABAVATHY, V. R.; VIJAYANANDRAJ, V. R. Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. Ex S. F. gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield in rice. **Journal of Phytopathology**, v. 153, p. 697-701, 2005.

MELOTTO, A.; NICODEMO, M. L.; BOCCHESI, R. A.; LAURA, V. A.; GONTIJO NETO, M. M.; SCHLEDER, D. D.; POTT, A.; SILVA, V. P. Sobrevivência e crescimento inicial em campo de espécies florestais nativas do Brasil Central indicadas para sistemas silvipastoris. **Revista Árvore**, v. 33, p. 425-432, 2009.

MORATH, S. U.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 73-83, 2012.

MWANGI, A. M. K.; KAHANGI, E. M.; ATEKA, E.; ONGUSO, J.; MUKHONGO, R. W.; MWANGI, E. K.; JEFWA, J. M. Growth effect of microorganisms based commercial products inoculated to tissue cultured banana cultivated in three different soils in Kenya. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 152-162, 2013.

NAVARRO, E. C. Viabilidade econômica do *Calophyllum brasiliense*. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, v. 9, p. 1-36, 2007.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F.; DOUSSEAU, S.; VIEIRA, C. V. Efeito da temperatura e do tegumento na germinação de sementes de *Calophyllum brasiliense*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1872-1877, 2007.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; FILHO, V. C. Gênero *Calophyllum*: Importância Química e Farmacológica. **Química Nova**, v. 29, p. 549–554, 2006.

RAWAT, L.; SINGH, Y.; SHUKLA, N.; KUMAR, J. Alleviation of the adverse effects of salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) by seed biopriming with salinity tolerant isolates of *Trichoderma harzianum*. **Plant and Soil**, v. 347, p. 387-400, 2011.

REIS, C. A. F.; SOUZA, A. M.; MENDONÇA, E. G.; GONÇALVES, F. R.; MELO, R. M. G.; CARVALHO, D. Diversidade e estrutura genética espacial de *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) em uma floresta paludosa. **Revista Árvore**, v. 33, p. 265-275, 2009.

SANTOS, J. Z. L.; RESENDE, A. V.; NETO, A. E. F.; CORTE, E. F. Crescimento, acúmulo de fósforo e frações fosfatadas em muda de sete espécies arbóreas nativas. **Revista Árvore**, v. 32, p.799-807, 2008a.

SANTOS, L. S.; OLIVEIRA, M. N.; GUILHON, G. M. S. P.; SANTOS, A. S.; FERREIRA, I. C. S.; LOPES-JUNIOR, M. L.; ARRUDA, M. S. P.; SAILVA, M. N.; SOUZA FILHO, A. P. S.; RODRIGUES FILHO, E.; OLIVEIRA, M. C. F. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta Daninha**, v. 26, p. 539-548, 2008b.

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

SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, v. 95, p. 76-84, 2005.

SILVA, R. L.; OLIVEIRA, M. L.; MONTE, M. A.; XAVIER, A. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. **Agronomia Costarricense**, v. 34, p. 99-104, 2010.

SILVA, R. L. O.; LUZ, J. S.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Fungos endofíticos em *Annona* spp.: isolamento, caracterização enzimática e promoção do crescimento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, p. 649-655, 2006.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 1495-1508, 2001.

SOFO, A.; TATARANNI, G.; XILOYANNIS, C.; DICHIO, B.; SCOPA, A. Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6® (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) rootstock. **Environmental and Experimental Botany**, v. 76, p. 33-38, 2012.

SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 11-18, 2007.

SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; SANTOS, R. A. N.; RAO, V. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 452-458, 2009.

SOUZA, J. T.; BAILEY, B. A.; POMELLA, A. W. V.; ERBE, E. F.; MURPHY, C. A.; BAE, H.; HEBBAR, P. K. Colonization of cacao seedlings by *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the witches' broom pathogen, and its influence on plant growth and resistance. **Biological Control**, v. 46, p. 36-45, 2008.

STEFAN, M.; MUNTEANU, N.; STOLERU, V.; MIHASAN, M.; HRITCU, L. Seed inoculation with plant growth promotion rhizobacteria enhances photosynthesis and yield of runner bean (*Phaseolus coccineus* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 22-29, 2013.

TUCCI, M.; RUOCCO, M.; MASI, L.; PALMA, M.; LORITO, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v.12, p. 341-354, 2011.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; BARBETTI, M. J.; LI, H.; WOO, S. L.; LORITO, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 72, p. 80-86, 2008a.

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

WANG, B.; PRIEST, M. J.; DAVIDSON, A.; BRUBAKER, C. L.; WOODS, M. J.; BURDON, J. J. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. **Mycological Research**, v. 3, p. 347-354, 2007.

### 3. OBJETIVOS GERAIS

- Isolar fungos do gênero *Trichoderma* rizosféricos e endofíticos de raízes de mudas de guanandi, coletadas em viveiro e em campo.
- Avaliar o potencial dos isolados de *Trichoderma* spp. na solubilização de fosfatos de cálcio, ferro e alumínio.
- Avaliar a habilidade dos isolados de *Trichoderma* spp. na síntese dos fitormônios auxina, citocinina e giberelina.
- Determinar o efeito de fermentados de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de guanandi *in vitro*.

## CAPÍTULO I

### **ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. ENDOFÍTICOS E RIZOSFÉRICOS DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* CAMBESS)**

**Isolamento e avaliação da capacidade de solubilização de fosfatos por isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos e rizosféricos de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess)**

**RESUMO** - O desenvolvimento de espécies vegetais depende de diversos fatores, com destaque para a disponibilidade de nutrientes. Nesse sentido, microrganismos solubilizadores de fosfatos podem maximizar o desenvolvimento de plantas, pela disponibilização de nutrientes, principalmente fósforo (P) e, ou produção de fitormônios. Com este trabalho, objetivou-se testar a habilidade de fungos do gênero *Trichoderma* em solubilizar fosfatos de cálcio, ferro e alumínio, isolados do interior das raízes e rizosfera de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess). Uma planta de guanandi encontrada em campo e outra cultivada em viveiro foram escolhidas para o isolamento dos microrganismos. Para tanto, raízes finas foram coletadas, levadas para laboratório e feito o isolamento utilizando meio de cultura seletivo TSMC, específico para *Trichoderma*. A partir de guanandi coletado em campo, foram obtidos 12 isolados deste gênero que, para os testes de capacidade das três fontes fosfatadas supracitadas, foram cultivados em caldo batata dextrose (BD), adicionado das respectivas fontes. Nestes testes, também foi utilizada uma cepa de *T. asperellum*, a partir de um inoculante comercial. Em seguida, procedeu-se a centrifugação das culturas e o sobrenadante foi extraído para detecção da solubilização por colorimetria em espectrofotômetro (725 nm). Dentre os isolados testados, observou-se três deles capazes de solubilizar fosfato de cálcio, 12 solubilizadores de fosfato de ferro e três que solubilizam fosfato de alumínio. Desta forma, há isolados do gênero *Trichoderma* que podem beneficiar o desenvolvimento vegetal, tanto pela sua conhecida capacidade antagonista a fungos fitopatogênicos, quanto pela habilidade de solubilização e disponibilização de fosfatos.

**Palavras-chave:** fungo, inoculantes, cálcio, ferro, alumínio

**ABSTRACT** - Plant growth depends of several factors mainly the nutrient availability. P-solubilizing microorganisms can increase the plant growth by nutrient availability mainly P and or phytohormones production. This work aimed to evaluate the ability to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates by *Trichoderma* fungi isolate from

the endophytic root environment and rhizosphere of *C. brasiliense* Cambess. Two seedlings were collected, one from field and other from nursery conditions to isolate them. Fine roots were collected and isolation of *Trichoderma* isolates were performed using TSMC medium. Twelve fungi isolates from the field seedling were obtained. These isolates were incubated in potato dextrose medium added with three P sources separately. One *T. asperellum* commercial strain was also evaluated. Growth media containing the isolates were centrifugated and supernatant extracted to determine the P solubilization colorimetrically in spectrophotometer. Three fungi isolates were capable to solubilize calcium phosphate while 12 solubilized iron phosphate and three aluminum phosphate. Therefore, there are *Trichoderma* isolates able to improve the plant growth through the antagonistic capacity to pathogenic fungi or their ability to solubilize phosphates.

**Key words:** fungi, inoculum, calcium, iron, aluminum

## 1. INTRODUÇÃO

Guanandi (*Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae) é uma espécie nativa do Brasil encontrada principalmente no centro-oeste, norte e sudeste do país. Destaca-se por apresentar algumas particularidades importantes em programas de reflorestamento, principalmente pela sua habilidade em crescer em ambientes alagados (Oliveira e Joly, 2010).

A comunidade microbiana edáfica, de modo geral, atua cooperativamente para o bom desenvolvimento de plantas. Sendo assim, destaca-se a importância das investigações, visando à compreensão da diversidade e a dinâmica destas espécies, já que a interação planta-microrganismo pode favorecer a propagação de espécies vegetais de interesse (Singh et al., 2011).

Fungos do gênero *Trichoderma* são comuns em solos, possuem ampla diversidade de espécies e são caracterizados por diversas habilidades, destacando a promoção do crescimento e desenvolvimento de plantas, fato que justifica os trabalhos de isolamento e seleção das espécies deste gênero, visando seu uso para incrementar a

produção de mudas (Hagn et al., 2007; Bae et al., 2009; Cornejo et al., 2009; Tucci et al., 2011; Rawat et al., 2011; Sofo et al., 2012).

Espécies rizosféricas de *Trichoderma* podem ser selecionadas para uso como inoculantes, que atuam no controle biológico de fitopatógenos e estimulam o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Avis et al., 2008).

Algumas cepas deste gênero são encontradas no ambiente endofítico e não causam nenhum dano ao hospedeiro, potencializando as possibilidades de aplicações, prioritariamente, a promoção de crescimento e controle de patógenos em plantas (Santos e Varavallo, 2011). O uso de inoculantes visando à promoção do crescimento de plantas depende da boa seleção, a partir do isolamento de espécies microbianas, consideradas eficientes para a obtenção de plantas saudáveis (Minaxi et al., 2012). Segundo Sandoval et al. (2012), o estresse térmico é o principal fator que reduz a sobrevivência de esporos de *Trichoderma harzianum*, enquanto o método de desidratação não tem nenhum impacto negativo sobre os esporos.

O incremento de massa fresca e seca da parte aérea de maracujazeiro pelo uso de *Trichoderma* spp. foi constatado por Santos et al. (2010). Villalobos et al. (2013) sugerem o uso de *Trichoderma asperellum* em mangueiras (*Mangifera indica* L.) para o aumento da produtividade e desenvolvimento vegetal, em razão do potencial como agente de controle biológico. Além disso, Su et al. (2012) e Tan e Ting (2012) relataram que esta espécie fúngica é promissora para possíveis usos em biorremediação, como bioissorventes.

As espécies *Trichoderma koningii*, *T. polysporum*, *T. harzianum* e *T. viridae* foram apontadas por Gava e Menezes (2012) como eficientes no controle de patógenos de solo e apresentaram ativa colonização da rizosfera. A seleção de novos isolados de *Trichoderma* pode ser uma estratégia adequada para minimizar ou evitar o uso de pesticidas químicos (Mondéjar et al., 2011).

A colonização de raízes por *Trichoderma* spp. pode alterar substancialmente o perfil metabólico da planta, refletindo em fornecimento de energia necessária à ativação do sistema de defesa e promoção de crescimento vegetal (Brotman et al., 2012). Estas espécies atuam, inclusive, na preservação da sanidade de sementes, durante sua permanência no solo, cumprindo a função específica na regeneração natural dos ecossistemas (Silva et al., 2007).

O desenvolvimento de espécies vegetais depende de diversos fatores, com destaque para a disponibilidade de nutrientes (Correa et al., 2010). Nesse sentido,

microrganismos solubilizadores de fosfatos (MSF) podem maximizar o desenvolvimento de plantas, pela disponibilização de nutrientes, principalmente P. A eficiência agrônômica do uso de fontes fosfatadas é maior, se associadas com espécies microbianas solubilizadoras de P, uma vez que a combinação destas pode aumentar a sustentabilidade da produção agrícola em um sistema de reutilização de P, a partir de resíduos oriundos do metabolismo microbiano (Hameeda et al., 2008; Postma et al., 2010; Shrivastava et al., 2011).

A maior parte do fosfato natural não pode ser absorvida pelas plantas, sendo o excesso uma das principais causas de eutrofização de corpos hídricos. O principal foco dos pesquisadores não é a eliminação da adubação fosfatada, mas sua reciclagem pela atividade microbiana (Xiang et al., 2012). Os MSF maximizam o desenvolvimento de plantas e podem ser eficientes mesmo em condições de estresse salino (Antoum, 2012; Srinivasan et al., 2012). A eficiência da solubilização de fosfatos depende tanto da fonte fosfatada como da presença de diferentes fontes de carbono e nitrogênio para os MSF (Barroso et al., 2006). Quanto maior a atividade microbiana, maior é a disponibilidade de P, podendo ser estimulado pela alta concentração de C em resíduo de tremoço, como demonstrado por Elgharably e Marschner (2011).

Segundo Altomare et al. (1999), *Trichoderma harzianum* é capaz de solubilizar fosfatos e, com isso, promover o desenvolvimento de plantas. De acordo com Singh et al. (2010), esta espécie fúngica pode melhorar as atividades antioxidantes de soja para aplicações na indústria alimentícia.

A contribuição de *Trichoderma asperellum* T34 em disponibilizar ferro para plantas de pepino em solo calcário foi demonstrada por Santiago et al. (2013). Já Oliveira et al. (2012), constataram a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em todos os isolados fúngicos testados deste gênero.

Objetivou-se com esta pesquisa isolar e avaliar a capacidade de solubilização de fosfatos, de fungos do gênero *Trichoderma* a partir do interior das raízes e rizosfera de guanandi, coletado em campo e em viveiro.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostragem**

Mudas de guanandi foram cultivadas em viveiro, durante 120 dias, em tubetes, utilizando solo (horizonte B de um Latossolo Vermelho), coletado na área de

preservação permanente do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO. As mudas foram irrigadas diariamente (sistema automatizado). Para o isolamento de fungos do gênero *Trichoderma*, a partir de planta em campo, foi escolhido um indivíduo situado nas coordenadas Latitude 17° 48' 1.692" S e Longitude 50° 53' 57.0696" W. O sistema radicular ou parte dele, com solo aderido ao mesmo, foi coletado de uma planta de viveiro e um indivíduo em campo, acondicionados em caixa isotérmica e levados ao Laboratório de Microbiologia Agrícola da instituição para processamento.

## 2.2 Isolamento de fungos rizosféricos

Foram transferidos 10g de fragmentos da raiz com solo aderido para um erlenmeyer contendo 90 mL de água peptonada. Este foi deixado em agitação (90 rpm) por 1 hora para retirar o solo da rizosfera do guanandi, efetuar as diluições seriadas e posterior plaqueamento das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ .

## 2.3 Isolamento de fungos endofíticos

As raízes foram lavadas em água corrente para retirada do solo aderido, posteriormente deixadas em agitação com Tween 80 e enxaguadas até a remoção total do mesmo. Para eliminar a microbiota da superfície externa das raízes, estas foram tratadas com álcool (70%), durante 1 minuto, hipoclorito de sódio (2 %), por 3 minutos, novamente com álcool 70% e água destilada esterilizada, para a remoção das soluções utilizadas. Foram selecionados fragmentos intactos para posterior inoculação em meio seletivo.

Para o isolamento de fungos rizosféricos e endofíticos do gênero *Trichoderma*, foi utilizado o meio de cultura seletivo TSMC (*Trichoderma* Selective Medium with Captan). Após a inoculação em superfície das três diluições a partir do solo rizosférico, e também dos fragmentos do tecido radicular, as placas foram incubadas a 25 °C. Com o aparecimento das unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos, foi feita a repicagem, usando o meio BDA (Ágar Batata Dextrose). No 13° dia de incubação, foi avaliada a frequência de colonização dos fragmentos radiculares, considerando a seguinte fórmula:

$$\text{Frequência de colonização} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de fragmentos colonizados} * 100}{\text{n}^{\circ} \text{ total de fragmentos}}$$

## 2.4 Identificação dos isolados fúngicos

Após o isolamento dos fungos, foram observadas suas características culturais em meio BDA e realizado o microcultivo de cada um deles. Foi utilizado o programa ANATIQUANTI para mensurar o tamanho dos esporos nas observações microscópicas (Aguilar et al., 2007).

## 2.5 Determinação da capacidade de solubilização de fosfato *in vitro*

### 2.5.1 Teste qualitativo

Os fungos do gênero *Trichoderma* obtidos a partir da rizosfera de guanandi e do tecido radicular, foram cultivados em meio GELP com precipitado de  $\text{CaHPO}_4$  (10%), conforme Sylvester-Bradley et al. (1982), com o intuito de verificar a ocorrência de halo transparente entorno do micélio de isolados solubilizadores.

### 2.5.2 Teste quantitativo

Os isolados foram cultivados em meio BD com  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{FePO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$ , separadamente, e incubados sob agitação durante 15 dias. Para a solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  e  $\text{AlPO}_4$  foi também testada a cepa *Trichoderma asperellum* T22, isolada a partir do inoculante comercial Trichodermax EC<sup>®</sup>.

Para a quantificação da capacidade de solubilização, foi feita a curva de calibração para obter as concentrações crescentes, em que foi utilizada uma solução estoque de ácido fosfórico ( $20 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A partir desta, foram retirados 0, 100, 200, 300, 500, 700 e 900  $\mu\text{L}$  e adicionada água destilada até completar o volume de 1,0 mL. Posteriormente, foi adicionado 1,0 mL do reagente de trabalho (0,4 g ácido ascórbico; 100 mL da solução 725 – 1,0 g de subcarbonato de bismuto, 68 mL de ácido sulfúrico, 300 mL de água destilada/ 20 g de molibdato de amônio, 68 mL de ácido sulfúrico, 300 mL de água destilada; 900 mL de água destilada), em todos os tubos da curva padrão.

Foi retirado 1,5 mL das culturas para centrifugação a 8000 rpm, por 10 minutos sob refrigeração (4 °C). Foi transferido 1,0 mL do sobrenadante para tubos de ensaio e adicionado 1,0 mL do reagente de trabalho. Após agitação e a manutenção em repouso, durante 20 minutos, foi determinada a solubilização de fosfatos em espectrofotômetro (725 nm).

## 2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias relativas à capacidade de solubilização de fosfatos, comparadas pelo teste Scott-Knott (5%), com o auxílio do software estatístico SISVAR (Ferreira, 2011).

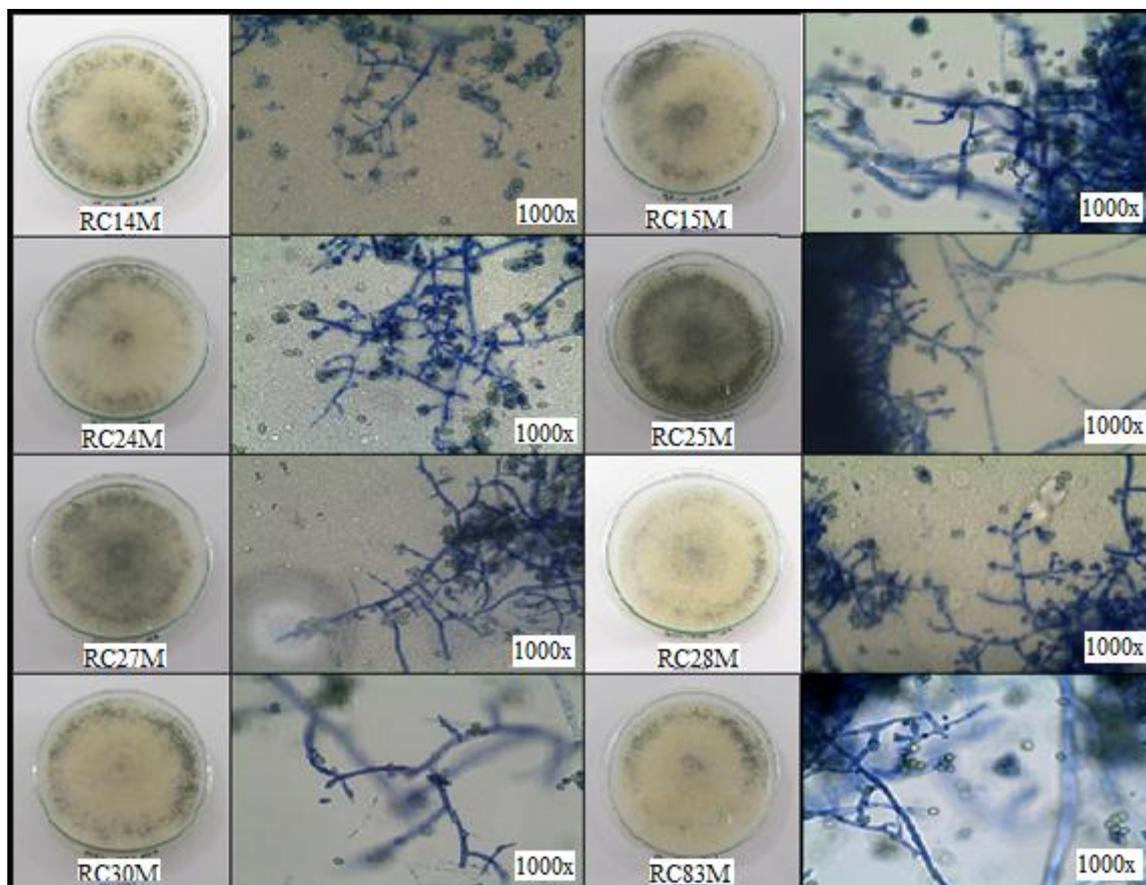
## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da muda de guanandi cultivada em viveiro, foram isolados 30 fungos rizosféricos e 12 endofíticos. Já a partir da muda em campo, foram isolados 83 fungos rizosféricos e 18 endofíticos.

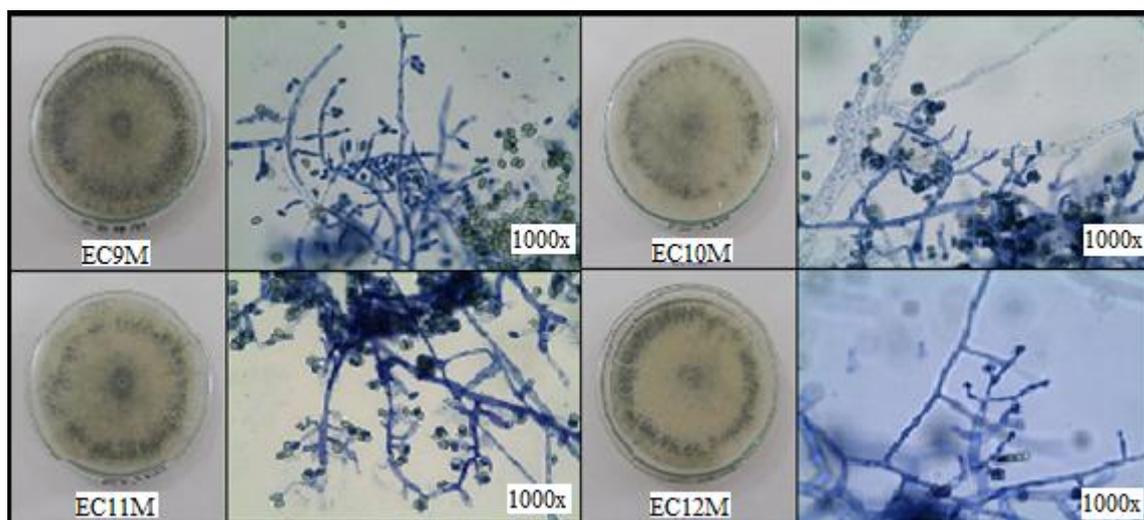
Dentre os isolados da planta cultivada em viveiro, não foi encontrado nenhum pertencente ao gênero *Trichoderma*, enquanto, dos fungos isolados de guanandi coletado em campo, foram encontrados oito na rizosfera e quatro no ambiente endofítico da raiz (Figuras 1 e 2).

Guanandi cultivado em campo possibilitou o isolamento de maior densidade de microrganismos e fungos do gênero *Trichoderma*, certamente, pela maior concentração de matéria orgânica e solo com maior diversidade de espécies vegetais que o solo utilizado para cultivo de mudas em viveiro. Tendo em vista que as mudas de viveiro foram cultivadas sob condições de maior estresse: baixa concentração de matéria orgânica, sistema radicular confinado em tubete e solo de horizonte B, naturalmente, menor densidade de espécies microbianas deveria ser encontrada.

A frequência de colonização dos fragmentos do tecido da raiz foi de 47,5% em 13 dias de incubação. Considerando a frequência de fungos do gênero *Trichoderma*, observou-se maior incidência de endofíticos deste gênero, sendo que foram identificados 9,63% rizosféricos e 22,22% endofíticos.



**Figura 1** – Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos a partir da rizosfera de guanandi coletado em área de preservação permanente, em Rio Verde, GO. Esporos: RC14M: C – 25,19  $\mu$ , L – 16,41  $\mu$ ; RC15M: C – 25,07  $\mu$ , L – 18,05 $\mu$ ; RC24M: C – 24,47  $\mu$ , L – 15,89  $\mu$ ; RC25M: C – 25,54 $\mu$ , L – 16,89  $\mu$ ; RC27M: C – 27,11  $\mu$ , L – 15,78  $\mu$ ; RC28M: C – 26,91  $\mu$ , L – 16,94  $\mu$ ; RC30M: C – 28,58  $\mu$ , L – 19,20  $\mu$ ; RC83M: C – 28,92  $\mu$ , L – 17,57  $\mu$  (C = comprimento, L = largura).



**Figura 2** – Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos a partir do interior das raízes de guanandi coletado em área de preservação permanente, em Rio Verde, GO. Esporos: EC9M: C – 28,39  $\mu$ , L – 18,81  $\mu$ ; EC10M: C – 29,33  $\mu$ , L – 17,54  $\mu$ ; EC11M: C – 25,77  $\mu$ , L – 16,16  $\mu$ ; EC12M: C – 25,31  $\mu$ , L – 17,53  $\mu$  (C = comprimento, L = largura).

Em meio GELP sólido, não foi possível observar a capacidade de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$ , em razão do rápido crescimento dos isolados testados. Dentre os isolados cultivados em meio BD, com as fontes fosfatadas supracitadas, observou-se um isolado capaz de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$ , 12 solubilizadores de  $\text{FePO}_4$  e dois que solubilizam  $\text{AlPO}_4$ . Desta forma, há isolados do gênero *Trichoderma* que podem beneficiar o desenvolvimento vegetal, tanto pela sua conhecida capacidade antagonista a fungos fitopatogênicos, quanto pela habilidade de solubilização e, ou disponibilização de fosfatos.

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram capacidade de solubilização de  $\text{FePO}_4$  (Tabela 1). No caso da solubilização de  $\text{AlPO}_4$ , somente os isolados EC10M e EC12M demonstraram tal capacidade. Similarmente, esses isolados e o RC28M foram capazes de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$ . *Trichoderma asperellum* T211 foi o isolado que mais solubilizou  $\text{AlPO}_4$ , mas não foi capaz de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$  (Tabela 1). O controle consistiu em meio BD com a fonte fosfatada somente.

**Tabela 1.** Teor de P solubilizado por isolados fúngicos do gênero *Trichoderma* em meio líquido, na presença de fosfato de cálcio, ferro e alumínio.

ISOLADO	CaHPO <sub>4</sub>	FePO <sub>4</sub>	AlPO <sub>4</sub>
	-----µg mL <sup>-1</sup> -----		
RC14M	4,12 d	5,24 b	0,73 e
RC15M	4,39 d	5,13 b	0,56 h
RC24M	4,53 c	5,52 b	0,59 g
RC25M	4,33 d	5,38 b	0,41 i
RC27M	4,21 d	5,54 b	0,56 h
RC28M	5,54 a	6,09 a	0,61 g
RC30M	4,41 d	6,45 a	0,58 h
RC83M	5,43 b	5,99 a	0,75 e
EC09M	5,35 b	5,74 a	0,67 f
EC10M	5,67 a	5,80 a	1,00 c
EC11M	5,20 b	5,67 b	0,67 f
EC12M	5,96 a	5,93 a	1,61 b
<i>T. asperellum</i>	4,19 d	NT	3,17 a
Controle	5,32 b	2,92 c	0,91 d

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). RC = isolado rizosférico; EC = isolado endofítico; NT = linhagem não testada.

Avaliando a comunidade de *Trichoderma* na rizosfera de *Coffea arabica* em floresta nativa, Mulaw et al. (2010), constataram, por métodos moleculares, alta diversidade de espécies pertencentes a este gênero. Técnicas para aumentar a população microbiana rizosférica são indispensáveis para otimizar os efeitos benéficos no crescimento, produtividade e resistência do vegetal, e reduzir os problemas associados com o uso de produtos químicos sintéticos (Avis et al., 2008). Microrganismos endofíticos, não causando nenhum dano para o vegetal, são de grande interesse na aplicação em programas de produção de plantas em escala comercial (Santos e Varavallo, 2011). O uso de meio seletivo é indispensável para o isolamento de microrganismos alvo, já que as práticas culturais podem alterar quantitativamente a microbiota do solo (Gil et al., 2009).

Fungos do gênero *Trichoderma* são estratégicos para o uso como inoculantes, a fim de maximizar a produção de mudas de espécies arbóreas, já que alguns isolados possuem a capacidade de solubilizar nutrientes presentes no solo, porém indisponíveis às plantas. Além disso, algumas espécies microbianas produzem fitormônios que estimulam o enraizamento, alongação de caule ou ampliação da parte aérea. O comportamento ecológico e a capacidade de colonização em raízes de estirpes de

*Trichoderma* devem ser incluídos como critérios de seleção, para posterior inoculação em plantas (Miranda et al., 2006). Estirpes microbianas selecionadas e inoculadas devem ser capazes de competir com patógenos, cooperar com outros microrganismos benéficos e favorecer a nutrição e o desenvolvimento vegetal (Richardson et al., 2009).

Kapri e Tewari (2010) isolaram 14 linhagens de *Trichoderma* sp. a partir da rizosfera de diferentes espécies vegetais e constataram a capacidade de solubilização de fosfatos em todas elas, em diferentes proporções. Os mecanismos de captação de P dependem da capacidade do microrganismo de colonizar a raiz da planta, revelando determinante a distribuição e a atividade metabólica de isolados microbianos para a preparação de inoculantes (Behbahani, 2010).

De acordo com John et al. (2010), plantas de soja apresentam maior crescimento da parte aérea e da raiz quando inoculadas com *Trichoderma viride*. A solubilização de fosfatos por microrganismos desempenha importante papel no fornecimento de P para as plantas. Neste sentido, fungos de outros gêneros, como *Aspergillus* e *Penicillium* são similarmente eficientes (Mittal et al., 2008; Coutinho et al., 2012). O uso de espécies solubilizadoras de fosfatos como biofertilizantes é uma abordagem eficaz para substituir ou minimizar a dependência por adubos químicos (Mamta et al., 2010). A aplicação de *Trichoderma* spp. combinada com outras espécies microbianas pode ser uma boa estratégia para incrementar o crescimento, absorção de nutrientes e a produção vegetal (Rudresh et al., 2005).

Carvajal et al. (2009) relataram o potencial solubilizador de fosfatos em 20% de 101 isolados de *Trichoderma* spp. Badawi et al. (2011) demonstraram que *Trichoderma harzianum* possui maior habilidade de solubilizar fosfatos, em comparação com *Bradyrhizobium* spp. e *Serratia marscescens*.

#### 4. CONCLUSÕES

O isolamento de *Trichoderma* spp. em meio seletivo, a partir da rizosfera e do ambiente endofítico do tecido radicular de guanandi, é mais apropriado utilizando plantas cultivadas em campo do que em viveiro.

Os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados solubilizam fosfatos em diferentes proporções e têm potencial de uso como inoculantes, para incrementar a formação de mudas de guanandi.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, T. V.; SANTOS, B. F. S.; AZEVEDO, A. A.; FERREIRA, R. S. ANATI QUANTI: Software de análises quantitativas para estudos em anatomia vegetal. **Planta Daninha**, v. 25, p. 649-659, 2007.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 2926-2933, 1999.

ANTOUN, H. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. **Procedia Engineering**, v. 46, p. 62-67, 2012.

AVIS, T. J.; GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 1733-1740, 2008.

BADAWI, F. S. F.; BIOMY, A. M. M.; DESOKY, A. H. Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, p. 17-25, 2011.

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

BARROSO, C. B.; PEREIRA, G. T.; NAHAS, E. Solubilization of  $\text{CaHPO}_4$  and  $\text{AlPO}_4$  by *Aspergillus niger* in culture media with diferente carbono and nitrogen sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 434-438, 2006.

BEHBAHANI, M. Investigation of biological behavior and colonization ability of Iranian indigenous phosphate solubilizing bacteria. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 393-399, 2010.

BROTMAN, Y., LISEC, J.; MÉRET, M.; CHET, I.; WILLMITZER, L.; VITERBO, A. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma* induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. **Microbiology**, v. 158, p. 139-146, 2012.

CARVAJAL, L. H.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, p. 409-416, 2009.

CORNEJO, H. A. C.; RODRIGUEZ, L. M.; PENAGOS, C. C.; BUCIO, J. L. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral roots growth an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, p.1579-1592, 2009.

CORREA, M. F.; QUINTANA, A.; DUQUE, C.; SUAREZ, C.; RODRÍGUEZ, M. X.; BAREA, J. M. Evaluation of actinomycete strains for key traits related with plant growth promotion and mycorrhiza helping activities. **Applied Soil Ecology**, v. 45, p. 209-217, 2010.

COUTINHO, F. P.; FELIX, W. P.; MELO, A. M. Y. Solubilization of phosphates *in vitro* by *Aspergillus* spp. And *Penicillium* spp. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 85-89, 2012.

ELGHARABLY, A.; MARSCHENER, P. Microbial activity and biomass and N and P availability in a saline sandy loam amended with inorganic N and lupin residues. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 310-315, 2011.

FERREIRA. D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p.1039-1042. 2011.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, p. 633-640, 2012.

GIL, S. V.; PASTOR, S.; MARCH, G. J. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. **Microbiological Research**, v. 164, p. 196-205, 2009.

HAGN, A.; WALLISCH, S.; RADL, V.; MUNCH, J. C.; SCHLOTTER, M. A new cultivation independent approach to detect and monitor common *Trichoderma* species in soils. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 86-92, 2007.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological Research**, v. 163, p. 234-242, 2008.

JOHN, R. P.; TYAGI, R. D.; PRÉVOST, D.; BRAR, S. K.; POULEUR, S.; SURAMPALLI, R. Y. Mycoparasitic *Trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. adzuki and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean. **Crop Protection**, v. 29, p. 1452-1459, 2010.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potencial and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 787-795, 2010.

MAMTA; RAHI, P.; PATHANIA, V.; GULATI, A.; SINGH, B.; BHANWRA, R. K.; TEWARI, R. Stimulatory effect of phosphate solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside – A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 222-229, 2010.

MINAXI, L. N.; YADAV, R. C.; SAXENA, J. Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi arid deserts. **Applied Soil Ecology**, v. 59, p. 124-135, 2012.

MIRANDA, M. E. A.; ESTRELLA, A. H.; CABRIALES, J. J. P. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic (*Allium sativum* L.) by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white rot under field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 1823-1830, 2006.

MITTAL, V.; SINGH, O.; NAYYAR, H.; KAUR, J.; TEWARI, R. Stimulatory effect of phosphate solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 718-727, 2008.

MONDÉJAR, R. L.; ROS, M.; PASCUAL, J. A. Mycoparasitism related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. **Biological Control**, v. 56, p. 59-66, 2011.

MULAW, T. B.; KUBICEK, C. P.; DRUZHININA, I. S. The rhizosphere of *Coffea Arabica* in its native highland forests of Ethiopia provides a niche for a distinguished diversity of *Trichoderma*. **Diversity**, v. 2, p. 527-549, 2010.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma spp.* **Revista Verde**, v. 7, p. 149-155, 2012.

OLIVEIRA, V. C.; JOLY, C. A. Flooding tolerance of *Calophyllum brasiliense* Camb. (Clusiaceae): morphological, physiological and growth responses. **Trees**, v. 24, p. 185-193, 2010.

POSTMA, J.; NIJHUIS, E. H.; SOMEUS, E. Selection of phosphorus solubilizing bacteria with biocontrol potential for growth in phosphorus rich animal boné charcoal. **Applied Soil Ecology**, v. 46, p. 464-469, 2010.

RAWAT, L.; SINGH, Y.; SHUKLA, N.; KUMAR, J. Alleviation of the adverse effects of salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) by seed biopriming with salinity tolerant isolates of *Trichoderma harzianum*. **Plant and Soil**, v. 347, p. 387-400, 2011.

RICHARDSON, A. E.; BARCA, J. M.; MC NEILL, A. M.; COMBARET, C. P. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, p. 305-339, 2009.

RUDRESH, D. L.; SHIVAPRAKASH, M. K.; PRASAD, R. D. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 28, p. 139-146, 2005.

SANDOVAL, M. T. F.; GARCÍA, M. O.; GALINDO, E.; CARREÓN, L. S. Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 186-194, 2012.

SANTIAGO, A.; LÓPEZ, A. M. G.; QUINTERO, J. M.; AVILÉS, M.; DELGADO, A. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 598-605, 2013.

SANTOS, H. A.; MELLO, S. C. M.; PEIXOTO, J. R. Associação de isolados de *Trichoderma* spp. e ácido indol-3-butírico (AIB) na promoção de enraizamento de estacas e crescimento de maracujazeiro. **Bioscience Journal**, v. 26, p. 966-972, 2010.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, p. 199-212, 2011.

SHRIVASTAVA, M.; KALE, S. P.; D'SOUZA, S. F. Rock phosphate enriched post methanation bio sludge from kitchen waste based biogás plant as P source for mungbean and its effect on rhizosphere phosphatase activity. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 205-212, 2011.

SILVA, G. M.; MAIA, M. S.; MORAES, C. O. C.; MEDEIROS, R. B.; SILVA, C. S.; PEREIRA, D. D. Fungos associados a sementes de cevadilha vacariana (*Bromus*

*auleticus*) coletadas nas plantas e no solo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 353-357, 2007.

SILVESTER-BRADLEY, R.; ASAKAWA, N.; LA TORRACA, S.; MAGALHÃES, F. M. M.; OLIVEIRA, L. A.; PEREIRA, R. M. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v.12, p. 15-22, 1982.

SINGH, H. B.; SINGH, B. N.; SINGH, S. P.; NAUTIYAL, C. S. Solid state cultivation of *Trichoderma harzianum* NBRI-1055 for modulating natural antioxidants in soybean seed matrix. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6444-6453, 2010.

SINGH, J. S.; PANDEY, V. C., SINGH, D. P. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 140, p. 339-353, 2011.

SOFO, A.; TATARANNI, G.; XILOYANNIS, C.; DICHIO, B.; SCOPA, A. Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6<sup>®</sup> (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) rootstock. **Environmental and Experimental Botany**, v. 76, p. 33-38, 2012.

SRINIVASAN, R.; YANDIGERI, M. S.; KASHYAP, S.; ALAGAWADI, A. R. Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, p. 427-434, 2012.

SU, S. M.; ZENG, X. B.; LI, L. F.; DUAN, R.; BAI, L. Y.; LI, A. G.; WANG, J.; JIANG, S. Arsenate reduction and methylation in the cells of *Trichoderma asperellum* SM-12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1 investigate with X-ray absorption near edge structure. **Journal of Hazardous Materials**, v. 243, p. 364-367, 2012.

TAN, W. S.; TING, A. S. Y. Efficacy and reusability of alginate immobilized live and heat inactivated *Trichoderma asperellum* cells for Cu (II) removal from aqueous solution. **Bioresource Technology**, v.123, p. 290-295, 2012.

TUCCI, M.; RUOCCO, M.; MASI, L.; PALMA, M.; LORITO, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v.12, p. 341-354, 2011.

VILLALOBOS, S. S.; ORTIZ, D. A. G.; LIM, M. A. G.; FRIER, J. P. D.; FOLTER, S.; GARCÍA, P. S.; CABRIALES, J. J. P. Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.). **Biological Control**, v. 64, p. 37-44, 2013.

XIANG, Y. P.; LI, M.; HUI, C. M.; QIN, X. J.; FENG, H.; QUN, D. C.; HE, M. M.; HUANG, F. D.; QING, D. Y.; XIANG, Y. F. Phosphate solubilizing ability and phylogenetic diversity of bacteria from P-rich soils around Dianchi lake drainage area of China. **Pedosphere**, v. 22, p. 707-716, 2012.

## **CAPÍTULO II**

### **PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS POR ISOLADOS FÚNGICOS DO GÊNERO *Trichoderma* DE GUANANDI (*Calophyllum brasiliense* CAMBESS)**

## **Produção de fitormônios por isolados fúngicos do gênero *Trichoderma* de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess)**

**RESUMO** - A capacidade metabólica de alguns microrganismos em produzir fitormônios é importante na seleção e aplicação de algumas estirpes, visando melhorar ou mesmo promover o crescimento vegetal. Fungos do gênero *Trichoderma* são eficientes na síntese destes compostos, justificando seu isolamento e seleção para posterior aplicação para promover o crescimento vegetal. Objetivou-se com este trabalho verificar a habilidade de isolados de *Trichoderma* endofíticos e rizosféricos de guanandi em produzir auxina, citocinina e giberelina. Os isolados rizosféricos de *Trichoderma* RC14M e RC28M sintetizam AIA e possuem potencial de uso como inoculante para promover o crescimento e o desenvolvimento de mudas de guanandi. Isolados rizosféricos de *Trichoderma* são mais eficientes que a cepa comercial *Trichoderma asperellum* T211 na produção de AIA. Os isolados endofíticos de *Trichoderma* não demonstram capacidade de produção de AIA e nenhum dos isolados rizosféricos ou endofíticos, pertencentes a esse gênero, produz citocinina ou giberelina.

**Palavras-chave:** microbiota edáfica, fungos endofíticos, auxina, citocinina, giberelina

**ABSTRACT** - The metabolic capacity of some microorganisms to produce phytohormones is important on screening and application of some strains in order to improve the plant growth. Some *Trichoderma* isolates are effective in the synthesis of these compounds. Therefore, studies focused on isolation and screening for subsequent application to plant growth promoting are strategic. This work aimed to determine the ability of endophytic and rhizospheric *Trichoderma* isolates to produce auxin (IAA), cytokinin and gibberellin. The isolates were obtained from *C. brasiliense* Cambess. The rhizosphere isolates RC14M RC28M synthesize IAA. They have potential to be used as inoculum increasing the seedling growth of *C. brasiliense* Cambess. Rhizospheric isolates of *Trichoderma* showed higher potential to produce IAA than the commercial strain *T. asperellum* T211. The endophytic isolates did not show its ability, while none of the isolates produce cytokinin or gibberellin.

**Key words:** soil microorganisms, endophytic fungi, auxin, cytokinin, gibberellin

## 1. INTRODUÇÃO

O isolamento de algumas espécies microbianas é de interesse para uso posterior como inoculantes pelos benefícios da interação planta-microrganismo, visando aumentar o potencial do crescimento vegetal, a resistência a patógenos e a tolerância aos estresses abióticos, como seca e salinidade. Além disso, quando inoculadas em sementes, podem aumentar o índice de germinação e a velocidade de emergência de plântulas (Diniz et al., 2009; Groppa et al., 2012; Hermosa et al., 2012).

A síntese de fitormônios pode ser característica de alguns microrganismos e a determinação desta habilidade é estratégica, sendo que a concentração destes compostos pode ser determinante. Foi demonstrado por Kochar et al. (2011) que o drástico aumento nos níveis de auxinas, pela indução de sua produção por *Pseudomonas fluorescens*, desfavoreceu o desenvolvimento de raízes de sorgo e sugerem que a engenharia metabólica pode ser usada para gerar e potencializar estirpes microbianas de interesse. Segundo Soares et al. (2007), elevadas concentrações de citocininas podem afetar negativamente o alongamento de primórdios radiculares. Diante disso, justificam-se estudos para a quantificação da produção destes por espécies microbianas para posterior inoculação, estabelecendo a relação planta-microrganismo.

É considerada também a atividade conjunta de vários fitormônios (Chiwocha et al., 2005). Segundo Ferreira et al. (2007), os reguladores auxina, citocinina e giberelina atuam em conjunto, tanto na promoção da germinação, como na manutenção do crescimento do epicótilo e hipocótilo resultando na rápida emergência de plântulas de *Passiflora edulis*. A principal auxina nos vegetais superiores é o ácido indol-3-acético (AIA), sendo a mais abundante e de maior relevância fisiológica, estando envolvida em atividades biológicas, incluindo a capacidade de promover o alongamento celular em coleótilos e segmentos de caules, divisão celular em culturas de calos em presença de citocininas, formação de raízes adventícias em folhas ou caules destacados. As citocininas regulam a divisão celular na parte aérea, raízes e retardam a senescência foliar. As giberelinas podem estimular o crescimento do caule, são importantes para o crescimento da raiz, regulam a transição da fase juvenil para a fase adulta, influenciam a iniciação floral, promovem o desenvolvimento do pólen, o crescimento do tubo

polínico, a germinação e o desenvolvimento de plântulas (Taiz e Zeiger, 2009; Pio et al., 2012).

Fungos do gênero *Trichoderma* possuem relevância e impactam a comunidade microbiana rizosférica e, ocasionalmente, estabelecem interação positiva dentro das raízes. Dentre os diversos microrganismos promotores do crescimento vegetal, destacam-se os fungos deste gênero, pois também induzem, em alguns casos, a resistência do vegetal frente aos estresses bióticos e abióticos (Carvajal et al., 2009; Fontenelle et al., 2011). De acordo com Korolev et al. (2008), tratamentos com *Trichoderma* aumentam o crescimento de *Arabidopsis thaliana*, independentemente do genótipo. Mesmo não sintetizando fitormônios, algumas estirpes podem induzir a síntese pelo próprio vegetal (Sofa et al., 2011).

O AIA produzido por *Trichoderma atroviride*, a partir de diferentes precursores, pode estar envolvido no estímulo ao crescimento vegetal de tomateiro (Gravel et al. 2007). Esse fitormônio atua estimulando o crescimento de raízes, incrementando sua ramificação e, conseqüentemente, a área de exploração do solo, resultando em maior promoção do crescimento vegetal (Verma et al., 2010). Entre os microrganismos testados por Badawi et al. (2011), encontra-se *Trichoderma harzianum* que possui a habilidade de produzir AIA e que estimulou o desenvolvimento de plantas de amendoim.

A produção de auxinas por microrganismos, em alguns casos, pode ser considerada um dos principais meios para favorecer a promoção do crescimento de plantas e depende das condições de cultivo (Sridevi e Mallaiah, 2007a; Sridevi e Mallaiah, 2007b; Dastager et al., 2010). A interação de espécies vegetais com *Trichoderma harzianum* implica em alterações sistêmicas nos teores de diversos fitormônios e pode ter implicações fisiológicas no crescimento e resistência da planta (Medina et al., 2011). Além disso, esta espécie pode influenciar também no teor de nutrientes e produtividade em tomate (Nzanza et al., 2012). A maioria dos isolados do gênero *Trichoderma* testados por Oliveira et al. (2012) produziram AIA com ou sem o precursor L-triptofano.

Com este trabalho, objetivou-se avaliar a capacidade de produção de auxina, citocinina e giberelina por isolados fúngicos do gênero *Trichoderma*, endofíticos e rizosféricos de guanandi.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados isolados de *Trichoderma* spp. oriundos da rizosfera e do interior das raízes de guanandi, e a linhagem *Trichoderma asperellum* T211 isolada a partir do inoculante comercial Trichodermax EC<sup>®</sup>. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Agrícola da instituição.

### 2.1 Produção de Ácido Indol Acético (AIA)

#### 2.1.1 Cultivo dos isolados de *Trichoderma* spp. em meio líquido

Todos os isolados tiveram a concentração de esporos padronizada para  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, por meio de diluição com solução salina (0,9%). Os isolados foram cultivados em meio líquido BD (Batata Dextrose), adicionado de triptofano (1%). A incubação foi realizada sob agitação (90 rpm) por 13 dias, na ausência de luz.

#### 2.1.2 Determinação de AIA

Para a determinação quantitativa, inicialmente foi feita a curva de calibração, em que foi preparada uma solução estoque de AIA (300 µg mL<sup>-1</sup>) e diluída em água destilada para a obtenção das crescentes concentrações (0, 10, 20, 50, 100, 210, 430 e 500 µg mL<sup>-1</sup>).

Após a centrifugação das culturas (8000 rpm, 4°C, por 10 minutos), foi retirado 1,0 mL do sobrenadante, transferido para tubos de ensaio e adicionado 1,0 mL do reagente de Salkowski (0,62g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O; 33mL H<sub>2</sub>O; 50mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Estes foram deixados em repouso, durante 15 minutos, no escuro, e então determinada a produção de AIA, por colorimetria em espectrofotômetro (530 nm) (Gordon e Weber, 1950; Pereira et al., 2012).

### 2.2 Produção de Citocinina e Giberelina

Para avaliar a produção de citocinina e giberelina pelos isolados do gênero *Trichoderma*, foi utilizado o método sugerido por Cattelan (1999).

#### 2.2.1 Cultivo dos isolados

Os fungos foram cultivados em meio BD por oito dias. Após este período, as culturas foram centrifugadas (6000 rpm, a 4 °C por 10 minutos).

### 2.2.2 Germinação de sementes de rabanete

Sementes de rabanete foram passadas em peneira com 2 mm de abertura (ABNT 10) e germinadas sobre folhas de papel de filtro umedecidas em placas de Petri. Estas foram incubadas no escuro a 25 °C, por 35 horas.

### 2.2.3 Determinação da produção de citocinina e giberelina

Após a germinação, os hipocótilos e os cotilédones foram separados e transferidos para placas de Petri com papel filtro umedecido com o sobrenadante de cada isolado. Especificamente, foram utilizados 10 cotilédones menores e 10 fragmentos dos hipocótilos padronizados para 3 mm. Em seguida, foram incubados a 24 °C por 72 horas sob luz fluorescente fraca contínua, para comparação da biomassa dos cotilédones e o comprimento dos hipocótilos, em relação ao controle. O controle consistiu em papel de filtro umedecido apenas com o meio esterilizado.

### 2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias relativas à capacidade de sintetizar auxina, citocinina e giberelina, comparadas pelo teste Scott-Knott (5%), com o auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2011).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificada a capacidade de produção de AIA por dois isolados de *Trichoderma* spp. obtidos da rizosfera de guanandi, em meio BD contendo triptofano. Não foi detectada a produção deste fitormônio pelos isolados endofíticos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Síntese de ácido indol acético (AIA) por isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos e rizosféricos de guanandi, em meio BD adicionado de triptofano (1%)

ISOLADOS DE <i>Trichoderma</i> sp.	SÍNTESE DE AIA ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
RC14M	1,82 b
RC15M	1,30 c
RC24M	1,46 c
RC25M	1,38 c
RC27M	1,56 c
RC28M	2,18 a

RC30M	1,49 c
RC83M	1,32 c
EC09M	1,21 c
EC10M	1,25 c
EC11M	1,24 c
EC12M	1,47 c
<i>T. asperellum</i>	1,36 c
Controle	1,27 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%).\*RC = isolado rizosférico; EC = isolado endofítico

Não foi detectada a produção de citocinina e giberelina em nenhum dos isolados testados, já que houve diferença somente entre os hipocótilos e não houve diferença entre os cotilédones de rabanete, em nenhum dos tratamentos avaliados (Tabela 2).

**Tabela 2.** Síntese de citocinina e giberelina por isolados de *Trichoderma* spp. endofíticos e rizosféricos de guanandi

ISOLADO DE <i>Trichoderma</i> sp.	CITOCININA cotilédones (g)	GIBERELINA	
		hipocótilos (mm) + cotilédones (g)	
RC14M	0,050 a	3,625 c	0,050 a
RC15M	0,015 a	3,375 c	0,015 a
RC24M	0,020 a	3,875 b	0,020 a
RC25M	0,050 a	4,750 a	0,050 a
RC27M	0,035 a	3,125 c	0,035 a
RC28M	0,040 a	5,250 a	0,040 a
RC30M	0,035 a	3,500 c	0,035 a
RC83M	0,035 a	4,250 b	0,035 a
EC09M	0,050 a	4,000 b	0,050 a
EC10M	0,040 a	4,125 b	0,040 a
EC11M	0,040 a	4,500 b	0,040 a
EC12M	0,035 a	3,000 c	0,035 a
<i>T. asperellum</i>	0,040 a	4,125 b	0,040 a
Controle	0,040 a	3,125 c	0,040 a

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%) \*RC = isolado rizosférico; EC = isolado endofítico.

As auxinas promovem o crescimento de caules e coleótilos e inibem o crescimento de raízes (Taiz e Zeiger, 2009). Isolados de *Trichoderma* testados por Oliveira et al. (2012), foram capazes de produzir AIA e o uso do precursor L-triptofano proporcionou efeito positivo como indutor para a síntese deste fitormônio. Gravel et al.

(2007) verificaram a produção de AIA por *T. atroviride*, utilizando os precursores L-triptofano, triptamina e triptofol. A espécie *T. harzianum* também possui a capacidade de produzir este fitormônio, segundo Badawi et al. (2011).

A partir da inoculação de microrganismos produtores de citocinina, ocorre o aumento do peso dos cotilédones e, para os produtores de giberelina, aumenta o tamanho dos hipocótilos e o peso dos cotilédones (Cattelan, 1999). Além do papel na divisão celular na parte aérea e em raízes, as citocininas afetam outros processos, tais como desenvolvimento vascular, dominância apical e senescência foliar. As giberelinas estimulam tanto o alongamento quanto a divisão celular (Taiz e Zeiger, 2009).

Sugere-se a seleção de *Trichoderma* spp. para a produção de fitormônios, visando posterior uso como inoculantes para incrementar o crescimento e o desenvolvimento de guanandi, uma vez que não é uma habilidade unificada para todo o gênero.

#### 4. CONCLUSÕES

Os isolados rizosféricos de *Trichoderma* RC14M e RC28M sintetizam AIA e possuem potencial de uso como inoculante para promover o crescimento e o desenvolvimento de mudas de guanandi.

Isolados rizosféricos de *Trichoderma* são mais eficientes que a cepa comercial *Trichoderma asperellum* T211 na produção de AIA.

Os isolados endofíticos de *Trichoderma* não demonstram capacidade de produção de AIA e nenhum dos isolados rizosféricos ou endofíticos, pertencentes a esse gênero, produz citocinina e giberelina.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BADAWI, F. S. F.; BIOMY, A. M. M.; DESOKY, A. H. Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, p. 17-25, 2011.

CARVAJAL, L. H.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, p. 409-416, 2009.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999.

CHIWOCHA, S. D. S.; CUTLER, A. J.; ABRAMS, S. R.; AMBROSE, S. J.; YANG, J.; ROSS, A. R. S.; KERMODE, A. R. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. **The Plant Journal**, v. 42, p. 35-48, 2005.

DASTAGER, S. G.; DEEPA, C. K.; PANDEY, A. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp NII-0909 and its interaction with cowpea. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 987-992, 2010.

DINIZ, K. A.; SILVA, P. A.; OLIVEIRA, J. A.; EVANGELISTA, J. R. E. Sweet pepper seed responses to inoculation with microorganisms and coating with micronutrients, aminoacids and plant growth regulators. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 293-297, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, G.; COSTA, P. N.; FERRARI, T. B.; RODRIGUES, J. D.; BRAGA, J. F.; JESUS, F. A. Emergência e desenvolvimento de plântulas de maracujazeiro azedo oriundas de sementes tratadas com bioestimulante. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 29, p. 595-599, 2007.

FONTENELLE, A. D. B.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HARAKAVA, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 30, p. 1492-1500, 2011.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v. 26, p. 192-195, 1950.

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

GROPPA, M. D.; BENAVIDES, M. P.; ZAWOZNIK, M. S. Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: a revision. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 247-254, 2012.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17-25, 2012.

KOCHAR, M.; UPADHYAY, A.; SRIVASTAVA, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. **Research in Microbiology**, v. 162, p. 426-432, 2011.

KOROLEV, N.; DAVID, D. R.; ELAD, Y. The role of phytohormones in basal resistance and *Trichoderma*-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. **Bio Control**, v. 58, p. 667-683, 2008.

MEDINA, A. M.; ROLDÁN, A.; ALBACETE, A.; PASCUAL, J. A. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. **Phytochemistry**, v. 72, p. 223-229, 2011.

NZANZA, B.; MARAIS, D.; SOUNDY, P. Yield and nutrient content of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) as influenced by *Trichoderma harzianum* and *Glomus mosseae* inoculation. **Scientia Horticulturae**, v. 144, p. 55-59, 2012.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, v. 7, p. 149-155, 2012.

PEREIRA, G. V. M.; MAGALHÃES, K. T.; LORENZETTI, E. R.; SOUZA, T. P.; SCHWAN, R. F. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial

in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 405-417, 2012.

PIO, R.; DALASTRA, I. M.; RAMPIM, L.; SOUZA, F. B. M.; ASSIS, C. N.; TIBERTI, A. S. Pulverização foliar com ácido giberélico no crescimento do porta-enxerto de marmeleiro 'japonês'. **Revista Agrarian**, v. 5, p. 325-329, 2012.

SOARES, F. P.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; NOGUEIRA, R. C.; EMIRICH, E. B.; MARTINOTTO, C. Organogênese direta em explantes caulinares de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1048-1053, 2007.

SOFO, A.; SCOPA, A.; MANFRA, M.; NISCO, M.; TENORE, G.; TROISI, J.; FIORI, R.; NOVELLINO, E. *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* x *P. canescens*). **Plant Growth Regulation**, v. 65, p. 421-425, 2011.

SRIDEV, M.; MALLAIAH, K. V. Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania seban* (L.) Merr. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 178-182, 2007a.

SRIDEV, M.; MALLAIAH, K. V. Production of indole-3-acetic acid by *Rhizobium* isolates from *Sesbania* species. **African Journal of Microbiology Research**, v.1, p. 125-128, 2007b.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 4 ed, 2009.

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N.; LAVAKUSH; SINGH, V. Impact of plant growth promoting rhizobacteria on crop production. **International Journal of Agricultural Research**, v.5, p. 954-983, 2010.

### **CAPÍTULO III**

**PROPAGAÇÃO *IN VITRO* DE MUDAS DE GUANANDI  
(*Calophyllum brasiliense* CAMBESS) INOCULADAS COM  
FERMENTADOS DE ISOLADOS FÚNGICOS**

## **Propagação *in vitro* de mudas de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) inoculadas com fermentados de isolados fúngicos**

**RESUMO:** Sendo o guanandi uma espécie arbórea de grande interesse em programas de reflorestamento, justifica-se o estabelecimento de estratégias para maximizar a obtenção de mudas em escala comercial. Objetivou-se com o presente trabalho avaliar a influência de fermentados de fungos na propagação *in vitro* de guanandi. Inoculando o explante em meio MS e acrescentando o fermentado esterilizado de *Trichoderma* spp., com ou sem tratamento térmico, podem ser usados para aumentar o crescimento dos explantes.

**Palavras-chave:** *Trichoderma* spp., reflorestamento, vegetação arbórea

**ABSTRACT** – *C. brasiliense* Cambess is an interesting tree species to be used on reforestation programs. In this way, researches focused on establishment of strategies to maximize the nursery production under commercial scale are justified. This work aimed to evaluate the influence of fermented fungi on *C. brasiliense* Cambess propagation under *in vitro* conditions. The explants inoculated in MS medium, amended with sterilize fermented with or without heat treatment can be used to enhance the explant growth.

**Key words:** *Trichoderma* spp., reforestation, trees

### **1. INTRODUÇÃO**

A crescente demanda por produtos florestais tem aumentado a busca sobre os remanescentes de vegetação nativa, e com isso, induzido uma nova postura preservacionista, com relação às florestas típicas dessa vegetação. Verifica-se nos programas de reflorestamento com espécies nativas, que além dos problemas de fornecimento de sementes com qualidade e em quantidade suficientes para suprir a demanda, as técnicas de produção de mudas ainda são entraves para o sucesso desses projetos (Hernández et al., 2012).

A produção de mudas para o setor florestal é justificada quando há disponibilidade de genótipos de alta produtividade e, ou a semente é insumo limitado. Nestas condições, muitas das espécies nativas, possuem restrições para produção de mudas via sementes durante todo o ano, por causa da sazonalidade para obtenção das mesmas, estas têm o tempo de germinação longo e ser alta a variação na taxa de germinação (Lorenzi, 1992; Silva et al., 2010).

O guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) é uma espécie arbórea de grande interesse em reflorestamento visada pelo alto valor de sua madeira que é utilizada para diversos fins. Além disso, a casca e o látex são usados na medicina popular e veterinária destacando-se em terapias medicinais. Outra grande vantagem da planta é que se adapta bem a condições de sombra parcial e prevalece em solos mal drenados (Alvarado et al., 2007; Souza et al., 2009; Albernaz et al., 2010; Mata et al., 2011; Teixeira et al., 2011; Garen et al., 2011; Lemos et al., 2012). Segundo Silva et al. (2010), a taxa de germinação do guanandi está entorno de 15 a 90% e o tempo de germinação é de 145 dias, indisponibilizando grandes quantidades de mudas no mercado, fato este, que torna relevante os processos de propagação vegetativo desta espécie.

Diante do exposto, justifica-se a busca de alternativas para maximizar a propagação de mudas de guanandi e sob este contexto, o cultivo *in vitro* é recorrido quando a propagação sexuada é insatisfatória. Como via alternativa de propagação assexuada, a micropropagação via organogênese direta estabelece a diferenciação de brotações e raízes durante o crescimento do vegetal. Para a indução dos processos de desdiferenciação e rediferenciação responsáveis pela formação de tecidos e órgãos, além da escolha do explante mais adequado, é necessário o uso de regulador de crescimento capaz de estimular a formação de parte aérea e raízes (Kielse et al., 2009). Assim, as multiplicações de clones com a qualidade desejada, são obtidas com explantes como os segmentos nodais, que são mais apropriados para o estabelecimento *in vitro*, quando comparados com explantes reprodutivos, como as sementes (Assis et al., 2011).

Estudos realizados por Yadav et al. (2013) asseguram que plantas micropropagadas possuem melhor desempenho no seu crescimento, se espécies microbianas são inoculadas na fase de aclimatização, aumentando o índice de sobrevivência das mudas. De acordo com Altomare et al. (1999), Diez et al. (2012) e Oliveira et al. (2012) na comunidade microbiana edáfica, destacam-se fungos do gênero

*Trichoderma*, pelas inúmeras habilidades destes em favorecer o crescimento e o desenvolvimento de plantas, atuar na expressão de genes relacionados à defesa sistêmica do vegetal, na solubilização de fosfatos e micronutrientes presentes no solo, bem como pela produção de fitormônios.

Atribui-se a várias espécies de *Trichoderma* o aumento no crescimento de plantas destinadas à produção de mudas como o *Trichoderma asperellum*, indicado por Tchameni et al. (2011), como sendo essencial na promoção do crescimento de plantas de cacau (*Theobroma cacao* L.). Da mesma forma, de acordo com Pedro et al. (2012), cepas de *Trichoderma harzianum*, *T. strigosum* e *T. theobromicola* podem proporcionar aumentos superiores a 30% na produção de matéria seca da parte aérea de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Segundo Hohmann et al. (2011), espécies de *Trichoderma* aumentam o crescimento de mudas de *pinus* (*Pinus radiata*).

Frequentemente, as brotações produzidas *in vitro* são induzidas em meio de cultivo adicionados de citocininas e subsequentemente, estas brotações são enraizadas em um meio contendo auxina (Nicioli et al., 2008). Assim, para quebrar a dominância apical dos brotos e aumentar a taxa de multiplicação são utilizadas as citocininas, já as auxinas, apesar de não promoverem a proliferação de brotações axilares, podem auxiliar o crescimento do cultivo *in vitro*, induzindo a formação de raízes (Grimaldi et al., 2008; Kielse et al., 2009).

Segundo Borges et al. (2011), para a obtenção de melhores resultados na propagação vegetativa *in vivo* de plantas, em certas condições, a aplicação de substâncias promotoras de enraizamento, como as auxinas (naturais ou sintéticas) também é viável. Em condições de campo, tais substâncias podem ser sintetizadas por microrganismos, contribuem para o aumento da área de superfície da raiz e incrementam o desempenho do vegetal.

Assim sendo, averigua-se a importância em considerar a condução de estudos de propagação de mudas *in vitro* utilizando a interação planta-microrganismo, uma vez que produtos sintetizados por fungos e bactérias podem ser essenciais para a obtenção de bons resultados na produção de mudas (Golubevet al., 2011; Sosa-Rodriguez et al., 2013). Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar a influência de metabólitos em meio de cultura oriundos do cultivo de fungos na propagação *in vitro* de guanandi.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Agrícola e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde.

### 2.1 Aquisição do material vegetal

As sementes de guanandi foram adquiridas da empresa Tropical Flora Reflorestadora, com sede administrativa e comercial situada em Santo André, SP. Realizou-se a seleção manual e o descarte das sementes mal formadas. As sementes utilizadas contendo diásporos (endocarpo+tegumento) foram escarificadas manualmente para retirada do endocarpo. Em seguida, foram tratadas com Standak Top<sup>®</sup> (composto de fipronil, tiofanato-metílico e piraclostrobina). Utilizou-se 2 mL do produto adicionado de 50 mL de água para cada 1 kg de sementes. Estas foram imersas na solução antes do plantio.

As sementes tratadas foram germinadas em porções de 100 em bandejas plásticas (50 x 35 x 8 cm), contendo areia peneirada e substrato Bioplant<sup>®</sup>, totalizando 200 sementes, 100 para cada substrato. A germinação das sementes foi acompanhada e as mudas irrigadas periodicamente, de acordo com a necessidade.

Após 90 dias da sementeira, os segmentos nodais foram retirados com aproximadamente 4,0 cm de comprimento, e utilizados como fonte de explantes.

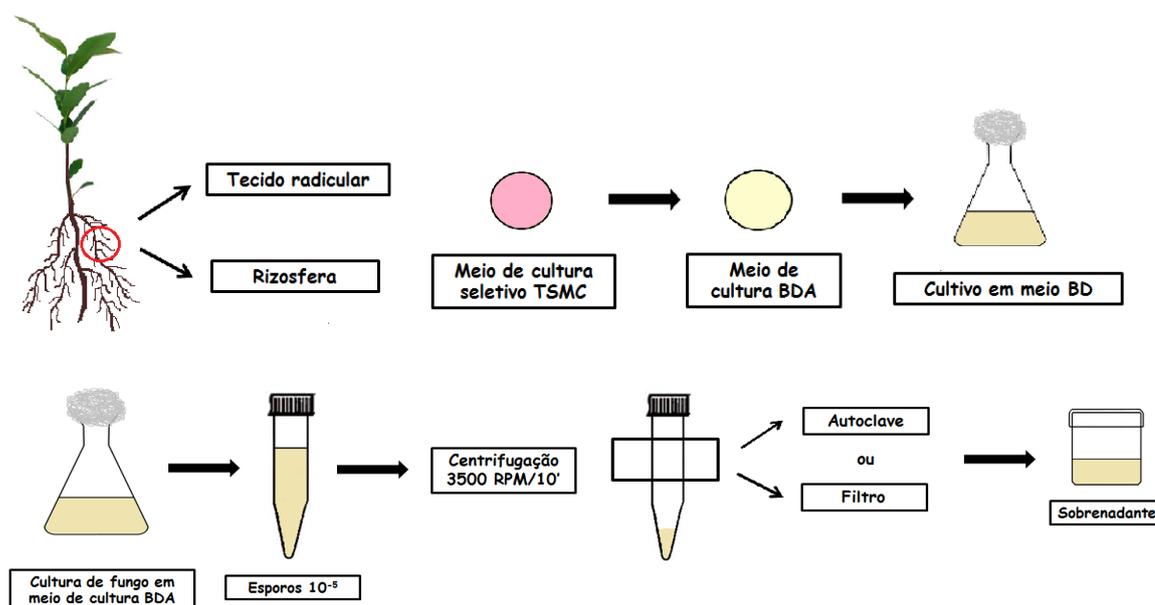
### 2.2 Preparo dos inoculantes fúngicos para inoculação dos explantes de guanandi

Dos isolados fúngicos obtidos a partir da raiz e rizosfera de guanandi e de um inoculante comercial, quatro foram selecionados de acordo com a habilidade em solubilizar fosfato e produzir fitormônio, sendo estes:

- RC28M – fungo do gênero *Trichoderma* isolado a partir da rizosfera de guanandi;
- RC82M – fungo não esporulante isolado a partir da rizosfera de guanandi;
- EC12M – fungo endofítico do gênero *Trichoderma* isolado de guanandi;
- *Trichoderma asperellum* T211 – cepa obtida a partir do inoculante comercial Trichodermax EC<sup>®</sup>.

Os fungos selecionados foram cultivados em meio de cultura Batata Dextrose (BD), durante sete dias. A contagem de esporos para padronização do inoculante foi realizada em câmara de Neubauer, com o auxílio do Sistema para Contagem de Esporos Microbianos CALIBRA (Santos et al., 2011).

O inóculo de cada isolado fúngico foi padronizado para  $10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$ , com exceção do isolado RC82M, já que este isolado não produz esporos. Em seguida, as culturas de cada isolado foram centrifugadas (Marca: Fanem, Mod. 206 BL), a 3500 rpm por 10 minutos para coletar o sobrenadante. Parte do sobrenadante foi esterilizada em autoclave (Autoclave vertical Marca: Primatec) a  $121^\circ\text{C}$ ,  $1 \text{ kgf.cm}^{-2}$ , 20 minutos e parte somente filtrada (Membrane filters – MFS/ 02 $\mu\text{M}$ /25mm), não recebendo nenhum tratamento térmico (Figura 1).



**Figura 1** – Isolamento de fungos endofíticos e rizosféricos de guanandi e obtenção do sobrenadante (fermentado).

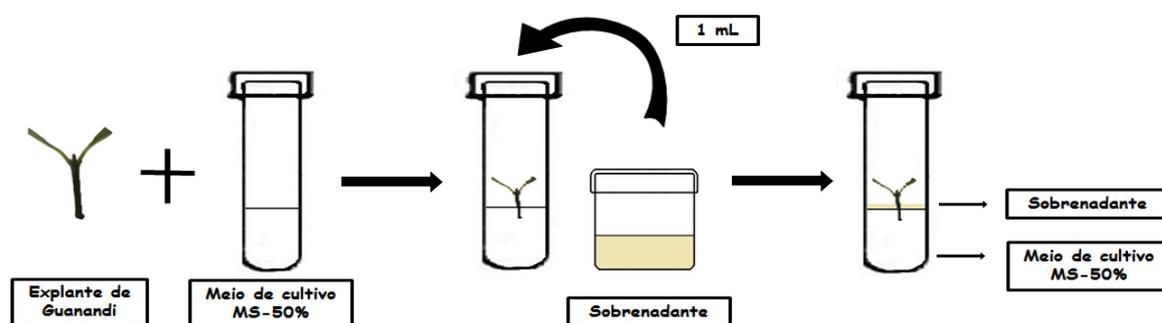
### 2.3 Estabelecimento *in vitro*

Retirou-se segmentos nodais de plantas-matrizes e estes foram submersos em recipientes com água corrente, contendo duas gotas de detergente (Tween 80), durante 20 minutos. Em seguida, os segmentos nodais foram imersos por 30 segundos em álcool 70% (v/v) e 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio (20 %) (2,5% de cloro ativo). A tríplice lavagem foi feita em câmara de fluxo laminar (Marca: Veco/ Mod. FUH 12), com água destilada esterilizada.

O meio utilizado no estabelecimento foi MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) com 50% dos sais, solidificado com  $3,5 \text{ g L}^{-1}$  de ágar (Marca: Dinâmica<sup>®</sup>), suplementado com 3% de sacarose. O pH foi ajustado para  $5,7 \pm 0,3$  antes da autoclavagem (Autoclave vertical Marca: Phoenix Mod. 415) .

Em câmara de fluxo laminar, os segmentos nodais foram padronizados com aproximadamente 2,5 cm e inoculados em tubos de ensaio (25 x 150 mm), contendo 20 mL de meio de cultivo MS. Em seguida, adicionou-se 1 mL de fermentado de quatro isolados fúngicos, autoclavados ou esterilizados em filtro (Membrane filters – MFS/02 $\mu$ M/25mm) (Figura 2).

Os tubos inoculados foram mantidos, em sala de crescimento, temperatura de  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16 horas, com radiação fotossintética ativa de  $45\text{-}55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , durante 30 dias. Após este período, os explantes foram transferidos para um novo meio de cultivo, idênticos aos que lhes deram origem e mantidos sob as mesmas condições de cultivo.



**Figura 2** – Inoculação dos explantes de guanandi em meio MS adicionado de fermentado obtido do cultivo de fungos selecionados.

#### 2.4 Análise estatística

Diariamente, foram feitas contagens para avaliar a porcentagem de contaminação fúngica e bacteriana. Após 30 e 60 dias de cultivo, avaliou-se o comprimento dos explantes, número de folhas e gemas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove tratamentos, contendo 25 repetições, cada uma constituída por um tubo de ensaio, totalizando 225 unidades experimentais.

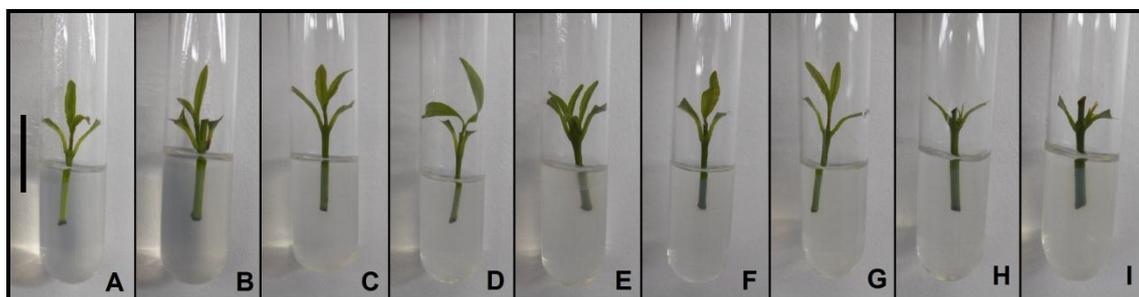
Os dados numéricos foram avaliados estatisticamente, mediante a análise de variância, testando as médias pelo teste de Scott-Knott (5%), utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2011).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A viabilidade de multiplicação *in vitro* de guanandi em associação com os fermentados fúngicos é aceitável, visto que em todos os tratamentos houve a regeneração de plântulas, inclusive, com a formação de raízes em alguns dos tratamentos testados.

Por meio de observações visuais, verificou-se que em todos os tratamentos houve regeneração dos segmentos nodais em plântulas, que eram bem formadas, sem oxidações ou com formações de calos. Quanto à coloração dos explantes, estes se mantiveram verdes. Observou-se também que a produção de folhas teve início após 15 dias de inoculação (Figura 3).

Quanto à emissão de raízes, isto foi observado nos tratamentos adicionados com os fermentados dos isolados RC28M (autoclavado), EC12M (filtrado) e no controle aos 30 dias (Figura 4). Da mesma forma aos 60 dias, obteve-se também a formação de raízes nos explantes tratados com fermentados de *T. asperellum* (filtrado e autoclavado), RC28M (filtrado) e RC82M (autoclavado) (Figura 5). As poucas raízes formadas eram únicas e finas com comprimento médio de 0,78 cm aos 30 dias e 0,87 cm aos 60 dias (Figuras 4 e 5).



**Figura 3** – Explantes de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) com 15 dias de incubação com os diferentes fermentados oriundos de isolados fúngicos. A) *T. asperellum* (autoclave); B) *T. asperellum* (filtro); C) RC28M (autoclave); D) RC28M (filtro). E) EC12M (autoclave); F) EC12M (filtro);

G) RC82M (autoclave); H) RC82M (filtro); I) Controle. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Máira Paixão Resende.



**Figura 4** – Explantes de guanandi com 30 dias de incubação com os diferentes fermentados oriundos de isolados fúngicos. A) *T. asperellum* (autoclave); B) *T. asperellum* (filtro); C) RC28M (autoclave); D) RC28M (filtro). E) EC12M (autoclave); F) EC12M (filtro); G) RC82M (autoclave); H) RC82M (filtro); I) Controle. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Máira Paixão Resende.



**Figura 5** – Explantes de guanandi com 60 dias de incubação com os diferentes fermentados oriundos de isolados fúngicos. A) *T. asperellum* (autoclave); B) *T. asperellum* (filtro); C) RC28M (autoclave); D) RC28M (filtro). E) EC12M (autoclave); F) EC12M (filtro); G) RC82M (autoclave); H) RC82M (filtro); I) Controle. Rio Verde-GO, 2012. Barra: 10 mm. Foto: Máira Paixão Resende.

Nas avaliações realizadas aos 30 dias, quanto à contaminação, os explantes incubados com fermentados de *T. asperellum* autoclavado e filtrado, RC28M autoclavado e filtrado, EC12M autoclavado e filtrado e RC82M autoclavado e filtrado, tiveram índice de contaminantes de 8 a 48%. Já aos 60 dias, essa taxa foi de 16 a 60%.

O índice de contaminação dos explantes incubados somente com meio BD esterilizado foi de 20% em 30 dias e 36% em 60 dias (Tabela 1).

**Tabela 1.** Percentual de contaminação dos explantes guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess), aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Rio Verde, GO, 2013.

ISOLADOS	CONTAMINAÇÃO	
	30 DIAS (%)	60 DIAS (%)
Controle*	20,0	36,0
<i>T. asperellum</i> – autoclave	8,0	16,0
<i>T. asperellum</i> – filtro	24,0	24,0
RC28M – autoclave	4,0	20,0
RC28M – filtro	8,0	16,0
EC12M – autoclave	8,0	16,0
EC12M – filtro	8,0	8,0
RC82M – autoclave	4,0	20,0
RC82M – filtro	48,0	60,0

\*RC: isolado rizosférico; EC: isolado endofítico.

Quanto ao número de gemas e de folhas, avaliadas aos 30 dias de cultivo, constatou-se que não houve diferença entre os tratamentos, no entanto, quanto ao comprimento médio, os explantes contendo fermentado dos isolados EC12M autoclavado, e RC82M autoclavado e filtrado cresceram menos que os demais tratamentos obtendo médias de 2,80; 3,00; 2,90, respectivamente (Tabela 2).

Nas avaliações ocorridas aos 60 dias, nota-se que também não houve diferenças para número de gemas e de folhas, sendo que as diferenças se mantiveram apenas no comprimento médio dos explantes em que os tratamentos controle, RC28M filtrado, EC12M autoclavado, RC82M autoclavado e filtrado obtiveram menores médias: 4,00; 3,60; 2,90; 3,00; 3,32, respectivamente (Tabela 2).

**Tabela 2.** Crescimento de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) com o uso de fermentados de fungos, aos 30 e 60 dias de cultivo *in vitro*. Rio Verde, GO, 2013.

METABÓLITOS	Nº GEMAS		Nº FOLHAS		COMPRIMENTO	
	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias	30 dias	60 dias
Controle	1,60 a*	1,80 a	2,20 a	2,60 a	4,00 a	4,00 b
<i>T. asperellum</i> – autoclave	2,20 a	2,20 a	3,40 a	3,60 a	4,30 a	4,70 a
<i>T. asperellum</i> – filtro	2,00 a	2,00 a	2,60 a	3,40 a	4,00 a	4,30 a
RC28M – autoclave	2,40 a	2,80 a	3,60 a	4,20 a	4,90 a	5,00 a
RC28M – filtro	1,80 a	1,80 a	4,00 a	3,80 a	3,70 a	3,60 b
EC12M – autoclave	1,80 a	2,00 a	2,00 a	1,80 a	2,80 b	2,90 b
EC12M – filtro	2,60 a	3,20 a	3,60 a	4,20 a	4,60 a	5,18 a
RC82M – autoclave	2,00 a	2,40 a	2,60 a	3,00 a	3,00 b	3,00 b
RC82M – filtro	1,80 a	2,00 a	2,80 a	2,80 a	2,90 b	3,32 b

\*Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott(5%). \*RC: isolado rizosférico; EC: isolado endofítico.

É crescente o número de pesquisas que abrangem as técnicas de cultura de tecidos vegetais, é uma ferramenta biotecnológica que promove a produção de mudas em escala comercial. Além disso, é notório o benefício da inoculação de algumas espécies microbianas para aumentar o crescimento e desenvolvimento vegetal (Pinhal et al., 2011; Montañez et al., 2012).

A associação benéfica entre fungos, bactérias e plantas micropropagadas, é avaliada por alguns pesquisadores que garantem o sucesso dessa junção, como no trabalho feito por Sofo et al. (2012) que estudaram o efeito de *Trichoderma harzianum* linhagem T-22 em brotos micropropagados de GiSeLa6<sup>®</sup> (*Prunus cerasus*×*Prunus canescens*).

Percebe-se que o uso de inoculantes microbianos em plantas micropropagadas é mais estudado na fase de aclimatização em que há relatos de sua importância no bom desenvolvimento das plântulas (Yadav et al., 2013).

Sabe-se também que a inoculação de fungos do gênero *Trichoderma* em plantas favorece o crescimento e inibe o estabelecimento de patógenos, aumentando as chances de obter maior número de indivíduos saudáveis, sendo que o sucesso depende, em parte, da concentração de conídios viáveis (Medina et al., 2011; Wijesinghe et al., 2011; Sandoval et al., 2012).

A promoção do crescimento de plantas por microrganismos é tida em função de diversos fatores, incluindo a síntese de compostos estimulantes, como os fitormônios (Badawiet al., 2011; Oliveira et al., 2012). Diante disso, justificam-se trabalhos com o uso de metabólitos oriundos de espécies microbianas para aumentar o crescimento vegetal *in vitro*.

#### 4. CONCLUSÃO

Fermentados de *Trichoderma* spp., com ou sem tratamento térmico, podem ser usados para aumentar o crescimento dos explantes nas etapas iniciais do cultivo *in vitro* de guanandi.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERNAZ, L. C.; PAULA, J. E.; ROMERO, G. A. S.; SILVA, M. R. R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L. S. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p.116-121, 2010.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2926-2933, 1999.

ALVARADO, J. C. C.; ARIAS, D.; RICHTER, D. D. Early growth performance of native and introduced fast growing tree species in wet to sub humid climates of the

Southern region of Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, v. 242, p. 227-235, 2007.

ANDREJOW, G. M. P.; HIGA, A. R. Potencial de enraizamento de miniestacas de *Pinus taeda* L. provenientes de brotação apical de mudas jovens. **Floresta**, v. 39, p. 897-903, 2009.

ARTUR, A. G.; CRUZ, M. C. P.; FERREIRA, M. E.; BARRETTO, V. C. M.; YAGI, R. Esterco bovino e calagem para formação de mudas de guanandi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 843-850, 2007.

BADAWI, F. S. F.; BIOMY, A. M. M.; DESOKY, A. H. Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, p. 17-25, 2011.

BORGES, S. R.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; MELO, L. A.; ROSADO, A. M. Enraizamento de miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v. 35, p. 425-434, 2011.

BRONDANI, G. E.; WENDLING, I.; GROSSI, F.; DUTRA, L. F.; ARAUJO, M. A. Miniestaquia de *Eucalyptusbenthamii* x *Eucalyptusdunnii*: (I) sobrevivência de minicepas e produção de miniestacas em função das coletas e estações do ano. **Ciência Florestal**, v. 22, p.11-21, 2012.

CARVALHO, R. I. N.; SILVA, I. D.; FAQUIM, R. Enraizamento de miniestacas herbáceas de maracujazeiro amarelo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, p. 387-392, 2007.

COELHO, M. F. B.; MAIA, S. S. S.; OLIVEIRA, A. K.; DIÓGENES, F. E. P.; SOARES, S. R. F. Propagação vegetativa de liamba, planta medicinal. **Horticultura Brasileira**, v. 29, p. 418-420, 2011.

DIEZ, E. M.; RUBIO, B.; DOMÍNGUEZ, S.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; NICOLÁS, C. Transcriptomic response of *Arabidopsis thaliana* after 24h incubation with the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 614-620, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p.1039-1042, 2011.

GAREN, E. J.; SALTONSTALL, K.; ASHTON, M. S.; SLUSSER, J. L.; MATHIAS, S.; HALL, J. S. The tree planting and protecting culture of cattle ranchers and small scale agriculturalists in rural Panama: Opportunities for reforestation and land restoration. **Forest Ecology and Management**, v. 261, p.1684-1695, 2011.

GOLUBEV, S. N.; MURATOVA, A. Y.; WITTENMAYER, L.; BONDARENKOVA, A. D.; HIRCHE, F.; MATORA, L. Y.; MERBACH, W.; TURKOVSKAYA, O. V. Rhizosphere indole-3-acetic acid as a mediator in the *Sorghum bicolor* – phenanthrene – *Sinorhizobiummeliloti* interactions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.49, p.600-608, 2011

HERNANDEZ, W.; XAVIER, A.; PAIVA, H. N.; WENDLING, I. Propagação vegetativa do pau-jacaré (*Piptadeniagonoacantha* (MART.) MACBR.) por estaquia. **Revista Árvore**, v. 36, p. 813-824, 2012.

HOHMANN, P.; JONES, E. E.; HILL, R. A.; STEWART, A. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonization and growth promotion for commercially grown seedlings. **Fungal Biology**, v.115, p.759-767, 2011.

LEMONS, L. M. S.; MARTINS, T. B.; TANAJURA, G. H.; GAZONI, V. F.; BONALDO, J.; STRADA, C. L.; SILVA, M. G.; DALL'OGGIO, E. L.; JÚNIOR, P. T. S.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p. 432-439, 2012.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum. 1992. 382 p.

MARINHO, C. S.; MILHEM, L. M. A.; ALTOÉ, J. A.; BARROSO, D. G.; POMMER, C. V. Propagação de goiabeira por miniestaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, p. 607-611, 2009.

MATA, D. I.; CASASOLA, P. M.; VEGA, C. M.; CAMPOS, G. C.; WARNER, B. G. Floristic composition and soil characteristics of tropical freshwater forested wetlands of Veracruz on the coastal plain of the Gulf of Mexico. **Forest Ecology and Management**, v. 262, p.1514-1531, 2011.

MEDINA, A. M.; ROLDÁN, A.; PASCUAL, J. A. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in menol crops: Growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. **Applied Soil Ecology**, v. 47, p. 98-105, 2011.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21-28, 2012.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F. Efeito da temperatura e do tegumento na germinação de sementes de *Calophyllum brasiliense*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p.1872-1877, 2007.

OLIVEIRA, A. G.; JUNIOR, A. F. C.; SANTOS, G. R.; MILLER, L. O.; CHAGA, S. L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, v. 7, p. 149-155, 2012.

PEDRO, E. A. S.; HAKAKAVA, R.; LUCON, C. M. M.; GUZZO, S. D. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1589-1592, 2012.

PINHAL, H. F.; ANASTÁCIO, M. R.; CARNEIRO, P. A. P.; SILVA, V. J.; MORAIS, T. P.; LUZ, J. M. Q. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do Cerrado. **Ciência Rural**, v. 41, p.1136-1142, 2011.

SOSA-RODRIGUEZ, T.; BOULOIS, H. D.; GRANET, F.; GAUREL, S.; MELGAREJO, L. M.; CARRON, M. P.; DECLERECK, S. *In vitro* mycorrhization of the rubber tree *Hevea brasiliensis* Mull Arg. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 49, p. 207-215, 2013.

SANDOVAL, M. T. F.; GARCÍA, M. O.; GALINDO, E.; CARREÓN, L. S. Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. **Process Biochemistry**, v. 47, p.186-194, 2012.

SANTOS, E. R.; ALMEIDA, E. G.; MORANDI, M. A. B.; BETTIOL, W.; PINTO, Z. V. **Sistema para Contagem de Esporos Microbianos e Calibração de Suspensão (CALIBRA)**. Embrapa Meio Ambiente. 2011

SILVA, R. L.; OLIVEIRA, M. L.; MONTE, M. A.; XAVIER, A. Propagação clonal de guanandi (*Calophyllum brasiliense*) por miniestaquia. **Agronomia Costarricense**, v. 34, p. 99-104, 2010.

SOFO, A.; TATARANNI, G.; XILOYANNIS, C.; DICHIO, B.; SCOPA, A. Direct effects of *Trichoderma harzianum* strain T-22 on micropropagated shoots of GiSeLa6® (*Prunus cerasus* x *Prunus canescens*) rootstock. **Environmental and Experimental Botany**, v. 76, p.33-38, 2012.

SOUZA, M. C.; BESERRA, A. M. S.; MARTINS, D. C.; REAL, V. V.; SANTOS, R. A. N.; RAO, V. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 452-458, 2009.

TACHAMENI, S. N.; NGONKEU, M. E. L.; BEGOUDE, B. A. D.; NANA, L. W.; FOKOM, R.; OWONA, A. D.; MBARGA, J. B.; TCHANA, T.; TONDJE, P. R.; ETOA, F. X.; KUATÉ, J. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal

fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. **Crop Protection**, v. 30, p. 1321-1327, 2011.

TEIXEIRA. A. P.; ASSIS. M. A.; LUIZE. B. G. Vegetation and environmental heterogeneity relationships in a Neotropical swamp forest in southeastern Brazil (Itirapina.SP). **Aquatic Botany**, v. 94, p.17-23, 2011.

YADAV, K.; AGGARWAL, A.; SINGH, N. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) induced acclimatization growth enhancement and colchicine content of micropropagated *Gloriosa superba* L. plantlets. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 88-93, 2013.

WIJESINGHE, C. J.; WIJERATNAM, R. S. W.; SAMARASEKARA, J. K. R. R.; WIJESUNDERA.R.L. C. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). **Crop Protection**, v. 30, p. 300-306, 2011.