UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS DE SOLO DE INTERESSE NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Noemi Carla Baron Cozentino

Bióloga

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS DE SOLO DE INTERESSE NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Noemi Carla Baron Cozentino

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária

2019

C882i

Cozentino, Noemi Carla Baron
Isolamento e caracterização de fungos de solo de interesse na promoção do crescimento de plantas / Noemi Carla Baron Cozentino. -- Jaboticabal, 2019
119 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Everlon Cid Rigobelo

1. Microbiologia agrícola. 2. Crescimento (Plantas). 3. Fungos. 4. Agricultura sustentável. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS DE SOLO DE INTERESSE NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTOS DE PLANTAS

AUTORA: NOEMI CARLA BARON COZENTINO
ORIENTADOR: EVERLON CID RIGOBELO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELO
Departamento de Produção Vegetal (Fitotecnia) / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. DIEGO CUNHA ZIED
FCAT-UNESP / Dracena/SP

Davi Rodrigo Rossatto

Prof. Dr. DAVI RODRIGO ROSSATTO
Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária / UNESP - FCAV - Jaboticabal / SP

Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO MARCONDES DE ALMEIDA
Instituto Biológico / Campinas/SP

Prof. Dr. FELIPE BATISTELLA FILHO
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo / Campus Matão/SP

Jaboticabal, 03 de maio de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NOEMI CARLA BARON COZENTINO – Nascida no dia 27 de dezembro de 1989 em Monte Alto – SP. Em março de 2008, ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia na Universidade Estadual Paulista – UNESP, câmpus Rio Claro, concluído em dezembro de 2011. Durante a graduação realizou diversos cursos, estágios e participou de projetos de extensão. Seu trabalho de conclusão de curso intitulado “Micro-fungos de interesse para o setor de petróleo, gás e biocombustíveis” foi executado sob orientação da Dra. Derlene Attili de Angelis e co-orientação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca e financiado pelo Programa de Formação de Recusos Humanos PRH-05 da Petrobrás. Em março de 2012 ingressou na pós-graduação, iniciando o mestrado pelo programa de Microbiologia Aplicada na Universidade Estadual Paulista – UNESP, câmpus Rio Claro, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e posteriormente como bolsista MS-II da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). A defesa da dissertação “Identificação e caracterização de fungos melanizados com potencial de degradação de tolueno”, orientada pela Dra. Derlene Attili de Angelis e com co-orientação do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca foi realizada em maio de 2014. Durante o mestrado teve a oportunidade de colaborar em outros projetos do grupo de pesquisa, incluindo parceiros externos à UNESP, que resultaram em publicações em periódicos científicos de referência. Além disso, teve a oportunidade de participar de eventos científicos nacionais e internacionais. Em agosto de 2015 iniciou o doutorado sob orientação do Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo pelo programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, financiada pela CAPES e tornou-se bolsista FAPESP a partir de janeiro de 2016. Durante o doutorado teve a oportunidade de co-orientar três alunos de iniciação científica, de participar de eventos nacionais e internacionais e de participar da organizção do I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambienta (CBMAAA) sediado em Jaboticabal – SP. Além disso, publicou dois artigos científicos, sendo um deles uma revisão.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

A Deus, o único conhecedor de todo o esforço, dedicação, das frustrações e alegrias envolvidas na execução de mais essa etapa

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por comandar a minha vida, por me ajudar a superar os desafios, me ensinar a perseverar e me fazer vitoriosa em tantas batalhas.

Ao Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo, que tão gentilmente abriu suas portas e depositou em mim tanta confiança. Sua orientação me permitiu uma grande evolução como aluna, pesquisadora e também como pessoa. Você foi e sempre será um grande referencial em minha vida.

À equipe LSM (Laboratory of Soil Microbiology) pela convivência, pela ajuda nos momentos em que precisei e pela amizade. Com o passar dos anos alguns se foram, outros chegaram, mas sempre foi nítido que somos uma família, e todos ficarão gravados na memória e no coração.

À Dra. Andressa de Souza Pollo, que tanto me auxiliou com as análises moleculares. Sua experiência e dedicação foram essenciais para essa etapa do trabalho. Sou muito grata por todo o suporte e pela amizade conquistada.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2015/17505-3.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo e atenção dedicados.

Ao meu marido Gustavo, que tanto me apoiou quando decidi iniciar o doutorado e que esteve comigo durante esses anos me dando suporte em todos os momentos, com todo amor e carinho.

Aos meus pais, Antonio e Benedita, e ao meu irmão Bruno, sempre presentes em minha vida, compartilhando as alegrias e me dando todo o conforto nos momentos difíceis.

A todos que de alguma forma fizeram parte dessa história, fica registrado o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....iii

ABSTRACT.....v

1. INTRODUÇÃO.....7

2. REVISÃO DE LITERATURA.....9

2.1 Panorama geral do uso de defensivos agrícolas e fertilizantes no Brasil.....9

2.2 As culturas de soja, milho e feijão e sua posição no contexto do uso de insumos agrícolas.....11

2.3 Alternativas à aplicação de insumos agrícolas e a utilização de fungos no estímulo à produção vegetal.....13

2.4 Características microbiológicas de interesse na avaliação da promoção do crescimento de plantas.....17

2.5 O gênero *Purpureocillium* e sua importância no processo agrícola.....20

3. MATERIAL E MÉTODOS.....23

3.1 Material fúngico: isolamento e preservação.....23

3.2 Análises morfológica e molecular.....26

3.2.1 Avaliação Morfológica.....26

3.2.3 Análise filogenética.....29

3.3 Caracterização *in vitro* do potencial de promoção de crescimento de plantas.....30

3.3.1 Teste para a solubilização de fósforo.....30

3.3.2 Produção de ácido indolacético (AIA).....31

3.3.3 Produção de quitinases.....33

3.4 Critérios de seleção para realização dos testes em casa de vegetação.....34

3.5 Teste de produção dos isolados selecionados em arroz parboilizado.....35

3.6 Avaliação da promoção de crescimento de plantas pelos isolados selecionados em casa de vegetação.....36

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
4.1 Isolamento e preservação dos fungos 40
4.2 Análise molecular e filogenética 49
4.3 Triagem *in vitro* do potencial de promoção do crescimento de plantas 54
4.3.1 Solubilização de fósforo 54
4.3.2 Produção de AIA 56
4.3.3 Produção de quitinases 58
4.4 Seleção dos fungos para o teste em casa de vegetação 59
4.5 Teste de produção dos isolados em arroz parboilizado 60
4.6 Teste em casa de vegetação com os isolados selecionados nas culturas de soja, milho e feijão 62
5. CONCLUSÕES 75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76
APÊNDICE 89
Análise Molecular 90
Extração do DNA genômico e amplificação dos fragmentos de ITS e β-tubulina 90
Caracterização *in vitro* do potencial de promoção de crescimento de plantas 94
Solubilização de Fósforo 94
Produção de ácido indolacético (AIA) 100
Produção de quitinases 103

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS DE SOLO DE INTERESSE NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

RESUMO - A representatividade da agricultura brasileira é reconhecida mundialmente, especialmente na produção de grãos como a soja, o milho e o feijão. A produtividade nas lavouras, especialmente na última década, tem apresentado crescimento expressivo, entretanto, um dos aspectos negativos associados a esse processo é o aumento concomitante no uso de defensivos e fertilizantes. Atualmente, o tema se tornou uma preocupação de saúde pública e ambiental dada a toxicidade e recalcitrância desses compostos. Dentre formas alternativas ao uso desses insumos o estudo de micro-organismos é promissor, pois eles constituem um grande patrimônio genético que alberga vias metabólicas de grande interesse para diversas atividades humanas, incluindo a agricultura. Os micro-organismos interagem de diversas maneiras com as plantas beneficiando-as e garantindo recursos para si em troca. Eles podem atuar melhorando o aporte de nutrientes, os mecanismos de defesa e de promoção de crescimento em condições de estresse biótico e abiótico. Assim, o presente estudo teve como objetivos o isolamento de fungos a partir de amostras de solo, com enfoque para fungos do gênero *Purpureocillium*; sua caracterização molecular e de seu potencial de promoção de crescimento de plantas *in vitro*; e a seleção de linhagens para serem testadas *in planta* em soja, milho e feijão. O isolamento foi realizado utilizando meios convencionais e seletivos para a obtenção dos fungos. Os isolados tiveram seu DNA extraído e as regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal e parte da região codificante da proteína β-tubulina foram sequenciadas. O potencial de promoção de crescimento *in vitro* foi avaliado mensurando-se a capacidade de solubilização de fósforo e de produção de AIA (ácido indolacético) e de quitinases pelos isolados. Os testes em casa de vegetação foram realizados com isolados selecionados a partir da triagem *in vitro,* avaliando-se o efeito da inoculação em parâmetros como altura das plantas, massa seca, e teores de fósforo e nitrogênio nas plantas e no solo. De 211 isolados obtidos, 30 foram morfologicamente reconhecidos como *Purpureocillium.* A análise molecular permitiu a identificação precisa dos isolados como pertencentes às espécies *Purpureocillium lilacinum* (25 isolados), *Purpureocillium lavendulum* (4 isolados) e *Metarhizium marquandii* (1 isolado). A partir dos resultados obtidos para a capacidade de solubilização de fósforo e a produção de AIA e quitinases desses 30 isolados, sete foram selecionados e testados com as três culturas em casa de vegetação. As linhagens foram capazes de alterar positivamente os parâmetros avaliados, incluindo altura das plantas, massa seca e os teores de fósforo e nitrogênio. Pouquíssimos estudos avaliam o efeito da inoculação dessas linhagens em plantas e seu efeito direto na promoção de crescimento, especialmente em aspectos como o aumento dos teores de nitrogênio. Além disso, notou-se que diferentes linhagens se destacaram para cada cultura alterando parâmetros distintos, indicando a existência de especificidade na relação fungo-planta. Estudos aprofundados são necessários, incluindo uma avaliação em campo de sua performance bem como dos aspectos que envolvem sua interação com cada uma das culturas. Entretanto, esse estudo apresenta um caráter inovador frente à possibilidade de aliar o combate a patógenos, comumente descrito para *P. lilacinum* contra nematoides, à

ação de promoção de crescimento. Além disso, *P. lavendulum* não possui quaisquer relatos associados ao tema em literatura, assim como *M. marquandii*.
Palavras-chave: *Purpureocillium*, *Metarhizium*, seleção *in vitro*, casa de vegetação, promoção de crescimento de plantas

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FUNGI FROM SOIL OF INTEREST IN PLANT GROWTH PROMOTION

ABSTRACT - The representativeness of Brazilian agriculture is worldwide recognized, especially in the grains production such as soybean, maize and beans. Crops' yield, especially in the last decade, has presented significant growth, however, one of the negative aspects associated with this process is the concomitant increase in the use of pesticides and fertilizers. Currently, this issue has become a public health and environmental concern because of the toxicity and recalcitrance of these compounds. Among alternatives to the use of these inputs the study of microorganisms is promising because they constitute a great genetic patrimony, which houses metabolic pathways of great interest for several human activities, including agriculture. Microorganisms are able to interact in different ways with plants benefiting them and ensuring resources for themselves in return. They can act by improving nutrient supply, defense mechanisms and promoting growth under conditions of biotic and abiotic stress. Thus, the present study aimed the isolation of fungi from soil samples, focusing on the search for fungi of the genus *Purpureocillium*; their molecular characterization and the assessment of their *in vitro* plant growth promotion potential; and the selection of strains to be tested *in planta* in soybean, maize and bean. Fungal isolation was performed using conventional and selective media. The isolates had their DNA extracted and the ITS (Internal Transcribed Spacer) region of the ribosomal DNA and part of the coding region of the β-tubulin protein were sequenced. The plant growth promotion potential was assayed *in vitro* by measuring the phosphorus solubilization ability and the production of IAA (indoleacetic acid) and chitinases by the isolates. Greenhouse tests were performed with strains selected from *in vitro* screening, evaluating the effect of fungal inoculation on parameters such as plant height, dry mass, and phosphorus and nitrogen content in plants and soil. Among 211 isolates obtained, 30 were morphologically recognized as *Purpureocillium*. The molecular analysis allowed to identify them as representatives of the species *Purpureocillium lilacinum* (25 isolates), *Purpureocillium lavendulum* (4 isolates) and *Metarhizium marquandii* (1 isolate). From the results obtained for the phosphorus solubilization and the IAA and chitinases production by these 30 strains, seven were selected and tested with the three crops under greenhouse conditions. The strains were able to positively modify the evaluated parameters, including plant height, dry mass and phosphorus and nitrogen contents. Only a few studies evaluate the effect of the inoculation of these strains on plants and their direct effect on growth promotion, especially in aspects such as the increase of nitrogen levels. In addition, different strains stood out with each crop by changing different parameters, indicating the existence of specificity in the fungus-plant relationship. In-depth studies are needed, including a field assessment of their performance as well as aspects involving their interaction with each one of the crops. However, this study presents an innovative character which is the possibility of combining the pathogen control, commonly described for *P. lilacinum* against nematodes, to the action of growth promotion. In addition, *P. lavendulum* does not have any reports related to the subject in literature, as well as *M. marquandii*.

Key words: *Purpureocillium*, *Metarhizium*, *in vitro* screening, greenhouse, plant growth promotion

1. INTRODUÇÃO

O método de cultivo em grande escala de monoculturas utilizado para suprir as necessidades de consumo e exportação de alimentos pelo Brasil exige em proporções cada vez maiores o uso de defensivos e fertilizantes. Apesar de aumentar a produtividade e permitir que os níveis de produção que atendem às demandas do mercado sejam atingidos, o processo agrícola atual tem gerado impactos ambientais comprometedores da sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas a médio e longo prazo.

Em detrimento à busca de alternativas da redução, ou mesmo nulidade de sua utilização, atualmente o uso crescente dessas substâncias se enquadra dentro de uma narrativa justificadora de um “mal necessário”, gerando um quadro global de passividade em relação aos abusos na utilização de insumos agrícolas.

Lidar de maneira mais natural possível com um cultivo certamente é uma alternativa promissora. Para tanto é essencial o conhecimento sobre a anatomia e fisiologia dos organismos vivos envolvidos em um cultivo agrícola. Uma plantação não é constituída apenas por uma população de plantas, mas, associadas a elas existem outros seres vivos desempenhando processos pró e contra o seu desenvolvimento, especialmente micro-organismos.

Existe uma vasta gama de micro-organismos que habita o solo ou tecidos vegetais e que interage com todos os tipos de plantas, incluindo aquelas que são cultivadas pelo homem no processo agrícola. Dentre eles podem ser destacadas variadas espécies de bactérias e fungos, como as conhecidas bactérias fixadoras de nitrogênio e as micorrizas, por exemplo.

O grande desafio a ser superado é manter e fazer crescer a produtividade abrindo mão do excesso na aplicação produtos químicos, utilizando processos naturais e organismos vivos que estimulem a produção vegetal.

A associação com micro-organismos favorece a manutenção das plantas no ambiente em diversos aspectos. Fungos mutualistas de plantas são atualmente reconhecidos como uma nova e importante fonte de compostos bioativos. Eles produzem

um número significativo de metabólitos secundários, incluindo fitormônios (auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico), compostos antifúngicos, antibacterianos, entre outros (Rai et al., 2014).

Estudos em ambientes controlados comprovam que quando tratadas com diversas espécies de fungos simbiontes, endofíticos ou micorrízicos, as plantas são frequentemente mais saudáveis do que as não tratadas (Khan et al. 2008; Hyde e Soytong, 2008; Strobel, 2003).

Tendo em vista informações como estas, fica claro o quão atrativo é o estudo do potencial desses fungos no âmbito da melhoria dos processos de produção vegetal. O cenário atual do uso crescente de insumos agrícolas é preocupante, e há anos passou a ser alvo de discussão devido aos riscos ao ser humano e ao ambiente decorrentes de sua manipulação e aplicação. Somado a isso, os fertilizantes minerais são produzidos a partir de fontes não renováveis.

Assim, os micro-organismos no papel de portadores de um grande patrimônio genético, com vias metabólicas de interesse que podem auxiliar de diversas formas na promoção de crescimento de plantas, podem ser utilizados como produtos que auxiliarão no desenvolvimento vegetal contribuindo tanto para uma redução no uso de insumos, tornando o processo agrícola mais sustentável, e, simultaneamente reduzindo o custo de produção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama geral do uso de defensivos agrícolas e fertilizantes no Brasil

Desde sua colonização a agricultura no Brasil se fez um dos pilares de sua economia. Os números de produtividade agrícola são crescentes nas últimas décadas e com isso o país se tornou um dos maiores produtores agrícolas do mundo. Estudos internacionais indicam que o Brasil é um dos países que obteve maior incremento de sua produtividade. Em uma comparação realizada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Estados Unidos, 2015) para o período de 2006 a 2010, a produtividade cresceu 4,28% ao ano no Brasil, seguido por um aumento de 3,25% na China, 3,08% no Chile, 2,86% no Japão, 2,7% na Argentina, 2,62% na Indonésia, 1,93% nos Estados Unidos e 1,46% no México.

Os fatores indicados como supostos norteadores do crescimento agrícola no Brasil incluem os investimentos em pesquisa, a melhoria da qualidade dos insumos em geral (maquinário agrícola, defensivos, fertilizantes, entre outros), a ocupação de áreas no Cerrado, o perfil das pessoas que trabalham no campo e, adicionalmente, o aumento dos recursos financeiros mobilizados representou outra alavanca à agricultura nacional. Após um longo período de redução do volume de crédito rural, o ano de 2000 marcou forte retomada dos créditos concedidos a produtores e cooperativas, e também à agricultura familiar. Em cifras, os financiamentos agrícolas totalizaram R$ 131bilhões em 2012 contra um total de apenas R$ 36,8 bilhões em 2000 (Gasques et al., 2013; Gasques et al., 2014).

Os defensivos agrícolas, ou agrotóxicos, são definidos pela lei 7.802/89 como produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, bem como de ambientes urbanos, hídricos e industriais (Brasil, 1989). Já os fertilizantes, ou adubos, são definidos segundo a lei 6.894/80 (Brasil, 1980), como qualquer substância

mineral ou orgânica, natural ou sintética, que seja fornecedora de um ou mais nutrientes vegetais.

Em relação ao uso de defensivos agrícolas no Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2015) entre 2001 e 2008 a venda desses produtos no país saltou de pouco mais de US$ 2 bilhões para mais de US$ 7 bilhões. Nesse período, 986,5 mil toneladas de defensivos foram aplicadas em território nacional. Em 2009 o consumo ultrapassou a marca de 1 milhão de toneladas, o que teoricamente representa o consumo de 5,2 kg de defensivo por habitante. Atualmente o mercado de defensivos no país encontra-se na casa dos US$ 10 bilhões, o que corresponde a 20% do mercado global, estimado em US$ 50 bilhões (Vasconcelos, 2018).

O cenário para os fertilizantes aponta, segundo o Relatório de Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IBGE, 2013), que a quantidade de fertilizantes comercializada por área plantada (quilograma/ hectare – kg/ ha) praticamente dobrou entre 1992, 70 kg/ ha, e 2004,150 kg/ ha, alcançando a marca de 180 kg/ ha em 2014 (IBGE, 2015). Em outras unidades, o consumo nacional que foi de aproximadamente 10 milhões de toneladas em 1992 ultrapassou a marca de 35 milhões de toneladas em 2018 (ANDA, 2019).

A aplicação sem controle e em doses inadequadas de defensivos e fertilizantes leva a impactos negativos para o ambiente e para a saúde humana. Os resíduos oriundos desse processo podem ser encontrados nos alimentos, como vegetais, frutas, cereais, grãos, e até mesmo em produtos feitos a partir deles, como sucos, vinhos, dependendo das práticas adotadas para sua produção (Zikankuba et al., 2019). Além disso, organismos que não são alvos são constantemente afetados, seja no ambiente aquático, desde o zooplâncton até crustáceos e peixes, ou terrestre, incluindo polinizadores naturais, gado, pássaros e micro-organismos benéficos presentes no solo (Van Lexmond et al., 2015).

Além do fato de muitos defensivos serem altamente recalcitrantes, ou seja, suas moléculas são capazes de permanecerem inalteradas por anos no ambiente, a maioria deles é lipossolúvel, e pode ser encontrada no leite, no sangue e se acumular no tecido adiposo dos animais ao longo das cadeias alimentares (Zikankuba et al., 2019). Em sua

revisão, Sarbawal et al. (2018) descrevem diversos estudos relacionando diretamente a ocorrência de várias desordens de saúde humana, em crianças, adultos e idosos, à exposição a defensivos agrícolas, incluindo males como doença de Hodgkin, linfoma, mal de Parkinson, disfunções endócrinas, problemas respiratórios e reprodutivos além de câncer.

Para os fertilizantes, seu uso excessivo gera problemas como o acúmulo de metais pesados, a eutrofização de rios e lagos, a acidificação dos solos, a contaminação de aquíferos e reservatórios de água, e a geração de gases associados ao efeito estufa (Kulkarni e Goswami, 2019; Savci, 2012).

2.2 As culturas de soja, milho e feijão e sua posição no contexto do uso de insumos agrícolas

A soja (*Glycine max*) é uma das principais culturas do agronegócio brasileiro, sendo o Brasil o maior produtor mundial da atualidade. Responsável por aproximadamente 33% da produção global, a produção desse grão para a safra 2018/2019 está estimada em 114,3 milhões de toneladas a serem produzidas em uma área de aproximadamente 36 milhões de hectares (CONAB, 2019).

Desde a década de 1960 a cultura da soja apresentou importância crescente no país, até alcançar o posto atual de maior produtor mundial do grão. Devido a essa grande importância, diversos programas de pesquisa relacionados ao melhoramento genético da soja levaram ao desenvolvimento de cultivares de alto rendimento e adaptadas às diferentes condições das diferentes regiões do Brasil (Priolli et al., 2004; Waquil, 2014).

Uma das maiores revoluções no plantio da soja veio em decorrência da introdução da soja RR (Roundup Ready) resistente ao herbicida glifosato. Introduzida clandestinamente no Brasil em 1998, a situação desse transgênico passou por várias polêmicas legislativas até que sua produção e comercialização no país fossem autorizadas (Scalzilli et al., 2005). O uso desse e outros tipos de tecnologia no cultivo da soja foram essenciais para os ganhos de produtividade observados, sendo que segundo

dados da CONAB (2019) a produtividade desse grão passou de 2,823 kg/ ha na safra 2006/2007 para 3,193 kg/ ha na safra 2018/2019, um aumento de 13,1%.

O milho também é um dos principais grãos cultivados mundialmente e, no Brasil sua produção é ultrapassada apenas pela produção de soja (CONAB, 2019). É utilizado como fonte de alimento para seres humanos e outros animais, atuando como componente básico na dieta de famílias de baixa renda, em rações animais e também sendo utilizado como matéria-prima em processos industriais como a produção de etanol (Ranum et al., 2014). A estimativa da área plantada no país para a safra 2018/2019 é de pouco mais de 17 milhões de hectares, e a produção deverá ultrapassar 95 milhões de toneladas, um aumento de 18% em relação à safra anterior (CONAB, 2019).

Segundo o relatório da situação global dos cultivos transgênicos (ISAAA, 2018), assim como para a soja, atualmente grande parte da produção de milho no Brasil e no mundo é realizada a partir de sementes transgênicas, sendo que uma vasta gama de sementes com variadas modificações genéticas, como a tecnologia RR e também a Bt (genes para a produção de cristais Bt de *Bacillus thuringiensis*), estão disponíveis no mercado.

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) tem sua produção focada essencialmente no consumo interno como fonte de alimento. Não é uma *commodity* como a soja e o milho, e consitui a principal fonte de proteína vegetal da dieta dos brasileiros. É considerada uma cultura atípica por ser possível o cultivo de três safras anuais (Silva e Wander, 2013). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de feijão, e mantém uma média de produção anual de 3,15 milhões de toneladas nos últimos 20 anos, basicamente equivalente ao consumo interno (CONAB, 2019).

Principalmente para as culturas de soja e milho, que além de fontes de alimento tratam-se de *commodities*, quando observados os dados do uso de defensivos para sua produção é inevitável a preocupação com o ambiente e a saúde pública. Apenas para o uso de glifosato, segundo dados de Bombardi (2017), o consumo desse ingrediente ativo aumentou 64% de 2009 a 2014, e mais de 50% de todo glifosato comercializado é direcionado ao cultivo de soja e cerca de 10% ao cultivo de milho. Em outros números, significa a aplicação de mais de 100 mil toneladas nas lavouras de soja e cerca de 20 mil

toneladas nas lavouras de milho, apenas para o glifosato. Mesmo relacionando o volume de ingrediente ativo com a área cultivada (para soja cerca de 30 milhões de hectares e para o milho aproximadamente 6,5 milhões de hectares no ano de 2014 (CONAB, 2014)), o resultado é a aplicação de mais de 3 kg/ ha do ingrediente ativo em ambas as culturas.

Pignati et al. (2017) relacionam a média de uso de defensivos por hectare e total para diversas culturas brasileiras. Segundo dados apresentados pelos autores, o cultivo da soja utiliza em média 17,7 L/ ha de defensivos enquanto o milho 7,4 L/ ha e o feijão 5 L/ ha. Essas três culturas ocupam respectivamente a primeira, segunda e décima colocações para o uso de defensivos no Brasil, sendo responsáveis pelo consumo de cerca de 60%, 13% e 2%, respectivamente, de toda a quantidade de defensivos comercializada no país.

No cenário dos fertilizantes, o Brasil atualmente é responsável pelo consumo de cerca de 7% da quantidade global comercializada, ultrapassado apenas pela China, Índia e Estados Unidos. Em relação ao tipo de demanda, diferentemente dos maiores mercados, o principal nutriente aplicado no Brasil é o potássio, com 38%, seguido por cálcio, com 33%, e nitrogênio, com 29%. As culturas que consomem a maior parte dos fertilizantes produzidos e importados pelo Brasil são a soja e o milho, utilizando para sua produção cerca de 40% e 15%, respectivamente, do volume comercializado no país. Já a cultura do feijão, é responsável pelo consumo de aproximadamente 2% desse volume (ANDA, 2017).

2.3 Alternativas à aplicação de insumos agrícolas e a utilização de fungos no estímulo à produção vegetal

Segundo dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2019), o consumo de defensivos continua a crescer significativamente passando de aproximadamente 300 mil toneladas de ingrediente ativo em 2009, para aproximadamente 540 mil toneladas em 2017. Para os fertilizantes, como mencionado no item anterior, os números são de dimensões ainda maiores.

Dada a nocividade, para o ambiente e para a saúde humana, do uso excessivo de insumos agrícolas, diversas organizações iniciaram uma jornada de debates e conscientização da necessidade da redução do consumo de defensivos, fertilizantes, entre outros, bem como da proibição do uso de produtos que comprovadamente ameaçam a segurança alimentar e ocupacional. Além disso, há diversas propostas do chamado cultivo saudável ou sustentável. Tal perspectiva sustenta a hipótese de que a demanda alimentícia pode ser atingida sem o uso dos defensivos e fertilizantes químicos, mediante o emprego de técnicas de manejo ecológico (Carneiro et al., 2015).

Nesse contexto, um número cada vez maior de estudos revela que os micro-organismos podem ser aliados fundamentais na busca da redução do uso e até mesmo substituição de defensivos e fertilizantes, visando a obtenção da sustentabilidade do processo agrícola (Ahmad et al., 2018).

As plantas têm uma relação estreita de dependência com a microbiota do solo, atuando de maneira sinérgica com a mesma (Ahmad et al., 2018). A partir dessas relações, inicialmente foram mais intensos os estudos focados em formas de utilizar os micro-organismos em benefício das plantas como agentes de combate a pragas e doenças, uma das técnicas dentre outras que compuseram o denominado controle biológico. O controle biológico pode ser definido como a introdução de um agente biológico exógeno em um determinado ambiente visando seu estabelecimento permanente para que possa realizar o controle a longo prazo de pragas ali presentes das quais seja um inimigo natural (Kenis et al., 2017).

Existem bactérias, vírus, protozoários e fungos que podem atuar como agentes de biocontrole. Dentre os últimos, *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* são os fungos entomopatogênicos melhor caracterizados e mais utilizados em programas de controle biológico para o controle de artrópodes que podem atuar como pragas ou vetores de doenças (Baron et al., 2019). Tratam-se de duas espécies saprófitas cosmopolitas, ou seja, são patógenos facultativos que não requerem um artrópode hospedeiro para completar seu ciclo de vida e que podem ser encontradas em quase todos os ecossistemas (Schrank e Vainstein, 2010; Ortiz-Urquiza et al., 2015).

Em outros casos, o controle de patógenos pode envolver interações diretas entre fungos e plantas. Nesse caso, os fungos são capazes de atuar como antagonistas dos patógenos de plantas mediante o uso de uma diversa gama de mecanismos, como a produção de metabólitos (antibióticos, compostos voláteis (amônia, cianeto, álcoois, ésteres, cetonas, etc.) e enzimas), a competição (por espaço, fontes de carbono, nitrogênio e minerais), o parasitismo, a indução de resistência sistêmica pela planta e o aumento da resposta de crescimento da mesma, resultando na redução da atividade dos patógenos (Vega et al., 2009).

O gênero *Trichoderma* (Hypocreales) é um dos mais conhecidos por sua atividade contra patógenos de plantas. Seu crescimento é rápido e sua principal função na natureza está relacionada à sua ação como decompositor primário, entretanto, também são capazes de inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos mediante a indução de resistência pela planta ou atuando diretamente contra o patógeno como antagonista, micoparasita ou competidor (Howell, 2003; Verma et al., 2007). Anees et al. (2010) relataram a capacidade antagonista de *Trichoderma gamsii* contra *Rhizoctonia solani in vitro* e *in vivo*, demonstrando que, no caso desse isolado, a antibiose é a principal via de atuação contra o patógeno. Além disso, nesse mesmo estudo, testando isolados de *Trichoderma* oriundos de amostras de solo de uma plantação de beterrabas que apresentava áreas saudáveis e outras com sintomas da presença de *R. solani*, os autores observaram que linhagens obtidas a partir de áreas doentes apresentaram maior atividade antagonista e de indução de resistência em plantas em relação a linhagens da mesma espécie isoladas de áreas saudáveis.

Mesmo para os reconhecidos agentes entomopatogênicos, como *Metarhizium* e *Beauveria*, novas pesquisas sugerem a existência e a importância de relações complexas que esses fungos podem apresentar com plantas (Behie; Bidochka, 2014a), indicando a possibilidade de que essas interações tenham sido predominantes no passado e que a entomopatogenicidade represente uma adaptação evolutiva oportunista para esses genêros (Ortiz-Urquiza et al., 2015). Ownley et al. (2008) relatam que *B. bassiana* foi capaz de proteger plântulas de tomate contra podridão radicular e tombamento, causadas por *R. solani* e *Pythium myriotylum*. Em experimentos utilizando solo artificialmente

contaminado com os patógenos mencionados, os tratamentos nos quais as sementes plantadas receberam tratamento prévio com conídios de *B. bassiana* apresentaram melhor crescimento e redução significative da ação dos patógenos.

Mais recentemente, além da perspectiva do biocontrole, houve a intensificação da pesquisa e aplicação de micro-organismos no processo de biofertilização. Assim, a inoculação microbiana passou a ser uma alternativa confiável em detrimento ao uso de insumos químicos com potencial de ação seja como agentes de biocontrole, bioherbicidas, biopesticidas ou biofertilizantes (Alori e Babalola, 2018). No caso dos fungos, tanto endofíticos quanto micorrízicos são capazes de atuar como promotores do crescimento vegetal, aumentando a taxa de germinação e melhorando o estabelecimento de mudas, além de aumentar a resistência da planta contra estresses bióticos e abióticos mediante a produção de compostos antimicrobianos, hormônios vegetais e outros compostos bioativos. Além disso, esses fungos são responsáveis por auxiliar no aporte de nutrientes do solo, seja de macronutrientes como fósforo, nitrogênio, potássio e magnésio, ou de micronutrientes como zinco, ferro, cobre, entre outros (Rai et al., 2014).

A vantagem do favorecimento da absorção de nutrientes nas raízes resulta, essencialmente, do aumento da área de superfície das mesmas, ou seja, a rede micelial que interage com as raízes vai além da zona de interação com o solo que as mesmas possuiriam sem os fungos. Cada raiz colonizada pode conter até 1,5 m de hifas, as quais ficam espalhadas no solo e, quando há concentrações limitantes de nutrientes como o fósforo (P), podem aumentar em até 10 vezes a superfície de interação radicular e, em até 60 vezes a taxa de absorção do nutriente (Siqueira et al., 1988).

Assim, a interação com os fungos potencializa a utilização de nutrientes da solução do solo, sejam eles mineralizados ou fornecidos via fertilização, e a necessidade de fertilizantes pode ser reduzida na mesma proporção. Baron et al. (2018) demonstraram em seu estudo de campo com plantas de milho que a inoculação de *Aspergillus sidowii* foi capaz de aumentar significativamente os níveis de fósforo nas plantas quando as mesmas receberam 25% a menos da adubação fosfatada recomendada para a cultura, utilizando fosfato de rocha na adubação mineral.

Até o momento, fungos mutualistas (endofíticos e micorrízicos) foram encontrados em tecidos vegetais sadios de todos os táxons de plantas estudados (Rai et al., 2014), o que certamente confirma a hipótese de sua grande importância na produção vegetal. Herre et al. (2007) sugerem que as interações com tais fungos aumentam as defesas da planta hospedeira contra patógenos, aumentando a expressão de mecanismos de defesa intrínsecos e fornecendo outras fontes de defesa, extrínsecas às do hospedeiro.

Em estudo realizado por Waqas et al. (2012) com linhagens de *Phoma glomerata* (LWL2) e *Penicilllium* sp. (LWL3), os autores demonstraram que a interação endofítica entre os fungos e plantas de pepino aumentaram significativamente a biomassa das mesmas além de promover seu crescimento em condições de estresse hídrico e salino. A associação simbiótica promoveu um incremento na assimilação de nutrientes essenciais como potássio, cálcio e magnésio e reduziu os efeitos de toxicidade do sódio durante o estresse salino. Além disso, foi constatada a modulação da produção de ácido abcísico, jasmônico e salicílico, comprovando que os fungos reprogramaram o crescimento das plantas nas condições de estresse.

2.4 Características microbiológicas de interesse na avaliação da promoção do crescimento de plantas

Como previamente descrito, os micro-organismos podem auxiliar na promoção de crescimento mediante diversos processos desencadeados pela interação com as plantas. Várias dessas habilidades podem ser constatadas laboratorialmente e utilizadas como critério para a seleção de linhagens com potencial de aplicação *in planta* como bioinoculantes. Dentre essas habilidades esse estudo aprofunda-se na capacidade de solubilização de fósforo, na produção de ácido indolacético (AIA) e na produção de quitinases.

O fósforo é um nutriente essencial às plantas, uma vez que estrutura bioquimicamente moléculas de energia, ácidos nucléicos, coenzimas, entre outros, participando de todos os processos que envolvam gasto de energia pela planta (Gaind,

2016). Os solos brasileiros são pobres em fósforo disponível para ser assimilado pelas plantas. Em decorrência de sua origem e da forte interação que pode apresentar com o solo, especialmente onde a quantidade de argila é maior, grande parte desse nutriente pode permanecer adsorvida (Raij, 1991). Dessa forma, o fósforo é um dos nutrientes que mais limitam a produção agrícola em solos tropicais, criando uma demanda por adubação suplementar fosfatada para que a planta tenha um desenvolvimento adequado (Rheinheimer et al., 2008).

Em adição aos problemas ambientais já mencionados em relação ao uso indiscriminado de fertilizantes, trata-se de um processo caro e, além disso, estudos revelam que apenas 10 a 25% do fosfato fornecido pela adubação química é assimilado de maneira eficiente pelas plantas (Tripti et al., 2017). Nesse contexto, a disponibilização de fósforo via ação microbiana é uma estratégia muito promissora para a nutrição de plantas. Micro-organismos disponibilizadores de fósforo atuam sobre as formas insolúveis desse nutriente (inorgânico e orgânico) presentes no solo mediante a liberação de íons hidrogênio e de ácidos orgânicos ou a produção de enzimas (fosfatases e fitases) que são capazes de hidrolisar o fósforo orgânico ou inorgânico deixando-o pronto para a absorção pelas raízes (Oliveira Mendes et al., 2014).

Além da solubilização de fósforo, outra característica importante relacionada à habilidade de promoção de crescimento de plantas por micro-organismos é a produção de fitormônios, moléculas naturalmente produzidas pelas plantas para mediar seu desenvolvimento, e que também podem ser sintetizadas nas vias metabólicas microbianas de diversas espécies de bactérias e fungos (Martínez-Hidalgo et al., 2019).

Dentre a classe dos fitormônios encontram-se as auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abcísico e outros. As auxinas, sendo a mais conhecida delas o AIA, são consideradas como as principais reguladoras do crescimento de plantas e apresentam diversos efeitos positivos no desenvolvimento tanto da parte aérea quanto das raízes das plantas, como por exemplo as respostas de tropismo, divisão e alongamento celular, diferenciação de tecido vascular e a iniciação do processo de formação de raízes (Jaroszuk-Scisel et al., 2014).

Nesse aspecto, além desses benefícios, o AIA atua como uma molécula de sinalização em muitas interações entre plantas e micro-organismos, e pode interferir no balanço desse fitôrmonio nas plantas. Como exemplo, sabe-se que a síntese de AIA pelos micro-organismos da rizosfera pode modificar a arquitetura das raízes, aumentando não só a massa como também a área radicular, que será colonizada pelos micro-organismos e simultaneamente servirá para incrementar a aquisição de nutrients do solo pela planta (Nieto-Jacobo et al., 2017).

Já as quitinases, são enzimas responsáveis pela degradação de quitina. A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, ficando atrás apenas da celulose (Karthik et al.,2014). Dentre as diversas aplicações biotecnológicas envolvendo o uso de quitinases, a mais difundida e pesquisada é referente à sua ação como uma ferramenta de biocontrole, pois a quitina é componente estrutural básico das paredes celulares de fungos, do exoesqueleto de insetos e da cuticula de nematoides, e, dessa forma, micro-organismos com a habilidade de produzir essas enzimas podem atuar como antagonistas ou parasitas desses organismos em sua ação como fitopatógenos (Karthik et al., 2014; Hartl et al., 2012).

O gênero *Trichoderma* é o mais estudado em relação à produção de quitinases que atuam no combate a outros fungos fitopatogênicos, sendo consideradas muito eficientes contra diversas espécies prejudiciais às culturas agrícolas (Agrawall e Kotasthane, 2012), como *R. solani*, por exemplo (Anees et al., 2010). As espécies *M. anisopliae* e *B. bassiana* são os fungos entomopatogênicos de uso mais difundido, e são capazes de produzir quitinases de maneira muito eficiente (Hartl et al., 2012).

No caso dos nematoides, os fungos capazes de atuar no combate a esses vermes, denominados fungos nematófagos, são capazes de envolver o corpo de seu hospedeiro com suas hifas e então secretam diversas enzimas, principalmente quitinases, que promovem a abertura da cutícula para que as hifas adentrem no interior do verme e o deixe doente (Sexton e Howlett, 2006). A espécie de fungo *Purpureocillium lilacinum* é uma das mais estudadas e testadas para o biocontrole de nematoides, especialmente contra espécies do gênero *Meloidogyne* (Atkins et al., 2005; Baron et al., 2019).

Dentre as características de interesse supra mencionadas, pode-se concluir que a solubilização de fósforo e a produção de AIA estão diretamente envolvidas com a avaliação do potencial de promoção de crescimento, pois relacionam-se de maneira direta com o desenvolvimento vegetal. Já a produção de quitinases, é um aspecto indiretamente relacionado à promoção de crescimento, uma vez que a síntese dessas enzimas pelos micro-organismos envolve a ação contra fitopatógenos que são prejudiciais ao desenvolvimento das plantas.

2.5 O gênero *Purpureocillium* e sua importância no processo agrícola

Apesar do reconhecimento da importância dos fungos que vivem associados às plantas, pouco ainda se sabe sobre os compostos produzidos pelos mesmos e como atuam na promoção do crescimento e do desenvolvimento vegetal. Como descrito anteriormente, diversos gêneros e espécies fúngicas de interesse já foram e continuam sendo estudados objetivando a prática de um manejo mais sustentável e economicamente viável de lavouras. Nesse contexto, esse estudo descata o gênero *Purpureocillium*.

Taxonomicamente, o gênero *Purpureocillium* foi recentemente proposto, sendo anteriormente reconhecido como *Paecilomyces*. Este, foi introduzido por Bainier (1907), que o descreveu como sendo próximo a fungos do gênero *Penicillium*, com a diferença de que suas colônias não apresentavam coloração verde e suas fiálides cilíndricas eram mais curtas. *Paecilomyces* compreende espécies com conidióforos verticilados dando suporte a verticilos divergentes de ramos e fiálides. As fiálides tem uma porção basal cilíndrica ou inflada com um longo pescoço, e produzem conídios unicelulares e hialinos em cadeias basípetas (conidiogênese basípeta) (Samson, 1974).

Trata-se de um gênero polifilético, que apresenta representantes em famílias e até mesmo ordens distintas, e que, nos últimos anos, tem passado por extensa revisão, o que resultou em diversas alterações taxonômicas. A espécie tipo original do gênero, *Paecilomyces variotii* pertence à ordem Eurotiales (Bainier, 1907), enquanto outras

linhagens estavam classificadas na ordem Hipocreales. Luangsa-ard et al. (2011) em estudo morfológico e filogenético aprofundado, propuseram a criação do gênero *Purpureocillium* para acomodar a espécie *Paecilomyces lilacinus*, modificando-a para *Purpureocillium lilacinum*.

Outras modificações taxonômicas importantes também ocorreram antes e depois da de Luangsa-ard et al. (2011). Luangsa-ard et al. (2004) já haviam proposto o retorno de *Paecilomyces javanicus* e *Paecilomyces farinosus* para o gênero *Isaria*, onde sob nova combinação as espécies passaram a ser designadas como *Isaria javanica* e *Isaria farinosa*, respectivamente. Sigler et al. (2010) tranferiram a espécie *Paecilomyces viridis* para o gênero *Chamaelomyces*. Kepler et al. (2014) transferiram a espécie *Paecilomyces marquandii* para o gênero *Metarhizium*, uma vez que estudos anteriores já revelavam o agrupamento genético dessa espécie junto a membros do gênero. Mais recentemente, Kepler et al. (2017) também sugeriram a nova combinação *Cordyceps fumosorosea* para a então espécie *Paecilomyces fumosoroseus* (=*Isaria fumosorosea*).

Aspectos taxonômicos à parte, em relação às suas características de interesse para os processos agrícolas, diversos estudos caracterizam o potencial de algumas das espécies acima mencionadas. A espécie mais estudada é certamente *P. lilacinum,* um hifomiceto de solo de distribuição cosmopolita com sua reconhecida ação no controle de nematoides, sendo comercializada em vários países como produto de combate a nematoides do solo prejudiciais ao desenvolvimento vegetal (Atkins et al., 2005; Dong e Zhang, 2006).

Os nematicidas químicos utilizados no combate a esses patógenos têm sua eficiência questionada, pois seus mecanismos de ação não são específicos, são caros e não são seletivos, apresentando toxicidade a espécies inofensivas de vertebrados e invertebrados, incluindo o próprio ser humano (Li et al., 2015; Degenkolb e Vilcinskas, 2016). Além disso, outra grande desvantagem do uso de nematicidas químicos é que não afetam o desenvolvimento dos ovos. A casca dos ovos dos nematoides é composta por diversas camadas do polissacarídeo quitina, que forma uma barreira de difícil penetração e exerce uma importante função na resistência aos nematicidas (Wharton, 1980). Dessa forma, a utilização de agentes biológicos representa uma forma economicamente mais

viável e ambientalmente apropriada no combate aos nematoides e, de maneira natural, fungos comumente encontrados no solo e em associação com plantas que sejam capazes de produzir e secretar quitinases são portadores de uma grande vantagem adaptativa para o seu próprio desenvolvimento e em benefício de plantas com as quais podem estar associados ou não.

Khan et al. (2004a) prepararam um extrato com seis diferentes quitinases obtidas a partir de *P. lilacinum* (linhagem 251) e o aplicaram em ovos de nematoide-da-galha a fim de estudar os efeitos das enzimas sobre a casca dos ovos. Como resultado observaram que as cascas foram drasticamente alteradas e perderam sua integridade.

A literatura reporta vários aspectos positivos relacionados a representantes de *Paecilomyces*, como a produção de metabólitos secundários promotores do crescimento em plantas (Khan et al. 2012), a capacidade de promoção de crescimento em meio a elevadas concentrações de níquel no solo (Bilal et al., 2017), e de solubilização de nutrientes como o fósforo (Rinu e Pandey, 2011; Ahuja et al., 2007). Entretanto, as pesquisas com *Purpureocillium* apontam especialmente para o seu potencial como agente de biocontrole. e outros próximos, recentemente recombinados e previamente acomodados no gênero *Paecilomyces*, em relação à possibilidade de possuírem atributos que possam ser utilizados para a promoção do crescimento de plantas, encaixando-se no perfil da busca por uma agricultura produtiva e ecologicamente apropriada.

Assim, esse estudo destinou-se ao isolamento de fungos de solo e à caracterização taxonômica dos representantes morfologicamente reconhecidos como *Purpureocillium* sp.. Além disso, o estudo também dedicou-se à caracterização *in vitro* do seu potencial de promoção de crescimento de plantas mediante a avaliação da solubilização de fósforo, produção de AIA e de quitinases. A partir dessa triagem *in vitro* objetivou-se a seleção de linhagens para serem testadas em condições de casa de vegetação nas culturas de milho, soja e feijão, que são de suma importância dentro da economia agrícola brasileira. Dessa forma, esse estudo teve como meta contribuir com informações relevantes sobre o potencial desses fungos como biofertilizantes para culturas de interesse nacional e internacional, que possam agregar à busca pela implementação de um processo agrícola cada vez mais sustentável.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material fúngico: isolamento e preservação

O isolamento dos fungos foi realizado a partir de solo agricultável coletado em uma propriedade localizada no distrito de Jurupema, pertencente ao município de Taquaritinga – SP, Brasil. A área de coleta possui cerca de 8.400 m^2 (GNSS: 21 ° 22'20.9 "S; 48 ° 35'24.6" W Gr.– aproximadamente 150 x 56 m) ocupada com goiabeiras (*Psidium guajava* variedade Paluma – 173 indivíduos) infestadas por nematoides, o que motivou a utilização da área como fonte de isolamento dos fungos, pois como o gênero *Purpureocillium* apresenta espécies nematófagas, esperava-se uma densidade populacional mais elevada desses fungos no local em questão. A área foi dividida em quatro quadrantes semelhantes, com aproximadamente 2.100 m^2, e de cada quadrante foram recolhidas cinco amostras simples, as quais foram misturadas para a obtenção de uma amostra composta por quadrante.

A coleta do solo foi realizada com o auxílio de um trado, sendo amostrado o solo de até 15 cm de profundidade. As amostras compostas obtidas no campo foram acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno e transportadas imediatamente para o Laboratório de Microbiologia do Solo (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - UNESP Jaboticabal) onde foram imediatamente processadas.

A técnica de isolamento empregada foi o método de diluição seriada. Amostras de 10 g de solo das quatro amostras compostas foram pesadas e transferidas para erlenmeyers contendo 100 mL de solução tampão de pirofosfato de sódio na concentração de 1 g/ L. Em seguida, foi realizada a homogeneização da amostra em agitador circular por 60 minutos a 90 rpm, a fim de desfazer todos os agregados de solo e expor as células microbianas à solução.

A partir das quatro soluções mãe foram preparadas diluições seriadas (1 mL de solução concentrada: 9 mL de solução de pirofosfato de sódio) até a quinta diluição.

Alíquotas de 1 mL das diluições foram plaqueadas em triplicata em três meios de cultivo diferentes adicionados de antibióticos para inibir o crescimento bacteriano (Tabela 1).

Os meios de cultivo utilizados foram o meio de Martin (1950), um meio comum não seletivo para o isolamento de fungos de solo, e os meios seletivos ágar batata com cloreto de sódio e DOC2 (Tabela 1). O uso de meios seletivos é comum na busca pelo isolamento de gêneros e espécies definidas, nesse caso, o gênero *Purpureocillium*. Lembrando que esse gênero foi classificado até 2011 como *Paecilomyces* e, por isso, a busca em literatura foi feita para o isolamento seletivo de fungos desse gênero. O ágar batata dextrose (BDA) adicionado de cloreto de sódio a 1,5%, foi adaptado da versão de Mitchell et al. (1987) na qual os autores sugerem o uso do sal devido à uma característica inerente ao gênero *Paecilomyces* que é sua osmotolerância. Entretanto, na versão original do meio, os autores também adicionam PCNB (pentacloronitrobenzeno) e Benomil, químicos fungicidas que auxiliariam na inibição do desenvolvimento de outros fungos altamente esporulantes, especialmente *Trichoderma*, favorecendo o crescimento seletivo de *Paecilomyces*. Como esses químicos apresentam restrições de uso pela legislação, a complementação do meio de cultura seletivo com essas substâncias não foi possível.

No caso do meio DOC2, o mesmo foi descrito por Shimazu e Sato (1996) como favorável ao isolamento de *B. bassiana.* Entretanto, trabalhos posteriores, como o de Chen et al. (2010) isolaram uma espécie de *Paecilomyces* (*P. echinosporus*) inédita para a ciência utilizando o meio DOC2 e, dessa forma, optou-se pela sua utilização nesse estudo.

As placas inoculadas foram incubadas por 3 a 21 dias a 25ºC, sendo monitoradas diariamente para o surgimento de novas colônias, atentando-se especialmente para colônias com morfologia similar a fungos do gênero *Purpureocillium*.

As culturas obtidas foram purificadas mediante repiques sucessivos em ágar malte 2% ou ágar batata dextrose (BDA) adicionados de antibiótico (Tabela 2). As culturas puras foram preservadas em tubos inclinados contendo ágar malte 2% mantidos em geladeira a 4ºC e por ultracongelamento. Nessa técnica, os fungos foram cultivados em microtubos de 2,0 mL contendo 0,5 mL de caldo malte 2% (Tabela 2) por 3 a 5 dias. Após a incubação foi adicionado 0,5 mL de solução de glicerol a 30% a fim de se obter uma

concentração final de 15% do mesmo. O glicerol funciona como um agente crioprotetor no processo de preservação. À mistura foram adicionadas pérolas de vidro previamente esterilizadas que atuam como suporte físico para adesão das hifas e conídios e facilitam o processo de reativação dos micro-organismos. Os microtubos foram devidamente fechados, agitados e estocados em ultrafreezer a -80ºC.

Tabela 1. Composição dos meios de cultura utilizados para o isolamento dos fungos.

Meio de Martin	Meio DOC2	Meio BDA + NaCl 1,5%
KH_2PO_4 ... 1,0 g	Bactopeptona ... 3,0 g	BDA (Acumedia®) ... 39,0 g
$MgSO_4$ ... 0,5 g	$CuCl_2$ ... 0,2 g	NaCl ... 15,0 g
Peptona ... 5,0 g	Cristal violeta ... 2,0 mg	Cloranfenicol ... 0,5 g
Dextrose ... 10,0 g	Cloranfenicol ... 0,5 g	Água destilada ... 1000 mL
Rosa de Bengala ... 0,033 g	Ágar ... 15,0 g	-
Estreptomicina ... 0,3 g	Água destilada ... 1000	
(após autoclavagem)	mL	
Ágar ... 15,0 g	Ajustar pH para 10	
Água destilada ... 1000 mL		

Tabela 2. Composição dos meios de cultura utilizados para purificação e preservação dos fungos.

Ágar malte 2%	Caldo malte 2%	Ágar dextrose de batata (BDA)
Extrato de malte … 20,0 g	Extrato de malte … 2,0 g	BDA (Acumedia®) ... 39,0 g
Ágar ... 20,0 g	Cloranfenicol ... 0,5 g	Cloranfenicol ... 0,5 g
Cloranfenicol ... 0,5 g	Água destilada ..1000 mL	Água destilada ... 1000 mL
Água destilada ... 1000 mL	-	-

3.2 Análises morfológica e molecular

3.2.1 Avaliação Morfológica

As colônias isoladas foram analisadas quanto ao padrão de crescimento em meio de cultivo e foram submetidas à análise por microscopia óptica mediante o preparo de lâminas com o corante lactofenol (azul de algodão) e pela técnica de microcultivo (Crous et al., 2009) para classificação a nível genérico. Para os isolados morfologicamente classificados como pertencentes ao gênero *Purpureocillium* seguiu-se com a análise molecular.

3.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

Os fungos foram cultivados em pequenos frascos contendo 40 mL de caldo batata-dextrose (BD –200g de batata descascada para 1L de água destilada. Foram fervidos por 20 minutos, coados, adicionados 20 g de dextrose e o volume completado para 1L) por 3 a 4 dias a 26 – 28°C. Após a incubação, o micélio foi retirado dos frascos, peneirado, lavado com água ultrapura (Mili-Q) e acondicionado em cadinhos de porcelana devidamente limpos (assepsia com etanol 70%), e levados para secagem em estufa a 50°C por pelo menos 12 horas.

O micélio seco foi processado para extração segundo metodologia adaptada de Kuramae-Izioka (1997). Inicialmente, o micélio foi macerado com nitrogênio líquido até a formação de um pó. Aproximadamente 0,1g do micélio em pó obtido da maceração foi transferido para microtubos de 2,0 mL para dar continuidade ao processo de extração. O restante do macerado foi acondicionado em outro microtubo (para cada um dos isolados) e armazenado a -20°C.

Aos microtubos contendo 0,1g de macerado foram adicionados 800 µL do tampão de extração de DNA (160 mM de Tris-HCl pH 8.0, 60 mM de EDTA pH 8.0, 20 mM de

NaCl, SDS 0,5% e CTAB 0,5%) para lise celular e foram agitados em vórtex por 10 a 15 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados a 65ºC por 50 minutos. Em seguida, acrescentou-se aos tubos 400 µL de acetato de potássio 5M, e foi realizada uma agitação por inversão dos tubos. Em seguida os tubos foram mantidos em banho de gelo por 30 minutos e depois foram centrifugados a 12.000 x g, a 10ºC por 10 minutos. As células lisadas e o complexo SDS-proteínas foram precipitados nesse momento. O sobrenadante foi recolhido e transferido para novos microtubos de 2,0 mL.

Em seguida foram adicionados aos tubos com o sobrenadante 650 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1 v/v). Agitou-se vigorosamente em vórtex, por aproximadamente 10 segundos e a mistura foi centrifugada a 12.000 x g, a 10ºC por 10 minutos. Todo o sobrenadante foi recolhido e transferido para novos tubos de 2,0 mL.

Para a precipitação do DNA extraído, foram adicionados ao sobrenadante obtido 1 mL de etanol absoluto gelado e misturou-se por inversão. Os tubos foram então armazenados a -20ºC em freezer por 12 horas (overnight). Após esse período, a mistura foi centrifugada a 12.000 x g, a 10ºC por 20 minutos, levando à formação do pellet de DNA. O etanol foi descartado por inversão e adicionou-se 1 mL de etanol 70% gelado e realizou-se nova centrifugação sob as mesmas condições do etanol absoluto. O etanol foi novamente descartado e o pellet de DNA formado foi seco em estufa a 50ºC e ressuspendido em 60 µL de solução TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0).

Após a ressuspensão, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), observando-se a relação da absorbância entre os comprimentos de onda de 260 e 280 nm que refere-se à qualidade do DNA, e espera-se que esteja entre 1,8 e 2,0 para material de boa qualidade (Sambrook e Russell, 2001). A integridade do DNA foi observada em gel de agarose 1% (p/v) contendo o corante Sybr Safe (Thermo Scientific) visualizado sob luz ultravioleta em fotodocumentador BioRad.

Em seguida, as amostras de DNA genômico foram purificadas com o kit Wizard ® SV Gel and PCR Clean-up System seguindo as especificações do fabricante. O DNA purificado foi armazenado a -20 °C e utilizado para a amplificação dos fragmentos de interesse.

A amplificação foi realizada para dois segmentos de DNA: 1) para a região ITS do DNA ribossomal com os iniciadores ITS1 (5’ TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3’) e ITS4 (5’ TCCTCCGCTTATTGATATGC 3’) (White et al., 1990) e 2) para a região codificadora da proteína β-tubulina, com os iniciadores Bt2a (5’ GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 3’) e Bt2b (5’ ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC 3’) (Glass e Donaldson, 1995).

As reações foram montadas para um volume final de 20 µL, contendo os reagentes apresentados na Tabela 3 com suas quantidades definidas.

Tabela 3. Relação de reagentes e suas quantidades utilizados na reação de ampificação dos fragmentos de DNA de interesse.

Reagente	Quantidade (µL)	Reagente	Quantidade (µL)
$MgCl_2$ (25 mM)	1,60	**BSA***	2,00
dNTPs (10 mM)	0,40	**DMSO***	0,10
Primer F (10 pmol)	0,50	**Taq polimerase (5U/ µL)**	0,15
Primer R (10 pmol)	0,50	**Água ultrapura (Mili-Q)**	9,75
Tampão 5x	4,00	**DNA molde**	1,00
		Total	**20,00**

*BSA: Soro Albumina Bovina

*DMSO: Dimetilsulfóxido

O programa de amplificação seguido foi o mesmo para a região ITS e para β-tubulina: 94 °C/3min seguido de 30 ciclos a 94 °C/30s, 58 °C/30s, 72 °C/1min, 10 °C/∞.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados utilizando-se o reagente ExoSAP-IT (Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante.

Em seguida, o produto de PCR purificado foi utilizado como molde para a realização da PCR de sequenciamento com o kit BigDye Terminator® (Applied Biosystems) segundo as instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados foram os

mesmos da primeira amplificação, seguindo a mesma programação de termociclagem, porém com um aumento no número de ciclos, 41 ao todo.

Os produtos da PCR de sequenciamento foram precipitados em 80 µL de isopropanol 75% (v/v) e centrifugados a 2200 x g por 55 minutos a 14 °C. Posteriormente, o isopropanol foi descartado por inversão e o precipitado foi lavado com 180 µL de etanol 70% (v/v) sob centrifugação a 1980 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e realizou-se uma centrifugação final da placa invertida a 200 x g para evaporação rápida do etanol. A secagem foi concluída em estufa aquecida a 50°C por 10 minutos. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi desnaturado a 95°C por 5 minutos em formamida (Life Technologies).

O DNA desnaturado foi então aplicado em um sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) onde foi realizada a leitura das sequências de nucleotídeos. A qualidade de bases dos eletroferogramas e as sequências consenso foram obtidas pelo pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Ewing e Green, 1998; Green, 1996; Gordon et al., 1998). A edição das sequências consenso foi realizada baseando-se na qualidade Phred, a qual deveria ser igual ou superior a 20. As sequências de DNA devidamente editadas foram comparadas a outras sequências depositadas no banco de dados GenBank do NCBI mediante o uso da ferramenta BLAST (Altschul et al., 1990).

3.2.3 Análise filogenética

Para a execução da análise filogenética foram recolhidas do banco de dados as sequências publicadas que apresentaram maior similaridade com as sequências dos isolados desse estudo, para ambos os genes, incluindo as sequências de espécies-tipo. Além dessas, sequências de gêneros e espécies próximas foram utilizadas com o intuito de aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos.

Para as análises filogenéticas, o melhor modelo evolutivo foi selecionado de acordo com o critério de informação de Akaike (AIC) utilizando-se a ferramenta ModelTest 3.7 (Posada e Crandall, 1998; Posada e Buckley, 2004). As sequências alinhadas das

duas regiões gênicas separadamente e, posteriormente concatenadas, foram submetidas à análise bayesiana utilizando-se o algoritmo *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) pelo *software* MrBayes 3.2.3 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). O modelo evolutivo utilizado para a análise de cada região separadamente e das sequências concatenadas dos dois genes foi correspondente ao tipo de substituição 6 e distribuição gamma. As análises foram realizadas em quatro cadeias com 2.000.000 de gerações, sendo as árvores amostradas a cada 100 gerações. Ao final das análises, obtendo-se desvio padrão inferior a 0,01, 25% das árvores geradas inicialmente foram descartadas. O filograma obtido foi editado graficamente pelo *software* Dendroscope 3 (Huson e Scornavacca, 2012).

3.3 Caracterização *in vitro* do potencial de promoção de crescimento de plantas

3.3.1 Teste para a solubilização de fósforo

A habilidade de solubilização de fósforo foi quantitativamente avaliada utilizando-se como única fonte desse nutriente para o crescimento dos fungos um fosfato de rocha insolúvel natural, a fluorapatita (ou apatita de Araxá).

Para sua execução, foi preparado o meio de cultura líquido descrito por Nahas et al. (1994), substituindo-se a fonte de fósforo de fosfato de cálcio por fluorapatita na concentração de 5 g/ L de meio de cultura.

O meio líquido foi preparado e distribuídos 50 mL em erlenmeyers de 125 mL contendo a fluorapatita previamente pesada proporcionalmente ao volume adicionado de meio líquido (0,25 g em cada erlenmeyer para 50 mL de meio líquido). Após autoclavagem, os frascos foram inoculados com discos de 8 mm de diâmetro de ágar BDA contendo micélio cultivado por 7 dias, e foram incubados por 7 dias em agitador rotativo com temperatura regulada a 25ºC e rotação de 100 rpm.

Após o período de incubação, o meio foi submetido à filtração a vácuo utilizando papel filtro previamente pesado em balança analítica para a separação do micélio do filtrado. Este foi então submetido à análise da quantidade de fósforo solúvel presente seguindo metodologia de Ames (1966), que envolve uma reação colorimétrica obtida pela mistura de 0,1 mL da amostra com 1,5 mL de água destilada e 1,4 mL de reagente R (mistura de 1 parte de solução A (ácido ascórbico 10% em água destilada) para 6 partes de solução B (1,25 g de molibdato de sódio; 7,3mL de ácido sulfúrico (p.a.); água destilada q.s.p. 300mL)). Após a reação, o procedimento foi finalizado com a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 820 nm.

Os valores de absorbância obtidos foram incorporados em uma equação de reta obtida previamente a partir da montagem de uma curva padrão com concentrações definidas de fósforo. Além disso, a biomassa foi seca em estufa a 40ºC por 48h e novamente pesada para obtenção dos valores de massa do micélio, subtraindo-se o valor final, do valor inicial do papel filtro previamente pesado. Por fim, os valores de fósforo obtidos foram divididos pela biomassa obtendo-se como valor final para análise a quantidade de microgramas de fósforo solubilizado por grama de micélio produzido (µg P/ g).

O teste foi realizado na forma de delineamento inteiramente casualizado, sendo cada isolado considerado como um tratamento, com três repetições. Os dados foram analisados comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.3.2 Produção de ácido indolacético (AIA)

Para a detecção da produção de AIA, foi utilizada a metodologia de Kuss et al. (2007) com modificações segundo Milani (2017). O meio de cultura utilizado foi o dextrose levedura glicose sacarose (DYGS, do inglês *Dextrose Yeast Glucose Sucrose*) (Tabela 4) contendo o aminoácido triptofano, considerado o principal precursor para a síntese de AIA pelas vias microbianas (Milani, 2017).

O meio foi preparado e distribuído em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do mesmo e foi inoculado com três discos de 8 mm de diâmetro de micélio crescido em BDA por 7 dias. A incubação foi feita em agitador de rotação circular a 100 rpm, 25ºC por 7 dias. Após a incubação, o meio foi filtrado a vácuo utilizando papel filtro previamente pesado em balança analítica. Ao filtrado foi adicionado o reagente de Salkowski (Tabela 4) na proporção de 2 partes do sobrenadante para 1 do reagente. A mistura foi incubada no escuro por 25 minutos e seguiu-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm para detectar e quantificar a presença de AIA. Uma curva padrão com quantidades conhecidas de AIA foi utilizada como referência para o cálculo da quantidade de fitormônio presente nos filtrados oriundos do cultivo com os isolados fúngicos.

O papel filtro com a biomassa foi seco em estufa a 40ºC por 48h e novamente pesado para obtenção dos valores de massa do micélio, subtraindo-se o valor final, do valor inicial do papel filtro previamente pesado. Os valores de produção de AIA obtidos foram divididos pela biomassa obtendo-se como valor final para análise a quantidade de microgramas de AIA produzido por grama de micélio (µg AIA/ g micélio).

O teste foi realizado na forma de delineamento inteiramente casualizado, sendo cada isolado considerado como um tratamento, com três repetições. Os dados foram analisados comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4. Composição do meio de cultura DYGS e do reagente de Salkowski utilizados no teste de detecção da produção de AIA

Meio DYGS	Reagente de Salkowski
Glicose ... 2,0 g	Cloreto férrico ($FeCl_3$) ... 0,5mol/L
Extrato de levedura ... 2,0 g	Ácido perclórico ($HClO_4$) ... 35%
Peptona ... 1,5 g	
Fosfato monobásico de potássio (K_2HPO_4)...0,5 g	
Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) ... 0,5 g	
L-triptofano ... 5 mM	

3.3.3 Produção de quitinases

Para a detecção da produção de quitinases os fungos foram testados segundo a metodologia de Agrawall e Kotasthane (2012), a qual utiliza a inoculação em meio basal (Tabela 5) contendo quitina colloidal como única fonte de carbono e o indicador de pH púrpura de bromocresol para indicar a produção de quitinases. Esse indicador apresenta coloração amarela em pH baixo e violeta após seu intervalo de mudança na faixa de pH de 5,2 a 6,8. O pH do meio basal com a quitina e o indicador é ajustado em 4,7, fazendo com que o meio de cultura seja amarelo.

O indicador púrpura de bromocresol é um corante aniônico que interage com as hidroxilas dos grupamentos carbonila e imina das moléculas de N-acetilglicosamina que compõem a cadeia homopolissacarídica da quitina. O monômero de N-acetilglicosamina é um açúcar básico, assim, quando a quitina é degradada por quitinases produzidas pelos fungos testados, os monômeros liberados elevam o pH do meio de cultura promovendo a mudança de coloração do mesmo para violeta.

O preparo de quitina coloidal seguiu a metodologia de Berger e Reinolds (1988) com algumas adaptações: Para cada 20g de quitina de camarão (Sigma) foram adicionados 350mL de ácido clorídrico concentrado e agitou-se até homogeneização. A mistura foi incubada em geladeira a 4ºC overnight. Após esse período, foram adicionados 2L de água destilada e a mistura foi homogeneizada e novamente incubada em geladeira a 4ºC por 48 horas. A mistura foi então filtrada em papel filtro e continuamente lavada até atingir pH neutro (7,0).

Tabela 5. Composição do meio basal (Agrawall e Kotasthane, 2012) utilizado para detecção da produção de quitinases pelos isolados fúngicos.

Meio Basal	
Sulfato de magnésio heptaidratado ($MgSO_4.7H_2O$) … 0,3 g	Quitina coloidal (90-95% umidade) … 4,5 g
Sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) … 3,0 g	Púrpura de bromocresol … 0,15 g
Fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) … 2,0 g	Ágar … 15,0 g
Ác. cítrico monoidratado … 1,0 g	Água destilada … 1000 mL
Tween 80 … 200 µL	pH ajustado para 4,7

3.4 Critérios de seleção para realização dos testes em casa de vegetação

Após a triagem *in vitro* para o potencial de promoção de crescimento pelos isolados, a seleção para o teste em casa de vegetação seguiu os seguintes critérios:

a) Para serem testados *in planta*, os isolados deveriam ter se destacado em pelo menos dois dos três aspectos avaliados (solubilização de fósforo, produção de AIA ou de quitinases);
b) Em caso de seleção de um número considerado inviável de isolados para serem testados em casa de vegetação, a prioridade de seleção seria para os que apresentassem maior potencial para as características avaliadas diretamente relacionadas à promoção de crescimento de plantas, sendo estas a solubilização de fósforo e a produção de AIA.

3.5 Teste de produção dos isolados selecionados em arroz parboilizado

Os isolados selecionados no processo de triagem tiveram sua capacidade de crescimento em arroz parboilizado testada em laboratório. O processo de produção seguiu a metodologia indicada por Alves e Pereira (1998) com algumas modificações. Primeiramente, o arroz parboilizado (tipo 1) passou por uma etapa de lavagem, com água de torneira, e foi mantido em uma bandeja, submerso, por aproximadamente 40 minutos com a água à temperatura ambiente. Em seguida, o arroz foi peneirado para retirada do excesso de água. O arroz úmido foi então amostrado em sacos plásticos autoclaváveis de polipropileno, colocando-se em cada saco de 300 a 400g de arroz úmido. Os sacos foram lacrados com grampos e levados a autoclave a 121°C por 40 minutos. Após a autoclavagem o arroz foi levado para a geladeira para esfriar, e após resfriado seguiu-se para a etapa de inoculação.

Os isolados selecionados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Acumedia®) e incubados a 25°C. Após sete dias de incubação, uma suspensão de conídios foi preparada mediante a raspagem das placas com adição de uma solução de Tween 80 a 0,1%. As suspensões foram coadas em tecido do tipo voal esterilizado para que ficassem livres do excesso de fragmentos de micélio e ágar, e foram padronizadas mediante contagem em câmara de Neubauer, para uma concentração de 10^6 conídios/ mL.

A inoculação foi realizada utilizando-se uma agulha e seringa. Aproximadamente 5 mL de suspensão de cada isolado foi inoculada dentro dos sacos plásticos com arroz parboilizado estéril previamente preparados. Os sacos foram então incubados em estufa microbiológica a 25°C por um período de 7 a 10 dias para colonização do arroz. Após esse período, os sacos foram transferidos para uma sala de incubação, a qual previamente foi higienizada com hipoclorito de sódio e álcool 70% e irradiada com luz ultravioleta por 30 minutos. Nessa sala, os sacos remexidos, ou seja, o arroz colonizado foi levemente revirado no saco, especialmente naqueles onde a colonização era menor,

e um picote lateral foi feito, a fim de aumentar a oxigenação no interior do mesmo e estimular ainda mais a esporulação do micélio.

Os sacos permaneceram na sala por mais 5 a 7 dias e então, nessa mesma sala, os pacotes foram abertos e o arroz colonizado foi transferido para bandejas plásticas, higienizadas e irradiadas com luz ultravioleta, para secagem por mais 3 a 5 dias. O arroz seco foi acondicionado em sacos plásticos e armazenado em freezer a -20 °C.

3.6 Avaliação da promoção de crescimento de plantas pelos isolados selecionados em casa de vegetação

Os isolados selecionados foram submetidos ao teste em condições de vaso em casa de vegetação, nas culturas de milho (híbrido 2B587PW Dow Agro Sciences), soja (Intacta RR2 Pro Monsanto) e feijão (BRS FC402 Embrapa). Nenhuma das sementes apresentava prévia incolulação com qualquer agente biológico ou tratamento com fungicida. Apenas as sementes de milho possuíam tratamento com inseticida.

Anteriormente à montagem do teste, as sementes foram submetidas a um teste de germinação em placa de Petri 90 x 15 mm contendo vermiculita umedecida. Em cada placa foram dispostas 10 sementes, sendo preparadas três placas para cada cultura.

Foram utilizados vasos com capacidade volumétrica de 5 litros, preenchidos com solo do tipo latossolo vermelho eutrófico previamente peneirado. Uma análise química preliminar do solo foi realizada e a partir dela foi preparada uma adubação de correção de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) para o plantio seguindo as orientações de Raij et al. (1997) para cada cultura. Assim, foram utilizados como fontes de N, P e K, respectivamente, ureia, superfosfato simples e cloreto de potássio. A adubação foi montada em formulações individuais em placas de Petri 60 x 15 mm para cada vaso contendo os fertilizantes e foi aplicada no mesmo dia do plantio misturando-se os fertilizantes com a camada superficial de solo nos vasos. A análise química e as doses utilizadas para cada cultura e encontram-se descritas na Tabela 6.

Tabela 6. Análise química preliminar do solo utilizado para o preenchimento dos vasos e doses de fertilizantes minerais utilizadas para cada cultura nos vasos para o teste em casa de vegetação. As doses foram calculadas baseando-se na análise do solo utilizado e no tipo de cultura.

Análise química preliminar do solo			
M.O.= 11 g/ dm^3; **P resina** = 20 mg/ dm^3; **K** = 0,7 $mmol_c$/ dm^3; **Ca** = 19 $mmol_c$/ dm^3; **Mg** = 5 $mmol_c$ / dm^3; **H+Al** = 17 $mmol_c$/ dm^3; **SB** = 24,4 $mmol_c$/ dm^3; **pH** em $CaCl_2$ = 6,5			
Fertilizante	**Milho**	**Soja**	**Feijão**
Ureia	68,2 Kg/ha = 170 mg/vaso	-	-
Superfosfato Simples	875 Kg/ha = 2,18 g/vaso	625 Kg/ha = 1,56 g/vaso	625 Kg/ha = 1,56 g/vaso
Cloreto de Potássio	103,6 Kg/ha = 259 mg/vaso	165,6 Kg/ha = 414 mg/vaso	165,6 Kg/ha = 414 mg/vaso

Cada vaso recebeu 5 a 6 sementes e após a germinação foi feito um desbaste para que restassem apenas três plantas por vaso.

O suprimento de água foi realizado manualmente de acordo com a necessidade hídrica das plantas. Dentro de cada cultura, a cada irrigação, todos os vasos receberam a mesma quantidade de água, que variou de 100 a 300 mL por vaso.

O inóculo utilizado foi na forma de suspensão, que foi preparada a partir dos isolados crescidos em arroz colonizado e que encontravam-se mantidos em freezer a -20 ºC. Foram pesados 200 g de arroz colonizado de cada um dos isolados. Cada amostra foi acondicionada em béqueres identificados e foi lavada em 500 mL de solução estéril de Tween 80 a 0,1%, misturando o arroz e a solução com auxílio de um bastão de vidro para que a liberação de conídios dos grãos fosse a maior possível. A mistura foi então peneirada em peneira fina, apenas para separação dos grãos.

Foi realizada uma contagem em câmara de Neubauer dos conídios em suspensão e todas tiveram concentração ajustada para a ordem de 10^8 conídios/ mL. Cada vaso

recebeu 20 mL de suspensão. Duas inoculações foram realizadas, ambas no solo, a primeira na semeadura e a segunda 15 dias após a semeadura.

Além disso, uma alíquota de 1 mL da suspensão padronizada foi diluída serialmente em solução de Tween a 0,1% para a ordem de 10^6 conídios/mL e inoculada em placas de Petri 60 x 15 mm com ágar batata dextrose para avaliação da viabilidade dos conídios. Cada placa foi semeada por espalhamento com 100 µL da diluição com auxílio de uma alça de Drigalsky. Foram preparadas três placas para cada isolado.

A leitura do teste, avaliando o número de conídios com tubo germinativo, foi realizada após 17 horas de incubação a 26 ºC em estufa microbiológica.

O teste foi realizado por um período de 30 dias para as três culturas. Ao final desse período, os vasos foram desmontados e foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Altura das plantas: medidas de altura foram tomadas do ápice ao colo para as plantas de soja e feijão e do ápice da terceira folha ao colo para as plantas de milho.
- Massa seca da parte aérea: Após a medição da altura, as plantas foram retiradas dos vasos e a parte aérea foi separada da raiz e colocada em sacos de papel semi-kraft devidamente identificados para cada amostra. As amostras de parte aérea foram secas em estufa de ventilação forçada por 72 a 96 horas a 65 ºC e depois pesadas em balança semi-analítica.
- Massa seca da raiz: A raiz separada da parte aérea foi lavada e também acondicionada em sacos de papel semi-kraft. As amostras foram secas em estufa de ventilação forçada por 72 a 96 horas a 65 ºC e depois pesadas em balança semi-analítica.
- Massa seca total: Obtida pela soma dos valores de massa seca da parte aérea e de raiz.
- Fósforo no solo rizosférico: Na desmontagem dos vasos, uma amostra de solo rizosférico foi coletada de cada vaso e utilizada para avaliação do teor de fósforo no mesmo. A metodologia aplicada foi a de determinação de fósforo em resina por espectrofotometria (Raij et al., 2001).

- Fósforo e nitrogênio na planta: As amostras de parte aérea utilizadas para a determinação de massa seca foram moídas e em seguida utilizadas para a determinação dos teores de fósforo e nitrogênio. A determinação dos teores de fósforo foi realizada mediante digestão nítrico-perclórica seguida de análise espectrofotométrica (Malavolta et al., 1989), e dos teores de nitrogênio por digestão sulfúrica seguida de titulometria (Malavolta et al., 1989).
- Fósforo e nitrogênio na raiz: As amostras de raíz utilizadas para a determinação de massa seca foram moídas e em seguida utilizadas para a determinação dos teores de fósforo e nitrogênio. As metodologias aplicadas foram as mesmas utilizadas para as amostras de parte aérea.

O experimento foi realizado na forma de um delineamento inteiramente casualizado contando com quatro repetições (1 repetição = 1 vaso), sendo que cada vaso continha 3 plantas. Além dos tratamentos teste, sendo a inoculação de cada isolado considerada como um tratamento, em cada cultura foi preparado um tratamento controle que não recebeu qualquer inoculação fúngica.

Os dados referentes aos parâmetros avaliados foram submetidos a uma análise de variância seguida da aplicação do teste de Duncan a 5% de probabilidade para comparação das médias. Todas as análises foram executadas utilizando-se o software Agroestat (Barbosa e Maldonado, 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e preservação dos fungos

Um total de 211 fungos foram obtidos (Tabela 7) a partir do isolamento realizado, incluindo diversos gêneros de interesse agrícola, como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Curvularia,* entre outros, além dos isolados morfologicamente correspondentes ao gênero *Purpureocillium*. A cada isolado foi atribuído um código numérico precedido da sigla LSM (Laboratory of Soil Microbiology), e os isolados de interesse serão assim mencionados durante a apresentação dessa seção, por exemplo, LSM 1.

Todos os isolados foram purificados, caracterizados morfologicamente mediante o preparo de lâminas e visualização em microscópio óptico e encontram-se preservados em ágar malte inclinado em geladeira e por ultracongelamento no Laboratório de Microbiologia do Solo (LSM) sob responsabilidade do Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo.

Dos 211 isolados obtidos, 30 corresponderam morfologicamente a fungos classificados como *Purpureocillium* e foram utilizados na continuidade desse estudo. Na Tabela 7 estão destacados os códigos desses isolados bem como a amostra de solo e o meio de cultura de origem dos mesmos. Nota-se que o meio seletivo DOC2, descrito para o isolamento de *B. bassiana* (Shimazu e Sato, 1996)*,* foi o mais efetivo para a obtenção de fungos do gênero de interesse. A partir do meio BDA com cloreto de sódio apenas cinco isolados de *Purpureocillium* foram recuperados. Analisando a Tabela 7 é possível observar que houve a predominância do isolamento de representantes dos gêneros *Trichoderma*, *Penicillium* e *Aspergillus* a partir desse meio, indicando que a presença dos compostos antifúngicos PCNB e Benomil na composição do mesmo, como indicado em Mitchell et al. (1987), poderia ter apresentado um resultado mais eficiente para o isolamento de *Purpureocillium*, uma vez que o crescimento desses fungos altamente esporulantes seria inibido. Apenas um isolado de *Purpureocillium* foi obtido a partir do

meio de Martin, demonstrando que este não é um meio favorável ao isolamento de fungos desse gênero.

Tabela 7. Relação dos 211 isolados fúngicos obtidos a partir das amostras de solo dos quatro quadrantes amostrados. São demonstrados os códigos LSM atribuídos aos isolados, a amostra do quadrante correspondente ao seu isolamento, o meio de cultura do qual foram isolados, bem como sua identificação morfológica obtida por análise macro e microscópica. Isolados morfologicamente identificados como *Purpureocillium* são apresentados em destaque.

CÓDIGO LSM	AMOSTRA ISOLAMENTO	MEIO DE CULTURA	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA
1	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Aspergillus* cf. *niger*
2	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.
3	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Aspergillus* cf. *niger*
4	Quadrante 1	BDA + NaCl	fungo filamentoso hialino
5	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
6	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Purpureocillium sp.*
7	Quadrante 1	BDA + NaCl	fungo filamentoso hialino
8	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
9	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Aspergillus* cf. *niger*
10	Quadrante 1	BDA + NaCl	fungo filamentoso hialino
11	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.
12	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.
13	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Purpureocillium sp.*
14	Quadrante 1	BDA + NaCl	*Purpureocillium sp.*
15	Quadrante 1	BDA + NaCl	fungo filamentoso hialino
16	Quadrante 1	BDA + NaCl	fungo filamentoso hialino
17	Quadrante 1	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
18	Quadrante 1	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*

19	Quadrante 1	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
20	Quadrante 1	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
21	Quadrante 1	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
22	Quadrante 1	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
23	Quadrante 1	Meio DOC2	*Colletotrichum* sp.
24	Quadrante 1	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
25	Quadrante 1	Meio DOC2	*Aspergillus* sp.
26	Quadrante 1	Meio DOC2	*Phialophora* sp.
27	Quadrante 1	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
28	Quadrante 1	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
29	Quadrante 1	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
30	Quadrante 1	Meio de Martin	*Aspergillus* cf. *niger*
31	Quadrante 1	Meio de Martin	Mucoromycotina
32	Quadrante 1	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
33	Quadrante 1	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
34	Quadrante 1	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
35	Quadrante 1	Meio de Martin	Fungo filamentoso amarelado
36	Quadrante 1	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
37	Quadrante 1	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
38	Quadrante 1	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
39	Quadrante 1	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
40	Quadrante 1	Meio de Martin	Fungo filamentoso esverdeado
41	Quadrante 1	Meio de Martin	Fungo filamentoso melanizado
42	Quadrante 1	Meio de Martin	*Purpureocillium sp.*
43	Quadrante 1	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
44	Quadrante 1	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
45	Quadrante 1	Meio de Martin	*Pestalotia* sp.
46	Quadrante 1	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino

47	Quadrante 1	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
48	Quadrante 1	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
49	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Aspergillus* cf. *niger*
50	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
51	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.
52	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
53	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
54	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Mucor* sp.
55	Quadrante 2	BDA + NaCl	Levedura creme
56	Quadrante 2	BDA + NaCl	fungo filamentoso hialino
57	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
58	Quadrante 2	BDA + NaCl	Levedura negra
59	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Purpureocillium sp.*
60	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
61	Quadrante 2	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
62	Quadrante 2	BDA + NaCl	*Purpureocillium sp.*
63	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
64	Quadrante 2	Meio DOC2	*Fusarium* sp.
65	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
66	Quadrante 2	Meio DOC2	Fungo filamentoso hialino
67	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
68	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
69	Quadrante 2	Meio DOC2	*Fusarium* sp.
70	Quadrante 2	Meio DOC2	*Trichoderma* sp.
71	Quadrante 2	Meio DOC2	Fungo filamentoso hialino
72	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
73	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
74	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
75	Quadrante 2	Meio DOC2	*Fusarium* sp.
76	Quadrante 2	Meio DOC2	Fungo filamentoso hialino

77	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
78	Quadrante 2	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
79	Quadrante 2	Meio DOC2	*Penicillium* sp.
80	Quadrante 2	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
81	Quadrante 2	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
82	Quadrante 2	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
83	Quadrante 2	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
84	Quadrante 2	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
85	Quadrante 2	Meio de Martin	*Curvularia* sp.
86	Quadrante 2	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
87	Quadrante 2	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
88	Quadrante 2	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
89	Quadrante 2	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
90	Quadrante 2	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
91	Quadrante 2	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
92	Quadrante 2	Meio de Martin	Fungo filamentoso melanizado
93	Quadrante 2	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
94	Quadrante 2	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
95	Quadrante 2	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
96	Quadrante 2	Meio de Martin	*Bipolaris* sp.
97	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Aspergillus* cf. *niger*
98	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
99	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
100	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
101	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
102	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
103	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
104	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
105	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.

106	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.
107	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
108	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
109	Quadrante 3	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
110	Quadrante 3	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
111	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
112	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Beauveria* sp.
113	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Aspergillus* sp.
114	Quadrante 3	BDA + NaCl	Teratosphaeriaceae
115	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
116	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
117	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Penicillium*sp.
118	Quadrante 3	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
119	Quadrante 3	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
120	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
121	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
122	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
123	Quadrante 3	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
124	Quadrante 3	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
125	Quadrante 3	Meio DOC2	Fungo filamentoso hialino
126	Quadrante 3	Meio DOC2	*Curvularia* sp.
127	Quadrante 3	Meio DOC2	*Trichoderma* sp.
128	Quadrante 3	Meio DOC2	*Fusarium* sp.
129	Quadrante 3	Meio DOC2	*Fusarium* sp.
130	Quadrante 3	Meio DOC2	Fungo filamentoso melanizado
131	Quadrante 3	Meio DOC2	Fungo filamentoso hialino
132	Quadrante 3	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
133	Quadrante 3	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
134	Quadrante 3	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.

135	Quadrante 3	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
136	Quadrante 3	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
137	Quadrante 3	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
138	Quadrante 3	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
139	Quadrante 3	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
140	Quadrante 3	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
141	Quadrante 3	Meio de Martin	Fungo filamentoso esverdeado
142	Quadrante 3	Meio de Martin	*Trichoderma* sp.
143	Quadrante 3	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
144	Quadrante 3	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
145	Quadrante 3	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
146	Quadrante 3	Meio de Martin	*Penicillium* cf. *citrinum*
147	Quadrante 3	Meio de Martin	*Aspergillus* cf*. niger*
148	Quadrante 3	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
149	Quadrante 3	Meio de Martin	*Aspergillus* sp.
150	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
151	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
152	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
153	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.
154	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Aspergillus* cf. *niger*
155	Quadrante 4	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
156	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Aspergillus* cf*. niger*
157	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
158	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
159	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.
160	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Penicillium* sp.
161	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
162	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Aspergillus* cf. *niger*
163	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.

164	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Trichoderma* sp.
165	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Beauveria* sp.
166	Quadrante 4	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
167	Quadrante 4	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
168	Quadrante 4	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
169	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Fusarium* sp.
170	Quadrante 4	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
171	Quadrante 4	BDA + NaCl	Pleosporales
172	Quadrante 4	BDA + NaCl	Fungo filamentoso hialino
173	Quadrante 4	BDA + NaCl	Fungo filamentoso amarelado
174	Quadrante 4	BDA + NaCl	*Aspergillus* sp.
175	Quadrante 4	Meio DOC2	*Purpureocillium* sp.
176	Quadrante 4	Meio DOC2	*Curvularia* sp.
177	Quadrante 4	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
178	Quadrante 4	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
179	Quadrante 4	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
180	Quadrante 4	Meio DOC2	*Cladosporium* sp.
181	Quadrante 4	Meio DOC2	Fungo filamentoso melanizado
182	Quadrante 4	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
183	Quadrante 4	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
184	Quadrante 4	Meio DOC2	*Penicillium* sp.
185	Quadrante 4	Meio DOC2	Fungo filamentoso amarelado
186	Quadrante 4	Meio DOC2	Fungo filamentoso melanizado
187	Quadrante 4	Meio DOC2	*Purpureocillium sp.*
188	Quadrante 4	Meio DOC2	*Beauveria* sp.
189	Quadrante 4	Meio DOC2	*Trichoderma*sp.
190	Quadrante 4	Meio de Martin	*Trichoderma sp.*
191	Quadrante 4	Meio de Martin	*Trichoderma sp.*

192	Quadrante 4	Meio de Martin	*Aspergillus* sp.
193	Quadrante 4	Meio de Martin	Fungo filamentoso melanizado
194	Quadrante 4	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
195	Quadrante 4	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
196	Quadrante 4	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
197	Quadrante 4	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
198	Quadrante 4	Meio de Martin	*Trichoderma*
199	Quadrante 4	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
200	Quadrante 4	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
201	Quadrante 4	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
202	Quadrante 4	Meio de Martin	*Cladosporium* sp.
203	Quadrante 4	Meio de Martin	*Aspergillus* cf*. niger*
204	Quadrante 4	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
205	Quadrante 4	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
206	Quadrante 4	Meio de Martin	*Fusarium* sp.
207	Quadrante 4	Meio de Martin	*Aspergillus* cf. *niger*
208	Quadrante 4	Meio de Martin	Fungo filamentoso hialino
209	Quadrante 4	Meio de Martin	*Trichoderma*
210	Quadrante 4	Meio de Martin	*Penicillium* sp.
211	Quadrante 4	Meio de Martin	*Purpureocillium sp.*

*BDA + NaCl = ágar batata dextrose adicionado de cloreto de sódio

*A ausência de caracteres morfológicos suficientes dificultou a identificação morfológica de alguns isolados. Assim, estes foram devidamente classificados como fungos filamentosos ou leveduras e algum aspecto morfológico marcante, por exemplo, fungo filamentoso melanizado (micélio filamentoso escuro com depósito de melanina na parede celular)

4.2 Análise molecular e filogenética

As Figuras 1, 2 e 3 em sequência representam as árvores filogenéticas construídas para os genes ITS, β-tubulina e a árvore das sequências concatenadas, respectivamente.

Em relação à análise do gene ITS, quando comparadas as sequências dos isolados desse estudo com as sequências depositadas no Genbank do NCBI, a maioria delas, precisamente 25 das 30 sequências, apresentou similaridade de 100% com sequências depositadas identificadas como *Purpureocillium lilacinum*. Das cinco restantes, quatro deram resultado de similaridade de 100% com sequências de *Purpureocillium lavendulum* e uma sequência correspondeu, também com a mesma porcentagem de similaridade, a sequências de *Metarhizium marquandii*. Já para o gene de β-tubulina, 29 das 30 sequências apresentaram maior similaridade com sequências de *Purpureocillium lilacinum,* e a última sequência também apresentou correspondência com *Metarhizium marquandii*.

Para a elaboração das árvores, além da utilização de sequências devolvidas pelo banco de dados como as mais similares, incluindo apenas sequências publicadas e de culturas depositadas em coleções de culturas, foram recolhidas do Genbank e da base de dados do CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Holanda – referência mundial em estudos de taxonomia de fungos), sequências das linhagens tipo de cada espécie. Além de sequências das possíveis espécies compatíveis com os isolados desse estudo, foram recolhidas sequências de espécies próximas e de espécies pertencentes a famílias próximas.

A análise do filograma do gene ITS (Figura 1) revela que a identificação foi consistente para todos os 30 isolados, sendo que os isolados LSM 18, 42, 73 e 211 correspondem a linhagens de *Purpureocillium lavendulum*, o isolado LSM 68 corresponde a uma linhagem de *Metarhizium marquandii* e os demais isolados correspondem a *Purpureocillium lilacinum*. O mesmo ocorre para o filograma de β-tubulina (Figura 2), apenas com a ressalva de que não existem sequências desse gene para *P. lavendulum*, o que deixa implícita a confirmação para os isolados LSM 18, 42, 73 e 211. Apesar da

ausência de sequências dessa espécie, pode-se notar como esses quatro isolados formam um grupo externo às linhagens de *P. lilacinum*, exatamente como no filograma de ITS, indicando que se tratam de uma espécie próxima. A análise concatenada das sequências de ITS e β-tubulina (Figura 3) confirma o padrão observado para a análise dos dois genes separados, confirmando a fidedignidade das identificações.

Luangsa-ard et al., 2011 propuseram a criação do gênero *Purpureocillium* para acomodar *Paecilomyces lilacinus*, sugerindo a combinação *Purpureocillium lilacinum*. Como já mencionado, diversos estudos similares têm sido realizados com o intuito de reorganizar a questão das espécies de *Paecilomyces* uma vez que o gênero é polifilético e apresenta representantes em diversas classes. A espécie tipo do gênero, *Paecilomyces variotii* (Bainier, 1907) pertence à família Aspergillaceae. *P. lilacinum* está agrupado na família Ophiocordycipitaceae (Sung et al. 2007).

A espécie *P. lavendulum* foi recentemente descrita (Perdomo et al., 2013) após uma análise polifásica de linhagens caracterizadas como *P. lilacinum*. Essa espécie é muito próxima a *P. lilacinum*, sendo agrupada na mesma família, Ophiocordycipitaceae. Diferente de *P. lilacinum*, *P. lavendulum* não apresenta crescimento a 35ºC, apresenta a produção de um pigmento amarelado que se difunde no meio de cultura e, seus conídios são subglobosos ou lemoniformes (Perdomo et al., 2013).

Já para a espécie *Metarhizium marquandii*, até 2014 era classificada como *Paecilomyces marquandii*. Kepler et al. (2014) transferiram a espécie para o gênero *Metarhizium*, pois estudos anteriores, como o de Luangsa-ard et al. (2011) já revelavam o agrupamento genético dessa espécie junto a membros da família Clavicipitaceae, à qual pertence o gênero *Metarhizium*.

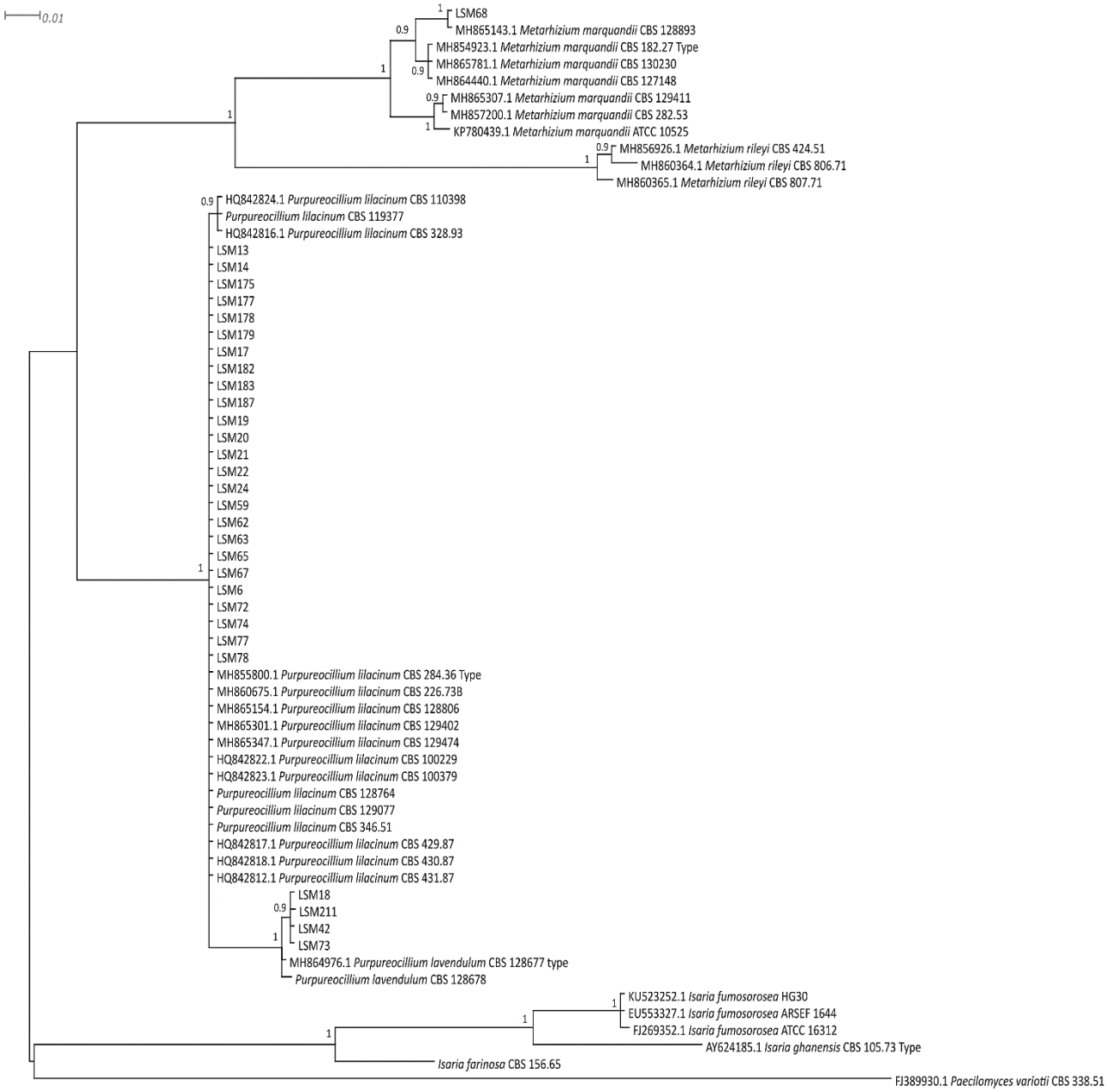


Figura 1. Análise filogenética Bayesiana da região ITS do DNA ribossomal. As sequências do estudo são indicadas pelo código LSM. Para as demais sequências, os códigos anteriores ao nome específico referem-se ao número de acesso no Genbank (NCBI). Sequências sem número de acesso correspondem às retiradas da base de dados do CBS.

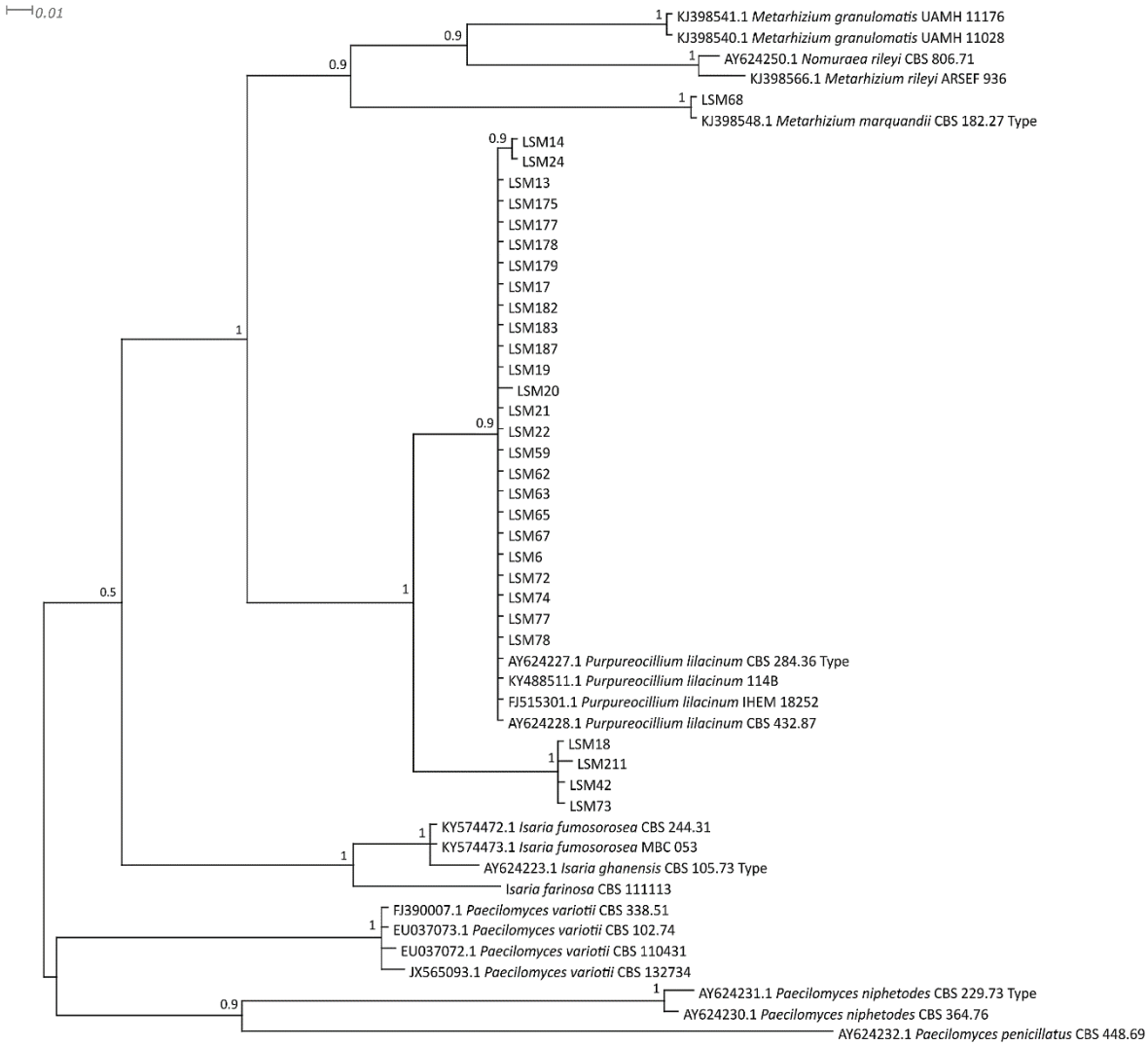


Figura 2. Análise Bayesiana de sequências de β-tubulina dos 30 isolados utilizados nesse estudo. As sequências do estudo são indicadas pelo código LSM. Para as demais sequências, os códigos anteriores ao nome específico referem-se ao número de acesso no Genbank (NCBI). Sequências sem número de acesso correspondem às retiradas da base de dados do CBS.

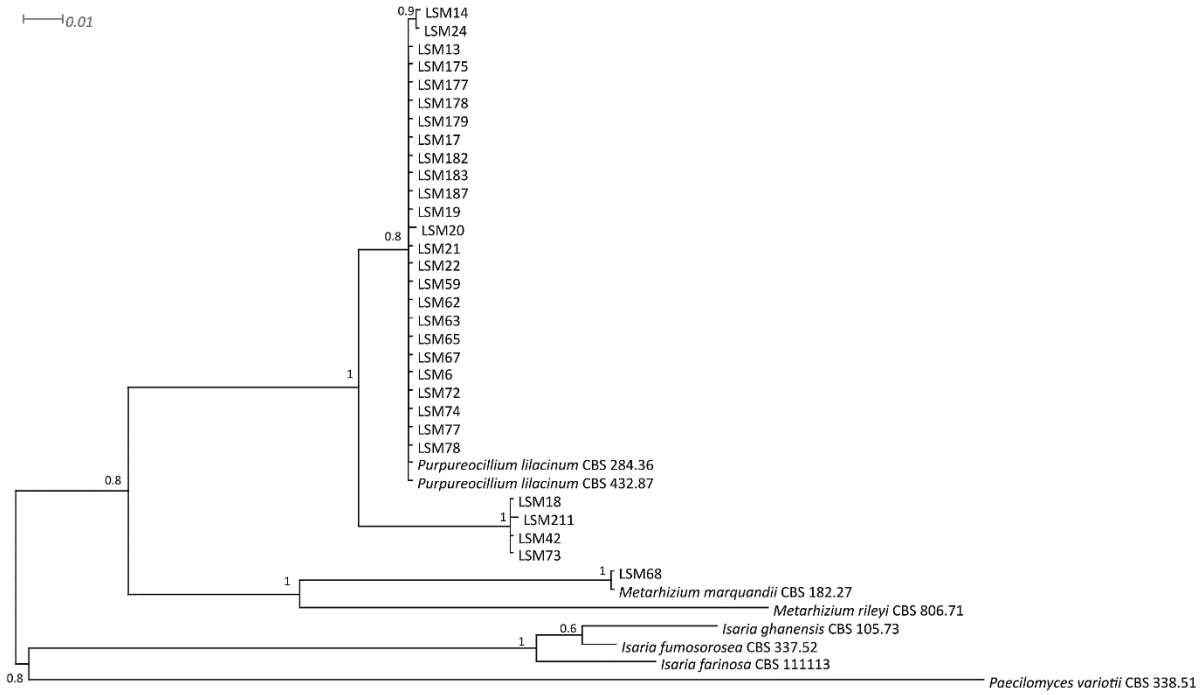


Figura 3. Análise filogenética Bayesiana das sequências da região ITS e β-tubulina concatenadas.

4.3 Triagem *in vitro* do potencial de promoção do crescimento de plantas

4.3.1 Solubilização de fósforo

Os resultados do teste de solubilização de fósforo com fluorapatita como única fonte desse nutriente podem ser observados no gráfico da Figura 4.

A fluorapatita é um fosfato de rocha de ocorrência natural abundante nos solos brasileiros e de diversas regiões no mundo. Além disso, trabalhos como o de Fontaine et al. (2016) reportam que muitos micro-organismos capazes de solubilizar o fosfato tricálcico, mais comumente utilizado em ensaios *in vitro*, não apresentam a habilidade de solubilizar outros fosfatos como a fluorapatita, isso porque o fosfato tricálcico é um mineral anamorfo, enquanto a fluorapatita é um mineral cristalino oriundo de rochas ígneas e que, assim como hidroxiapatita e clorapatita, são muito mais resistentes à ação microbiana.

A leitura do gráfico indica o isolado LSM 24 de *P. lilacinum* como o melhor solubilizador de fósforo. Os isolados LSM 14 e 65, também da espécie *P. lilacinum* também apresentaram boa solubilização, porém esta na diferiu significativamente em relação aos demais isolados, exceto para o isolado LSm 73 de *P. lilacinum* que apresentou a menor capacidade de solubilização dentre todos os isolados testados.

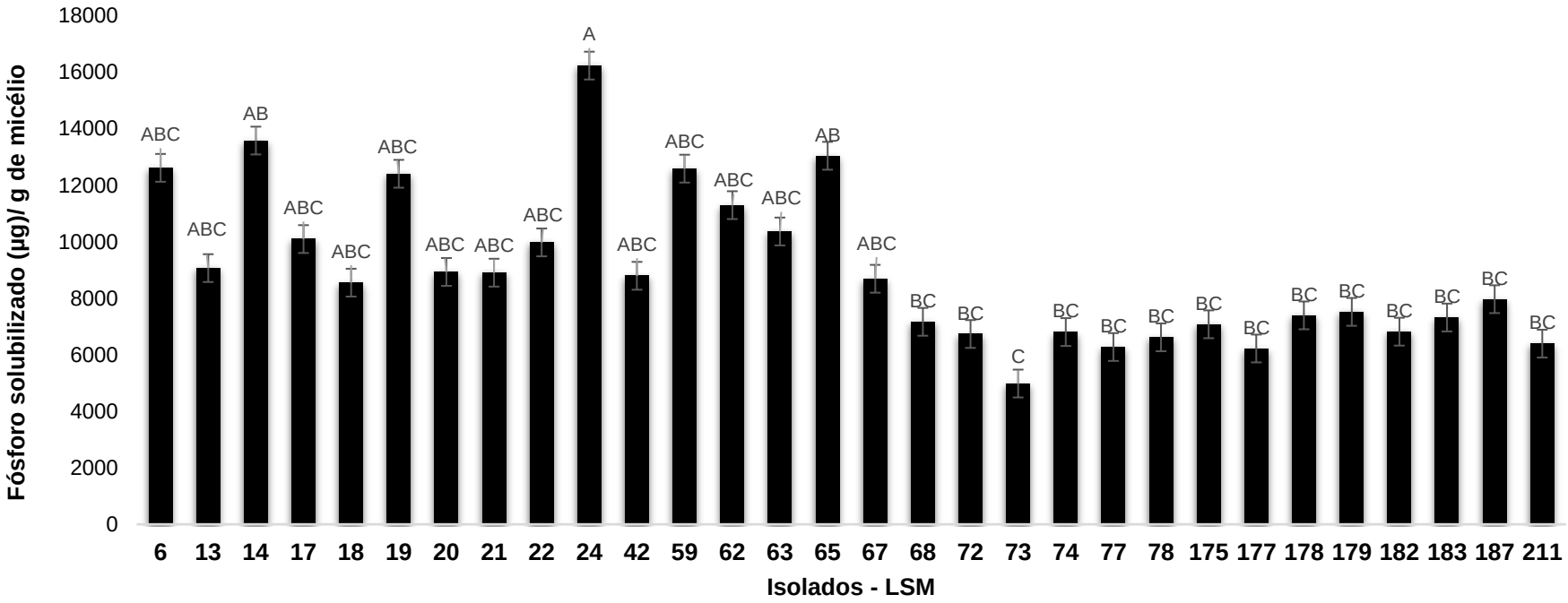


Figura 4. Representação gráfica da quantidade de fluorapatita solubilizada pelos 30 isolados testados. Letras iguais indicam semelhança estatística das médias dos valores de solubilização pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3.2 Produção de AIA

A produção de fitormônios é outra característica de interesse quando se trata do estudo de micro-organismos promotores do crescimento de plantas. A metodologia com o meio DYGS foi proposta por Kuss et al. (2007) e modificada por Milani (2017) para análise da produção de AIA por isolados bacterianos. A metodologia demonstrou ser eficiente para detectar a produção de AIA pelos isolados de *Purpureocillium* spp. E *M. marquandii* e os resultados obtidos encontram-se apresentados no gráfico da Figura 5.

Como pode ser observado, o isolado LSM 65 de *P. lilacinum* destacou-se de forma muito significativa nesse teste, seguido pelo isolado LSM 62 também de *P. lilacinum*. Ambos sintetizaram AIA em quantidade significativamente superior em relação aos demais isolados. Em números, depois desses dois isolados, LSM 68 (*M. marquandii*), 183 e 179 (*P. lilacinum*), respectivamente, foram os que mais produziram AIA. Eles não difereriram significativamente em relação aos demais isolados, exceto para o isolado LSM 187 de *P. lilacinum* que foi o pior produtor de AIA.

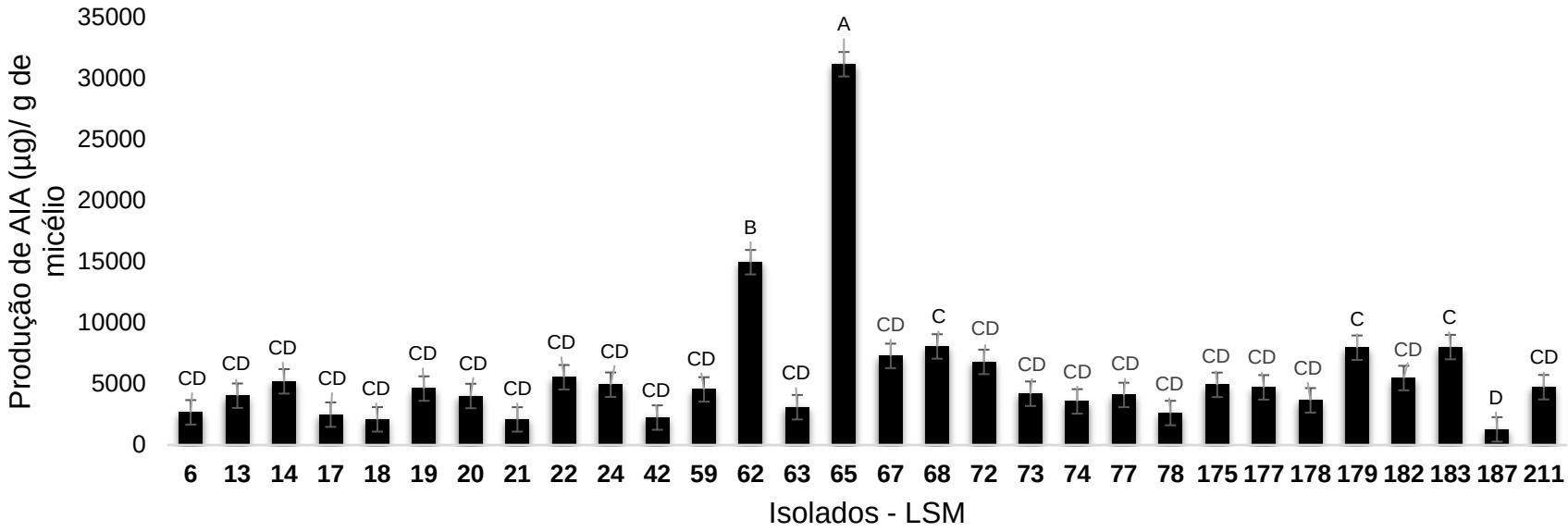


Figura 5. Representação gráfica da produção de AIA pelos 30 isolados testados. Letras iguais indicam semelhança estatística das medias dos valores de AIA sintetizado pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3.3 Produção de quitinases

O teste em meio basal demonstrou ser efetivo para detectar a produção de quitinases pelos isolados de *Purpureocillium* spp. e *M. marquandii* testados nesse estudo. Como pode ser observado na Figura 6, foi possível realizar a distinção da produção de quitinases e a mesma foi classificada para os isolados como baixa, média ou alta (Figuras 6 A, B e C respectivamente).

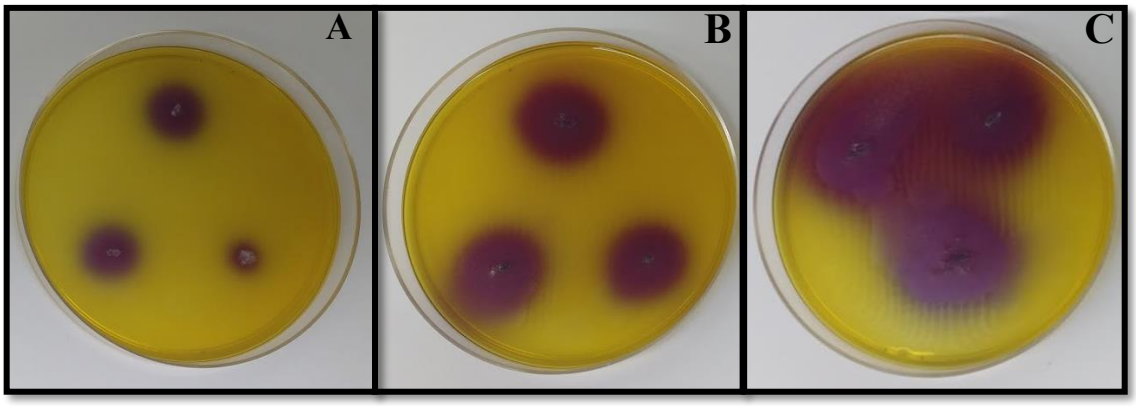


Figura 6. Inoculação em meio basal contendo quitina coloidal e indicador púrpura de bromocresol. A alteração de coloração do meio de cultura de amarelo para violeta indica a produção de quitinases pelos isolados. Nota-se a diferença na produção enzimática de cada isolado pela diferença no tamanho dos halos formados.

Na Tabela 8 está disposta a descrição da atividade de produção de quitinases para cada isolado no meio basal. Como pode-se observar, os isolados LSM 24, 175, 177, 183 e 187 de *P. lilacinum* foram os únicos que apresentaram atividade de produção de quitinases classificada como alta.

P. lilacinum é reconhecido pelo seu elevado potencial nematicida, o que envolve a produção de grande quantidade de enzimas, principalmente quitinases. Assim, pode ser considerada incomum a produção pelos isolados testados nesse estudo, uma vez que a maioria deles (20 dentre 25) apresentaram uma produção média ou baixa dessas enzimas. Para *P. lavendulum* não há nenhum relato na literatura sobre qualquer potencial de produção enzimática, incluindo quitinases. Poucos estudos envolvendo aplicações

com *M. marquandii* foram encontrados na literatura e nenhum deles envolve sua caracterização com relação à produção de quitinases.

Tabela 8. Descrição da produção de quitinasesem meio basal para os 30 isolados de *Purpureocillium* spp. e *M. marquandii* utilizados nesse estudo.

Cód. LSM	Prod. quitinases	Cód. LSM	Prod. quitinases	Cód. LSM	Prod. quitinases
6	Baixa	42	Média	77	Média
13	Baixa	59	Média	78	Média
14	Média	62	Média	175	Alta
17	Média	63	Baixa	177	Alta
18	Baixa	65	Baixa	178	Média
18	Média	67	Baixa	179	Média
20	Média	68	Média	182	Média
21	Média	72	Média	183	Alta
22	Média	73	Média	187	Alta
24	Alta	74	Média	211	Média

4.4 Seleção dos fungos para o teste em casa de vegetação

Os testes de triagem realizados envolveram a avaliação do potencial direto (solubilização de fósforo e produção de AIA) e indireto (produção de quitinases) de promoção de crescimento de plantas pelos isolados. Os dois primeiros testes mencionados refletem variáveis diretamente relacionadas à promoção de crescimento, enquanto a produção de quitinases é uma característica indiretamente relacionada à promoção de crescimento, pois está associada ao combate a patógenos.

Os isolados LSM 24, 14 e 65 de *P. lilacinum* foram, respectivamente, os melhores solubilizadores de fósforo. Apesar de a principal relevância estatística estar associada ao isolado LSM 24, os outros dois exibiram relevância estatística da solubilização de fósforo em relação ao isolado caracterizado como o pior solubilizador, o isolado LSM 73 (Figura 4).

Para o teste de produção de AIA, os isolados LSM 65 e 62 tiveram o maior destaque. Porém, utilizando-se da mesma lógica levantada para a solubilização de fósforo, os isolados LSM 68 (*M. marquandii*), 179 e 183 (*P. lilacinum*) foram selecionados por sua relevância estatística na produção e AIA em relação ao isolado com pior desempenho nesse teste, LSM 187 (Figura 5).

Em relação à produção de quitinases, os isolados LSM 24, 175, 177, 183 e 187 de *P. lilacinum* apresentaram atividade considerada alta.

Segundo os critérios de seleção definidos, deveriam ser selecionados os isolados de destaque em mais de um dos testes. Nesse caso, o isolado LSM 24, destaque na solubilização de fósforo e na produção de quitinases; o isolado LSM 65, na produção de AIA e na solubilização de fósforo; e o isolado LSM 183 na produção de quitinases e de AIA.

Os isolados LSM 14, 62, 68, 175,177, 179 e 187 destacaram-se apenas em uma das três características avaliadas. Assim, considerando o segundo critério de seleção definido, mediante a dificuldade de testar todos sete isolados juntamente aos três enquandrados no primeiro critério, optou-se pela seleção dos isolados LSM 14, 62, 68 e 179 que apresentaram maior potencial nas características de promoção direta de crescimento: a solubilização de fósforo (LSM 14) e a produção de AIA (LSM62, 68 e 179).

4.5 Teste de produção dos isolados em arroz parboilizado

Uma grande dificuldade enfrentada no campo dos bioinoculantes é justamente a produção do inóculo. Para bactérias, que são seres unicelulares e que tem um curto tempo de geração, sua produção em meios líquidos convencionais ou alternativos é

bastante utilizada, rápida e bem caracterizada. No caso de fungos filamentosos, o mesmo não acontece. Sua produção em meio líquido é difícil e muito restrita, o tempo de crescimento é maior, e os substratos alternativos de crescimento são poucos.

Um dos substratos alternativos mais difundidos para o cultivo de fungos filamentosos é o arroz parboilizado. Há controvérsias sobre seu uso, pois trata-se de uma fonte de alimento humana, e, por isso, muitos questionam o seu uso nesse tipo de processo. O arroz parboilizado não é unanime para o crescimento de qualquer espécie ou isolado fúngico, entretanto, trata-se de um processo bem estabelecido e já bastante difundido entre empresas, que o utilizam para o cultivo de fungos como *M. anisopliae*, *B. bassiana*, *Trichoderma asperellum*, entre outros.

Assim, o conhecimento da capacidade de os isolados selecionados nesse estudo serem cultivados no arroz parboilizado é de grande interesse, pensando a longo prazo na possibilidade de poderem ser aplicados como bioinoculantes. Os resultados obtidos para o teste foram muito satisfatórios, uma vez que os sete isolados selecionados, LSM 14, 24, 62, 65, 179 e 183 de *P. lilacinum* e o isolado 68 de *M. marquandii*, apresentaram bom crescimento e esporulação no arroz parboilizado, como demonstrado para alguns isolados na Figura 7.



Figura 7. Isolados 183 (*P. lilacinum*), 68 (*M. marquandii*) e 24 (*P. lilacinum*) produzidos em arroz parboilizado.

4.6 Teste em casa de vegetação com os isolados selecionados nas culturas de soja, milho e feijão

A Figura 8 ilustra o teste de germinação realizado para as sementes de milho soja e feijão. Para as três culturas, 100% de viabilidade para a germinação foi observada.



Figura 8. Teste de germinação para sementes de milho, soja e feijão, respectivamente. As sementes foram dispostas em vermiculita úmida no interior de placas de Petri e mantidas em ambiente sombreado a temperature ambiente.

A Tabela 9 apresenta os dados obtidos para os testes de viabilidade dos inóculos utilizados nas culturas. Como pode ser observado, a viabilidade estava igual ou próxima de 100% para os conídios das suspensões de todos os isolados testados nos dois tempos de inoculação. Esse resultado demonstra a eficiência da produção dos fungos testados em arroz parboilizado.

Tabela 9. Percentual de viabilidade dos conídios das suspensões utilizadas no experimento em casa de vegetação para cada um dos isolados testados.

Inóculo (Isolado)	Viabilidade inoculação tempo zero	Viabilidade inoculação 15 dias
LSM14	100%	100%
LSM 24	99%	98%
LSM 62	99%	99%
LSM 65	100%	100%
LSM 68	99%	99%
LSM 179	99%	98%
LSM 183	100%	99%

As Tabelas 10, 11 e 12 resumem os resultados obtidos da análise estatística dos parâmetros avaliados.

Como pode ser observado, para cultura do milho (Tabela 10), o isolado LSM 65 de *P. lilacinum* proporcionou maior altura da parte aérea das plantas, entretanto, não houve efeito de aumento significativo nos valores de massa seca pela inoculação dos fungos em relação ao controle.

No caso dos teores de fósforo, para o solo o isolado LSM 24 de *P. lilacinum* elevou significativamente os níveis desse nutriente em relação ao controle (66,7%) e aos demais isolados. Na parte aérea e nas raízes não houve diferença significativa em relação ao incremento dos teores desse nutriente por nenhum dos isolados em relação ao controle.

Em alguns casos, foram observadas quantidades de fósforo significativamente inferiores em relação ao controle, como no caso do isolado LSM 14 para a parte áerea, e dos isolados LSM 68, 179 e 183 para as raízes. Nesses casos, acredita-se que o momento da finalização do experimento tenha coincidido com um momento em que uma maior quantidade de fósforo estivesse imobilizada.

Sabe-se que os nutrientes passam por picos de mineralização e imobilização no solo, e que esse processo está intimamente associado à atividade microbiana (Stamford et al., 2005). É o que ocorre com nutrientes como o fósforo, que após ser solubilizado e mineralizado fica disponível na solução do solo para ser absorvido pelas plantas, pela propria microbiota e por outros seres vivos como protozoários e nematoides. A fração não absorvida volta a ser imobilizada tornando-se indisponível, e, dessa forma, a

microbiota é estimulada a reiniciar os processos de solubilização e mineralização (Richardson e Simpson, 2011). Assim, considerando tais informações e os resultados obtidos, conclui-se que no momento da análise havia grande quantidade de fósforo imobilizada no solo e não considerou-se a hipótese de que a inoculação dos fungos tenha prejudicado o fornecimento desse nutriente via impedimento de sua solubilização e/ou mineralização.

Não foram detectadas diferenças significativas para os teores de nitrogênio na parte aérea, apesar de o controle apresentar os menores valores observados. Já nas raízes, todos os isolados, exceto LSM 14, aumentaram os teores de nitrogênio significativamente em relação ao controle, sendo que os isolados LSM 65 e 24 destacaram-se, elevando os níveis desse nutriente nas raízes em aproximadamente 40% em relação ao controle.

Os resultados observados na cultura do milho corroboram com o potencial *in vitro* descrito para os micro-organismos. O isolado LSM 65 foi selecionado por apresentar-se como o melhor produtor de AIA, além de apresentar-se como um bom solubilizador de fósforo, superado apenas pelos isolados LSM 24 e 14. Apesar de não se destacar dentre os parâmetros avaliados que envolvem a quantificação dos teores de fósforo, o isolado LSM 65 atuou de maneira significativa sobre o crescimento vegetativo da planta (altura da parte aérea), o que certamente está relacionado com seu principal potencial descrito nessa pesquisa, que é a produção de AIA, um fitormônio essencial e que juntamente a outros, como as citocicinas e giberelinas, atua na promoção do crescimento de plantas, e, além disso, pode apresentar efeitos benéficos atenuando os efeitos adversos relacionados a estresses abióticos como salinidade, falta de água, entre outros (Khan et al., 2004b).

No caso do isolado LSM 24, que apresentou-se como o melhor solubilizador de fósforo tendo como única fonte desse nutriente a fluorapatite, sua aplicação garantiu uma maior solubilização de fósforo, que pôde ser detectada no solo.

Tabela 10. Análise estatística dos parâmetros avaliados na cultura do milho em experimento em casa de vegetação. As letras comparam as médias das variáveis em cada um dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, seguida do teste de comparação de médias de Duncan a 5% de probabilidade (α = 0,05).

Tratamentos	Médias das variáveis avaliadas – Cultura de Milho								
	Altura da planta (cm)	Massa seca P.A. (g)	Massa seca Raiz (g)	Massa seca Total (g)	P solo (mg/dm3)	P (P.A.) g/kg	P (RAIZ) g/kg	N (P.A.) g/kg	N (RAIZ) g/kg
Controle	61,33 bc	3,50 ab	3,83 a	7,33 a	18,75 b	1,08 ab	1,43 a	15,90 a	8,30 c
LSM 14	58,10 cd	3,32 abc	3,46 ab	6,77 ab	21,75 b	0,98 b	1,23 a	15,78 a	9,33 bc
LSM 24	61,13 bc	3,61 ab	3,09 abc	6,69 ab	31,25 a	1,23 a	1,18 a	16,80 a	11,45 a
LSM 62	57,50 cd	2,85 bc	2,62 c	5,47 bc	18,00 b	1,13 ab	1,10 a	18,10 a	10,58 ab
LSM 65	70,04 a	4,04 a	3,15 abc	7,19 a	19,75 b	1,10 ab	1,30 a	17,50 a	11,55 a
LSM 68	53,17 de	2,99 bc	2,80 bc	5,79 bc	23,25 b	0,98 b	0,63 b	18,30 a	10,55 ab
LSM 179	66,42 ab	3,64 ab	2,68 bc	6,32 abc	17,75 b	1,08 ab	0,55 b	17,15 a	10,98 ab
LSM 183	47,98 e	2,60 c	2,46 c	5,06 c	22,75 b	0,98 b	0,48 b	17,43 a	10,38 ab
Teste F	12,82**	3,81**	3,32*	3,92**	2,81*	3,54**	7,26**	$0,74^{NS}$	2,99*
CV	6,6%	14,7%	16,9%	13,1%	24,3%	8,8%	28,2%	12,5%	12,2%

Teste F: * - Significância a 5% de probabilidade; ** - Significância a 1% de probabilidade; ^{NS} – Não significante

CV: Coeficiente de variação

P: Fósforo / N: Nitrogênio

P.A.: Parte aérea

Para a cultura do feijão (Tabela 11), a altura das plantas foi superior no tratamento controle, sendo significativamente superior em relação aos tratamentos que receberam os a inoculação dos isolados LSM 62,68 e 179. Não houve diferença significativa de incremento de biomassa pela inoculação dos fungos nas variáveis de massa seca.

Para os teores de fósforo, no solo nenhum dos tratamentos apresentou valores superiores ao controle nos níveis desse nutriente. Tal dado pode indicar a capacidade de solubilização pelos isolados, permitindo inferir que o fósforo foi solubilizado e absorvido pelas plantas, especialmente se observados os teores de fósforo significativamente superiores na parte aérea das plantas inoculadas com os isolados LSM 68 (*M. marquandii*), 179 e 183 (*P. lilacinum*) (79,2%, 75,5% e 94,3% a mais que o controle), demonstrando que, nestes casos, o nutriente foi retirado do solo e alocado na parte aérea das plantas. Nenhum dos tratamentos apresentou valores significativamente superiores no teor de fósforo nas raízes em relação ao controle.

Na cultura do feijão, nenhum dos isolados foi capaz de promover um incremento nos teores de nitrogênio na planta, parte aérea ou raízes, em relação ao controle, como ocorreu para o milho.

É interessante notar a diferença de comportamento dos isolados em diferentes culturas. Os resultados nas plantas de milho apresentaram coerência com os dados obtidos nas análises de bancada, onde os isolados LSM 65 e 24 apresentaram os melhores resultados para a produção de AIA e solubilização de fósforo, respectivamente, o que não aconteceu para a cultura do feijão. Para esta, os isolados LSM 68, 179 e 183, selecionados pela produção de AIA, foram os que apresentaram efeito sobre as plantas em relação ao acúmulo de fósforo na parte aérea.

Tabela 11. Análise estatística dos parâmetros avaliados na cultura do feijão em experimento em casa de vegetação. As letras comparam as médias das variáveis em cada um dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, seguida do teste de comparação de médias de Duncan a 5% de probabilidade (α = 0,05).

Tratamentos	Médias das variáveis avaliadas – Cultura de Feijão								
	Altura da planta (cm)	Massa seca P.A. (g)	Massa seca Raiz (g)	Massa seca Total (g)	P solo (mg/dm3)	P (P.A.) g/kg	P (RAIZ) g/kg	N (P.A.) g/kg	N (RAIZ) g/kg
Controle	26,80 a	3,61 ab	1,15 a	4,76 ab	21,75 a	0,53 b	1,28 a	24,45 ab	16,68 a
LSM 14	21,79 abc	2,91 b	1,34 a	4,25 ab	11,50 b	0,48 b	1,58 a	25,93 a	17,60 a
LSM 24	23,13 ab	3,64 ab	1,31 a	4,95 ab	16,25 ab	0,53 b	1,28 a	20,05 bc	17,03 a
LSM 62	19,53 bc	3,42 ab	1,41 a	4,83 ab	11,75 b	0,48 b	1,15 a	20,15 bc	19,63 a
LSM 65	22,83 ab	2,93 b	1,28 a	4,20 ab	11,75 b	0,48 b	1,45 a	18,30 c	18,38 a
LSM 68	18,96 bc	3,38 ab	1,16 a	4,54 ab	12,50 b	0,95 a	1,38 a	22,70 abc	18,30 a
LSM 179	16,17 c	2,71 b	1,21 a	3,92 b	11,00 b	0,93 a	1,33 a	19,68 bc	18,28 a
LSM 183	23,96 ab	3,97 a	1,19 a	5,16 a	13,25 b	1,03 a	1,40 a	18,55 c	17,03 a
Teste F	3,35*	$2,13^{NS}$	$0,76^{NS}$	$1,54^{NS}$	$2,30^{NS}$	26,23**	$0,76^{NS}$	2,89*	$0,99^{NS}$
CV	16,8%	17,9%	17,1%	14,9%	35,0%	14,3%	21,7%	15,6%	10,9%

Teste F: * - Significância a 5% de probabilidade; ** - Significância a 1% de probabilidade; ^{NS} – Não significante

CV: Coeficiente de variação

P: Fósforo / N: Nitrogênio

P.A.: Parte aérea

Para a cultura da soja (Tabela 12), em relação à altura das plantas, o isolado 179 de *P. lilacinum* promoveu um incremento significativo na altura das plantas em relação ao controle, corroborando com o critério de seleção aplicado para sua escolha que foi a boa produção de AIA em condições de bancada. Para as variáveis relacionadas à massa seca, nenhum dos isolados promoveu incremento significativo na parte aérea, entretanto, plantas que foram inoculadas com o isolado LSM 24 de *P. lilacinum*, selecionado pelo seu potencial de solubilização de fósforo, apresentaram massa seca de raiz e total significativamente superiores em relação ao controle.

Em relação aos teores de nitrogênio analisados, novamente de destaca o isolado LSM 179, que promoveu um aumento significativo nos teores de nitrogênio no solo, mais que o dobro da quantidade encontrada no tratamento controle. Pode-se também destacar o isolado LSM 183, que apesar de não apresentar diferença estatística significativa em relação ao controle, promoveu um incremento de 57,9% nos teores de N no solo. Porém, tanto para os teores de nitrogênio na parte aérea ou raiz, nenhum dos isolados promoveu aumento significativo nos níveis desse nutriente nas plantas.

Avaliando o conteúdo de fósforo no solo, e na planta, incluindo parte aérea e raiz, nenhum dos isolados promoveu incremento significativo nos teores desse nutriente no solo ou nas plantas.

Tabela 12. Análise estatística dos parâmetros avaliados na cultura da soja em experimento em casa de vegetação. As letras comparam as médias das variáveis em cada um dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, seguida do teste de comparação de médias de Duncan a 5% de probabilidade (α = 0,05).

Tratamentos	Médias das variáveis avaliadas – Cultura de Soja									
	Altura da planta (cm)	Massa seca P.A.(g)	Massa seca Raiz (g)	Massa seca Total (g)	N solo (%)	P solo (g/dm3)	P (P.A.) g/kg	P (RAIZ) g/kg	N (P.A.) g/kg	N (RAIZ) g/kg
Controle	22,21 bc	1,71 a	0,96 b	2,67 b	0,048 b	10,00 a	0,95 a	1,05 a	29,10 a	23,28 a
LSM 14	21,92 bc	1,68 a	1,03 ab	2,71 b	0,050 b	16,50 a	0,98 a	1,00 a	32,75 a	23,40 a
LSM 24	23,54 ab	1,99 a	1,26 a	3,25 a	0,053 b	10,50 a	0,98 a	1,15 a	28,98 a	22,88 a
LSM 62	23,25 abc	1,76 a	1,08 ab	2,84 ab	0,060 b	11,50 a	0,98 a	1,18 a	30,10 a	25,20 a
LSM 65	23,67 ab	1,72 a	1,07 ab	2,79 ab	0,043 b	13,00 a	0,95 a	1,05 a	31,75 a	24,50 a
LSM 68	22,92 abc	1,74 a	1,15 ab	2,89 ab	0,003 c	12,50 a	0,90 a	1,23 a	32,08 a	24,95 a
LSM 179	25,08 a	1,88 a	1,18 ab	3,06 ab	0,100 a	13,75 a	0,85 a	1,25 a	31,53 a	24,65 a
LSM 183	20,79 c	1,66 a	1,15 ab	2,81 ab	0,075 ab	13,75 a	0,90 a	1,28 a	31,63 a	24,30 a
Teste F	2,73*	$0,98^{NS}$	$1,50^{NS}$	$1,42^{NS}$	6,43**	$0,32^{NS}$	$1,19^{NS}$	$1,45^{NS}$	$0,85^{NS}$	$0,66^{NS}$
CV	6,8%	12,6%	14,0%	11,2%	40,9%	58,4%	9,1%	14,9%	9,9%	8,7%

Teste F: * - Significância a 5% de probabilidade; ** - Significância a 1% de probabilidade; ^{NS} – Não significante

CV: Coeficiente de variação

P: Fósforo / N: Nitrogênio

P.A.: Parte aérea

Novamente, comprova-se a diferença de interação dos isolados com cada uma das culturas. Para o milho, os isolados LSM 65 e 24; para o feijão, os isolados LSM 183, 179 e 68 e; para a soja, os isolados LSM 179 e 24, apresentaram-se como potenciais para o estímulo do desenvolvimento vegetal. Estudos aprofundados, envolvendo a execução de testes em campo e a avaliação desses e de outros parâmetros, especialmente a produtividade de grãos, são essenciais para comprovar as hipóteses elaboradas com os testes em casa de vegetação. Além disso, vale ressaltar que para os isolados LSM 24 e 183 a elevada produção de quitinases detectada *in vitro* pode ser determinante na ação fúngica de combate a possíveis patógenos das plantas.

Outros estudos já demonstraram que *P. lilacinum* é uma espécie nematófaga e entomopatogênica capaz de colonizar endofiticamente tecidos vegetais. O mesmo é reportado para algumas espécies de *Metarhizium*, embora nenhum trabalho com *M. marquandii* nessa temática tenha sido encontrado na literatura.

Diversos estudos demonstram que a aplicação de *P. lilacinum* em condições de infestação com nematoides, especialmente *Meloidogyne* spp., pode melhorar a resposta das plantas à presença do patógeno, até mesmo promovendo o crescimento das mesmas. Como exemplo, em seu estudo Nesha e Siddiqui (2017) testaram uma linhagem de *P. lilacinum* e outra de *Aspergillus niger*, separadas ou em consórcio, avaliando o potencial de promoção de crescimento e a capacidade de combate a patógenos em cenouras. Nesse estudo, os autores avaliam a ação dos fungos no combate a *Pectobacterium carotovorum pv. carotovorum*, bactéria causadora da podridão mole de raízes; de *Xanthomonas campestris pv. carotae*, causadora da ferrugem foliar bacteriana e; de nematoides da galha *Meloidogyne javanica*. Foi avaliada a influência da inoculação dos fungos na altura das plantas, massa seca, massa fresca, teor de clorofila nas folhas, número de galhas nas raízes, população de nematoides e, os índices de doença nos casos de podridão e ferrugem. A inoculação dos fungos, isolados ou em consórcio foi capaz de alterar positivamente os parâmetros relacionados à promoção de crescimento e, negativamente, aqueles correspondentes à ação dos patógenos.

Entretanto, apenas dois estudos foram encontrados avaliando o efeito da inoculação de *P. lilacinum* na promoção do crescimento de plantas na ausência de

patógenos. Lopez e Sword (2015) avaliaram o efeito da colonização endofítica de *P. lilacinum* e *B. bassiana* em algodão (*Gossypium hirsutum*) e demonstraram como ambos os fungos foram capazes de incrementar a massa seca e o número de flores nas plantas. Hernandez-Leal et al. (2016) também avaliaram o efeito da inoculação de *P. lilacinum* em plantas de aveia na ausência de qualquer patógeno. Nesse estudo, os autores não obtiveram resultados significativos para os parâmetros de promoção de crescimento avaliados, incluindo massa fresca e seca e teores de nutrientes, com a linhagem de *P. lilacinum* utilizada.

Farias et al. (2018) testaram a inoculação de *P. lilacinum* em consórcio com mais quatro fungos, *B. bassina*, *M. anisopliae*, *Pochonia chlamydosporia* e *Trichoderma asperellum* e obtiveram resultados positivos na avaliação de parâmetros de promoção de crescimento em plantas de soja e milho, entretanto, o teste em consórcio dificulta a determinação de qual micro-organismo de fato contribuiu para o crescimento das plantas. Assim, esse estudo é o primeiro a demonstrar que linhagens de *P. lilacinum* são capazes de promover um aumento significativo em parâmetros relacionados à promoção do crescimento quando inoculados isoladamente em plantas de milho, feijão e soja na ausência do estímulo relacionado à presença de patógenos de plantas, como nematoides.

Nesse estudo, os isolados LSM 65 e 179, selecionados na triagem pela produção de AIA, foram capazes de incrementar a altura de plantas de milho e soja, respectivamente, assim como o isolado LSM 24 promoveu incremento na massa seca de raízes e total nas plantas de soja.

Com relação aos dados obtidos para os teores de nitrogênio na raiz, todos os isolados, exceto LSM14, e destacando-se LSM 65 e 24, respectivamente, atuaram de forma significativa na melhoria do aporte desse nutriente essencial para a cultura de milho. Aliado ao potássio, o nitrogênio é o nutriente mais requerido para o desenvolvimento do milho (Coelho, 2006). Seu fornecimento para a cultura pode ser dado mediante a aplicação de fertilizantes químicos ou biológicos, nesse último caso, pelo uso das denominadas rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, que são capazes de fixar o nitrogênio do ar e assim disponibilizá-lo para que possa ser absorvido pelas plantas (Arzanesh et al., 2011; Abbasi et al., 2011).

Para a soja e o feijão, que são plantas leguminosas, o fornecimento de nitrogênio está associado à formação de nódulos radiculares com bactérias fixadoras de nitrogênio simbiontes (ex: *Rhizobium*). Uma vez fixado, o nitrogênio é utilizado como matéria-prima na constituição de moléculas orgânicas e, depois, é novamente mineralizado para a liberação de compostos inorgânicos nitrogenados que podem ser captados pelas plantas (Behie e Bidochka, 2014a).

Entretanto, a fertilização biológica de nitrogênio também pode ser obtida via auxílio por fungos micorrízicos (Miransari, 2011; Behie e Bidochka, 2014a), especialmente as micorrizas arbusculares, para as quais diversos estudos relatam seu potencial de fornecimento de nutrientes essenciais como fósforo e nitrogênio, recebendo em troca carbono oriundo da fotossíntese (Bargaz et al., 2018; Bitterlich et al., 2018). McFarland et al. (2010) sugerem que até 50% do suprimento necessário de nitrogênio pode ser obtido por associações micorrízicas. Segundo diversos autores (Miransari et al., 2009; Daei et al., 2009; Hodge e Fitter, 2010) uma maneira eficiente de os fungos obterem o nitrogênio do solo é mediante a sua liberação em formas inorgânicas a partir de matéria orgânica. Atul-Nayyar et al. (2009) demonstraram que os fungos micorrízicos são capazes de aumentar o processo de mineralização de matéria orgânica do solo, resultando na liberação de grandes quantidades de nitrogênio mineralizado que está prontamente disponível para ser captado pelas plantas.

Behie et al. (2012) demonstraram de forma pioneira que a habilidade de fornecimento de nitrogênio para as plantas não é algo exclusivo para fungos micorrízicos. Os autores relataram a capacidade colonização endofítica de uma linhagem do fungo entomopatogênico *Metarhizium robertsii*, e a forma como o fungo foi capaz de transferir nitrogênio de larvas de *Galleria mellonella* infectadas e mortas pelo mesmo para plantas de feijão (*P. vulgaris*) e de gramíneas *(Panicum virgatum*). A partir de então novos estudos foram realizados, como Behie e Bidochka (2014b), que avaliaram a capacidade de transferência endofítica de nitrogênio a partir de insetos por sete espécies fúngicas: sendo elas *M. robertsii, M. guizhouense, M. brunneum M. flavoviridae, M. acridum*, *Beauveria bassiana* e *Akanthomyces* (=*Lecanicillium*) *lecanii*; em quatro culturas: duas dicotiledôneas, *G. max* (soja) e *P. vulgaris* (feijão), e duas monocotiledôneas, *Triticum aestivum* (trigo) e *P. virgatum* (gramínea conhecida como switchgrass). Como resultado,

os autores apontam cinco espécies de *Metarhizium* e *B. bassiana*, como sendo capazes de matar larvas de insetos e colonizar endofiticamente as plantas, realizando a transferência de N dos insetos para as mesmas.

O aumento nos teores de nitrogênio no solo e nas plantas (parte aérea ou raiz) não é uma característica comum associada à inoculação de fungos filamentosos não micorrízicos em culturas agrícolas, e nunca foi relatada para *P. lilacinum.* Dessa forma, os resultados desse estudo indicam que os isolados utilizados, incluindo todos exceto LSM 14 na cultura do milho, e o isolado LSM 179 na soja, podem ter sido capazes de acelerar o processo de disponibilização de matéria orgânica no solo, além de estabelecer uma relação endofítica com as plantas e atuar no transporte desse nutriente a partir do solo.

Em relação ao fósforo, sabe-se que sua solubilização a partir de fosfatos insolúveis no solo é amplamente difundida entre diversos grupos de fungos, seja mediante a produção de ácidos orgânicos ou enzimas, fosfatases e fitases (Gaind, 2016). A forma mais abundante de fosfato no solo que pode ser prontamente absorvida pelas plantas é o ortofosfato (PO_4^{3-}), o qual também pode ser absorvido pelos fungos. O transporte de fosfatos dos fungos para as plantas é bem caracterizado para fungos micorrízicos arbusculares (Bargaz et al., 2018; Bitterlich et al., 2018). Até o momento, poucos estudos relatam como pode ocorrer o transporte de fósforo de fungos potencialmente endofíticos para plantas (Behie e Bidochka 2014a), como é o caso de *P. lilacinum*. Como já mencionado, poucos são os estudos que descrevem a habilidade de solubilização de fósforo para esse fungo, e ainda mais escassos os que venham a indicar a ação do fungo *in planta* em relação à disponibilização desse nutriente.

Os resultados obtidos para a aplicação do isolado LSM 24 na soja e no milho, confirmaram seu potencial *in vitro*, porém os resultados mais significativos foram aqueles oriundos da aplicação dos isolados LSM 68 (*M. marquandii*), LSM 179 e LSM 183 (ambos *P. lilacinum*), na forma como foram capazes de incrementar o teor de fósforo na parte aérea das plantas de feijão.

É interessante notar a diferença de comportamento dos isolados em diferentes culturas. Como já observado, os resultados nas plantas de milho apresentaram coerência com os dados obtidos nas análises *in vitro*, onde os isolados LSM 65 e 24 apresentaram

os melhores resultados para a produção de AIA e solubilização de fósforo, respectivamente, além do incremento nos teores de nitrogênio, o que não aconteceu para a cultura do feijão. Para esta, os isolados LSM 183, 179 e 68, selecionados pela produção de AIA, foram os que apresentaram efeito sobre as plantas em relação ao acúmulo de fósforo na parte aérea. Já para a soja, os isolados 179 e 24, apresentaram-se como potenciais para o estímulo do desenvolvimento vegetal, corroborando com o potencial *in vitro*, visto que LSM 179 aumentou a altura das plantas e LSM 24 os teores de fósforo e, ao mesmo tempo, apresentando novos potenciais, que são o fornecimento de nitrogênio e o aumento de massa seca, respectivamente.

Adicionalmente ao potencial reportado para as espécies de *P. lilacinum*, é importante destacar a presença do isolado LSM 68 de *M. marquandii* dentre os selecionados para a avaliação de seu efeito *in planta*. Até 2014, a espécie era classificada como *Paecilomyces marquandii*. É um fungo saprófita, comum no solo, e que tem estudos envolvendo sua aplicação na biorremediação de ambientes contaminados com metais pesados, uma vez que seu isolamento nesse tipo de local é recorrente (Slaba et al., 2011, Slaba et al., 2013), além de alacloro, um herbicida da família da cloroacetanilida (Slaba et al., 2015; Szewczyk et al., 2015). São raros os estudos envolvendo essa espécie, como o de Ahuja et al. (2007), que descrevem algum potencial relacionado ao crescimento de plantas, como, nesse caso, a descrição da capacidade de solubilização de fósforo por uma linhagem de *M. marquandii*. Assim, esse trabalho também contribui com informações inéditas relacionando esse fungo à promoção de crescimento de plantas.

A divergência do potencial *in vitro* para a ação *in planta* certamente está relacionada a vários fatores, a começar pela espécie vegetal testada. Os resultados indicam que cada espécie de planta interage de maneira diferente com os fungos testados e isso resulta de aspectos como a localização do fungo, se permanece na rizosfera ou interage endofiticamente com as plantas; se atua (e como) na indução de resistência; se produz fitormônios ou se altera o padrão de produção dos mesmos pela planta; entre outros. Assim, sugere-se que além de testes em campo, para confirmação do potencial exibido em casa de vegetação, outros testes *in planta* para uma melhor elucidação da interação fungo-planta também se fazem necessários em estudos futuros.

5. CONCLUSÕES

Em relação ao isolamento dos fungos, o meio de Martin, recomendado para fungos de solo, não se mostrou um bom meio para a obtenção de fungos do genêro *Purpureocillium*. Já o meio BDA adicionado de cloreto sódio permitiu a recuperação de alguns isolados de interesse, entretanto, o meio DOC2, inicialmente recomendado para o isolamento de *B. bassiana*, demonstrou ser o mais eficiente para o isolamento seletivo de representantes de *Purpureocillium*. O elevado pH do meio DOC2 inibiu o crescimento de outros fungos esporulantes e sua composição certamente favoreceu o crescimento desse gênero, visto que a maioria dos isolados foi obtida a partir desse meio de cultura.

A caracterização taxonômica dos 30 isolados morfologicamente reconhecidos como pertencentes ao gênero *Purpureocillium*, dentre os 211 isolados obtidos, trouxe a informação de como os estudos relacionados às espécies identificadas são escassos na temática desse projeto, especialmente para as espécies *P. lavendulum* e *M. marquandii,* tornando-o ainda mais promissor e rico em informações importantes que podem contribuir com o desenvolvimento da pesquisa nessa área.

A análise conjunta dos resultados obtidos no processo de triagem *in vitro* para a solubilização de fósforo a partir da fluorapatita, para a produção de AIA e de formação de quitinases, permitiram a seleção de sete isolados que foram utilizados nos testes em casa de vegetação: LSM 14, 24, 62, 65, 179 e 183 de *P. lilacinum* e LSM 68 de *M. marquandii*. Além disso, o teste de produção dos sete isolados selecionados em arroz parboilizado demonstrou seu potencial de cultivo em escala industrial, o que é essencial para que novas pesquisas e testes sejam realizadas no âmbito da aplicação em campo desses isolados.

O teste dos sete isolados em casa de vegetação, simulando condições mais próximas às que esses micro-organismos enfrentariam no campo, demonstrou que os mesmos foram capazes de favorecer os parâmetros relacionados à promoção de crescimento nas três culturas testadas. Porém, a inoculação dos isolados apresentou efeitos distintos para cada cultura, indicando a especificidade da relação fungo-planta e

a necessidade de estudos mais aprofundados. Para cada cultura, isolados promissores foram selecionadados para serem utilizados em estudos futuros.

Assim como vários outros trabalhos de grande valor que vem sendo publicados no contexto da promoção de crescimento de plantas aliada à utilização de micro-organismos, esse estudo demonstra sua importância ao relatar o potencial de *P. lilacinum* e *M. marquandii* em atuarem no estímulo ao desenvolvimento vegetal de culturas de importância agrícola a nível mundial e que, atualmente, consomem anualmente milhões de toneladas de defensivos e fertilizantes para o seu cultivo. Dessa forma, os resultados aqui apresentados contribuem na ampliação do conhecimento que pode ser aplicado no desenvolvimento de um processo agrícola ambientalmente mais correto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, M. K. et al. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on improving growth, yield and nutrient uptake of plants. **Plant Biosystems**, v. 145, n. 1, p. 159-168, 2011.

AGRAWAL, Toshy; KOTASTHANE, Anil S. Chitinolytic assay of indigenous Trichoderma isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. **SpringerPlus**, v. 1, n. 1, p. 73, 2012.

AHMAD, Maqshoof et al. Perspectives of Microbial Inoculation for Sustainable Development and Environmental Management. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2992, 2018.

AHUJA, Amita; GHOSH, S. B.; D'SOUZA, S. F. Isolation of a starch utilizing, phosphate solubilizing fungus on buffered medium and its characterization. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3408-3411, 2007.

ALORI, Elizabeth Temitope; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Microbial inoculants for improve crop quality and human health. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2213, 2018.

ALTSCHUL, Stephen F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVES, S. B.; PEREIRA, R. M. Producão de fungos entomopatogênicos, p: 845–70. **Controle Microbiano De Insetos, P**, v. 1163, 1998.

AMES, B. N. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. **Methods Enzymol**, v. 8, p. 115-118, 1966.

ANDA – Associação Nacional para Difusão de Adubos. **CÂMARA TEMÁTICA DE INSUMOS AGROPECUÁRIOS - 89ª REUNIÃO.** Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/camaras-tematicas-1/insumos-agropecuarios> Acesso em: 10 mai. 2019.

ANDA – Associação Nacional para Difusão de Adubos. **Relatório sobre o Mercado de fertilizantes janeiro – dezembro / 2018.** Disponível em: <http://anda.org.br/estatisticas/> Acesso em: 10 mai. 2019.

ANEES, Muhammad et al. Characterization of field isolates of Trichoderma antagonistic against Rhizoctonia solani. **Fungal biology**, v. 114, n. 9, p. 691-701, 2010.

ARZANESH, Mohammad Hossein et al. Wheat (Triticum aestivum L.) growth enhancement by Azospirillum sp. under drought stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 197-205, 2011.

ATKINS, Simon D. et al. The use of real-time PCR and species-specific primers for the identification and monitoring of Paecilomyces lilacinus. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 257-264, 2005.

ATUL-NAYYAR, A. et al. The arbuscular mycorrhizal symbiosis links N mineralization to plant demand. **Mycorrhiza**, v. 19, n. 4, p. 239-246, 2009.

AZMAT, Muhammad Abubakkar et al. Extraction of DNA suitable for PCR applications from mature leaves of Mangifera indica L. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 13, n. 4, p. 239-243, 2012.

BAINIER, G. Mycothéque de l'école de Pharmacie. XI. *Paecilomyces*, genre nouveau de Mucédinées. **Bull Trimest Soc Mycol Fr**, v. 23, p. 26-27, 1907.

BARBOSA, J. C.; JÚNIOR, MALDONADO. Sistemas para análises estatísticas de ensaios agronômicos (AgroEstat). **Jaboticabal: FCAV, UNESP, Câmpus de Jaboticabal**, 2015.

BARGAZ, Adnane et al. Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. **Frontiers in microbiology**, v. 9, 2018.

BARON, Noemi Carla et al. First report of Aspergillus sydowii and Aspergillus brasiliensis as phosphorus solubilizers in maize. **Annals of Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 863-870, 2018.

BARON, Noemi Carla; RIGOBELO, Everlon Cid; ZIED, Diego Cunha. Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. **Chilean journal of agricultural research**, v. 79, n. 2, p. 307-315, 2019.

BEHIE, S. W.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, v. 336, n. 6088, p. 1576-1577, 2012.

BEHIE, Scott W.; BIDOCHKA, Michael J. Nutrient transfer in plant–fungal symbioses. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 11, p. 734-740, 2014a.

BEHIE, Scott W.; BIDOCHKA, Michael J. Ubiquity of insect-derived nitrogen transfer to plants by endophytic insect-pathogenic fungi: an additional branch of the soil nitrogen cycle. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1553-1560, 2014b.

BERGER, L. R.; REYNOLDS, D. M. Colloidal chitin preparation. **Methods Enzymol**, v. 161, p. 140-142, 1988.

BILAL, Saqib et al. Endophytic Paecilomyces formosus LHL10 augments Glycine max L. adaptation to Ni-contamination through affecting endogenous phytohormones and oxidative stress. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 870, 2017.

BITTERLICH, Michael et al. Arbuscular mycorrhizas: a promising component of plant production systems provided favorable conditions for their growth. **Frontiers in plant science**, v. 9, 2018.

BOMBARDI, Larissa Mies. Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia. **São Paulo: USP**, 296 p., 2017.

BRASIL. Lei 6.894 de 16 de dezembro de 1980. **Diário Oficial da União**. Brasilia, DF, 17, dez. 1980. Seção 1, p. 25289.

BRASIL. Lei 7.802 de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 12 jul. 1989. Seção 1, p. 11459.

CARNEIRO, Fernando F. et al. Segurança alimentar e nutricional e saúde. In: CARNEIRO, Fernando F. et al. Dossiê Abrasco: Um alerta sobre os impactos dos defensivos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p.

CAVELLO, Ivana A. et al. Plant growth promotion activity of keratinolytic fungi growing on a recalcitrant waste known as “Hair Waste”. **Biotechnology research international**, v. 2015, 2015.

CHEN, Mingjun et al. Paecilomyces echinosporus sp. nov., a species isolated from soil in China. **Mycotaxon**, v. 114, n. 1, p. 25-32, 2011.

COELHO, Antonio Marcos. Nutrição e adubação do milho. **Embrapa Milho e Sorgo. Circular técnica**, 2006.

CONAB – Compania Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – safra 2013/14**, v. 1, n 12, 2014.

CONAB – Compania Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos – safra 2018/19**, v. 6, n.8, 2019.

CROUS, P. W. et al. Fungal biodiversity. CBS laboratory manual series 1. **Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht**, 2009.

DAEI, G. et al. Alleviation of salinity stress on wheat yield, yield components, and nutrient uptake using arbuscular mycorrhizal fungi under field conditions. **Journal of plant physiology**, v. 166, n. 6, p. 617-625, 2009.

DEGENKOLB, Thomas; VILCINSKAS, Andreas. Metabolites from nematophagous fungi and nematicidal natural products from fungi as an alternative for biological control. Part I: metabolites from nematophagous ascomycetes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 9, p. 3799-3812, 2016.

DONG, L. Q; ZHANG, K. Q. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. **Plant and Soil**, v. 288, n. 1-2, p. 31-45, 2006.

ESTADOS UNIDOS. Department of Agriculture. **Economic Research Service**. 2015. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov>. Acesso em: 14 jun. 2015.

EDGAR, Robert C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, n. 5, p. 1792-1797, 2004.

EWING, Brent et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 175-185, 1998.

FARELL, Eric M.; ALEXANDRE, Gladys. Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 257, 2012.

FARIAS, Christyan P. et al. Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3649-3660, 2018.

FONTAINE, Laurent et al. Phosphate-solubilizing bacteria isolated from ectomycorrhizal mycelium of Picea glauca are highly efficient at fluorapatite weathering. **Botany**, v. 94, n. 12, p. 1183-1193, 2016.

GAIND, Sunita. Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. **Microbiological research**, v. 193, p. 94-102, 2016.

GASQUES, José Garcia et al. Produtividade e crescimento: algumas comparações. **Contribuição da Embrapa para o desenvolvimento da agricultura no Brasil**, 2013.

GASQUES, José Garcia et al. Produtividade da agricultura: resultados para o Brasil e estados selecionados. **Revista de Política Agrícola**, v. 23, n. 3, p. 87-98, 2014.

GLASS, N. Louise; DONALDSON, Gary C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1323-1330, 1995.

GORDON, David; ABAJIAN, Chris; GREEN, Phil. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome research**, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

GREEN, P. PHRAD documentation, 1996. Disponivel em: <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>. Acesso em: out. 2018.

HARTL, Lukas; ZACH, Simone; SEIDL-SEIBOTH, Verena. Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 2, p. 533-543, 2012.

HERNÁNDEZ-LEAL, Tania; LÓPEZ-LIMA, Daniel; CARRIÓN, Gloria. Effect of the application of nematophagous fungus Purpureocillium lilacinum over nutrients availability

on agricultural soil and yield of Avena sativa. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**, v. 48, n. 2, p. 1-12, 2016.

HERRE, Edward Allen et al. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 550-558, 2007.

HODGE, Angela; FITTER, Alastair H. Substantial nitrogen acquisition by arbuscular mycorrhizal fungi from organic material has implications for N cycling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 31, p. 13754-13759, 2010.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

HUSON, Daniel H.; SCORNAVACCA, Celine. Dendroscope 3: an interactive tool for rooted phylogenetic trees and networks. **Systematic biology**, v. 61, n. 6, p. 1061-1067, 2012.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Divers**, v. 33, n. 163, p. e173, 2008.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. **Relatório de Comercialização de Agrotóxicos**. Brasília: 2019. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2017/Grafico-Consumo_agrotoxicos_2000-2017.pdf> Acesso em: 09 mai. 2019.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/geociencias/recursosnaturais/ids/default_2012.shtm> Acesso em: jun. 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. 2015. Disponível em: < https://sidra.ibge.gov.br/tabela/768#resultado> Acesso em: nov. 2018.

INCA – Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva Acerca dos Defensivos**, 2015. Disponível em:

<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/posicionamento_do_inca_sobre_os_agrotoxicos_06_abr_15 .pdf> Acesso em: jun. 2015.

ISAAA - International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications. **Situação global dos cultivos transgênicos em 2017.** Resumo executivo 2018. Disponível em: < https://conteudo.cib.org.br/isaaa-2018-ebook>. Acesso em: 10 mai. 2019.

JAROSZUK-ŚCISEŁ, Jolanta; KUREK, Ewa; TRYTEK, Mariusz. Efficiency of indoleacetic acid, gibberellic acid and ethylene synthesized in vitro by Fusarium culmorum strains with different effects on cereal growth. **Biologia**, v. 69, n. 3, p. 281-292, 2014.

KARTHIK, Narayanan et al. Production, purification and properties of fungal chitinases—a review. **Indian journal of experimental biology,** v. 52, p. 1025 – 1035, 2014.

KENIS, Marc et al. Classical biological control of insect pests of trees: facts and figures. **Biological invasions**, v. 19, n. 11, p. 3401-3417, 2017.

KEPLER, Ryan M. et al. Clarification of generic and species boundaries for Metarhizium and related fungi through multigene phylogenetics. **Mycologia**, v. 106, n. 4, p. 811-829, 2014.

KEPLER, Ryan M. et al. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). **IMA fungus**, v. 8, n. 2, p. 335-353, 2017.

KHAN, Alamgir; WILLIAMS, Keith L.; NEVALAINEN, Helena KM. Effects of Paecilomyces lilacinus protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of Meloidogyne javanica juveniles. **Biological Control**, v. 31, n. 3, p. 346-352, 2004a.

KHAN, M. Ajmal; GUL, Bilquees; WEBER, Darrell J. Action of plant growth regulators and salinity on seed germination of Ceratoides lanata. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 1, p. 37-42, 2004b.

KHAN, Sumera Afzal et al. Plant growth promotion and Penicillium citrinum. **BMC microbiology**, v. 8, n. 1, p. 231, 2008.

KHAN, Abdul Latif et al. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of Paecilomyces formosus LHL10. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 3, 2012.

KULKARNI, Sunil; GOSWAMI, Ajaygiri. Effect of Excess Fertilizers and Nutrients: A Review on Impact on Plants and Human Population. 2019. Disponível em: < https://ssrn.com/abstract=3358171>. Acesso em 10 mai. 2019.

KURAMAE-IZIOKA, Eiko Eurya. A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of Colletotrichum gloeosporioides and Fusarium oxysporum. **Revista Unimar**, v. 19, n. 3, p. 683-689, 1997.

KUSS, Anelise Vicentini et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459-1465, 2007.

LI, Juan et al. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual review of Phytopathology**, v. 53, p. 67-95, 2015.

LOPEZ, Diana Castillo; SWORD, Gregory A. The endophytic fungal entomopathogens Beauveria bassiana and Purpureocillium lilacinum enhance the growth of cultivated cotton (Gossypium hirsutum) and negatively affect survival of the cotton bollworm (Helicoverpa zea). **Biological Control**, v. 89, p. 53-60, 2015.

LUANGSA-ARD, J. Jennifer; HYWEL-JONES, Nigel L.; SAMSON, Robert A. The polyphyletic nature of Paecilomyces sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 773-780, 2004.

LUANGSA-ARD, Jennifer et al. Purpureocillium, a new genus for the medically important Paecilomyces lilacinus. **FEMS microbiology letters**, v. 321, n. 2, p. 141-149, 2011.

MALAVOLTA, Eurípides. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações/Eurípedes Malavolta, Godofredo Cesar Vitti, Sebastião Alberto de Oliveira - 2. ed., ver. e atual. **Piracicaba: Potafos**, 1989.

MARTIN, James P. Use of acid, rose bengal, and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. **Soil science**, v. 69, n. 3, p. 215-232, 1950.

MARTÍNEZ-HIDALGO, Pilar et al. Engineering root microbiomes for healthier crops and soils using beneficial, environmentally safe bacteria. **Canadian journal of microbiology**, v. 65, n. 2, p. 91-104, 2018.

MCFARLAND, Jack W. et al. Cross-ecosystem comparisons of in situ plant uptake of amino acid-N and NH4+. **Ecosystems**, v. 13, n. 2, p. 177-193, 2010.

MILANI, Rafael de Mello. Diversidade de bactérias epífitas e endofíticas da cultura do milho. 2017.

MILLER, G. L. Modified DNS method for reducing sugars. **Anal Chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANSARI, M. et al. Effects of soil compaction and arbuscular mycorrhiza on corn (Zea mays L.) nutrient uptake. **Soil and Tillage Research**, v. 103, n. 2, p. 282-290, 2009.

MIRANSARI, Mohammad. Arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen uptake. **Archives of microbiology**, v. 193, n. 2, p. 77-81, 2011.

MITCHELL, D. J.; KANNWISCHER-MITCHELL, M. E.; DICKSON, D. W. A semi-selective medium for the isolation of Paecilomyces lilacinus from soil. **Journal of Nematology**, v. 19, n. 2, p. 255, 1987.

NAHAS, Ely; FORNASIERI, D. J.; ASSIS, L. C. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. **Scientia Agricola**, p. 463-469, 1994.

NESHA, Rukshima; SIDDIQUI, Zaki A. Effects of Paecilomyces lilacinus and Aspergillus niger alone and in combination on the growth, chlorophyll contents and soft rot disease complex of carrot. **Scientia horticulturae**, v. 218, p. 258-264, 2017.

NIETO-JACOBO, Maria F. et al. Environmental growth conditions of Trichoderma spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 102, 2017.

OLIVEIRA, Ariádila Gonçalves de et al. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por Trichoderma spp. **Revista Verde (Mossoró–RN)**, v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

OLIVEIRA MENDES, Gilberto de et al. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 239-249, 2014.

ORTIZ-URQUIZA, Almudena; LUO, Zhibing; KEYHANI, Nemat O. Improving mycoinsecticides for insect biological control. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1057-1068, 2015.

OWNLEY, Bonnie H. et al. Beauveria bassiana: endophytic colonization and plant disease control. **Journal of invertebrate pathology**, v. 98, n. 3, p. 267-270, 2008.

PERDOMO, Haybrig et al. Polyphasic analysis of Purpureocillium lilacinum isolates from different origins and proposal of the new species Purpureocillium lavendulum. **Mycologia**, v. 105, n. 1, p. 151-161, 2013.

PIGNATI, Wanderlei Antonio et al. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

POSADA, David; BUCKLEY, Thomas R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

POSADA, David; CRANDALL, Keith A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 14, n. 9, p. 817-818, 1998.

PRIOLLI, Regina Helena Geribello et al. Diversidade genética da soja entre períodos e entre programas de melhoramento no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 10, p. 967-975, 2004.

RAI, Mahendra et al. Fungal growth promotor endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. **Symbiosis**, v. 62, n. 2, p. 63-79, 2014.

RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Associaçao Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba (Brasil), 1991.

RAIJ, B. van et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agronômico/Fundação IAC, 1997.

RAIJ, B. van et al. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. (In Portuguese.). 2001.

RANUM, Peter; PEÑA-ROSAS, Juan Pablo; GARCIA-CASAL, Maria Nieves. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, n. 1, p. 105-112, 2014.

RENWICK, A.; CAMPBELL, R.; COE, S. Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of Gaeumannomyces graminis. **Plant Pathology**, v. 40, n. 4, p. 524-532, 1991.

RHEINHEIMER DOS SANTOS, Danilo; COLPO GATIBONI, Luciano; KAMINSKI, João. Fatores que afetam a disponibilidade do fósforo e o manejo da adubação fosfatada em solos sob sistema plantio direto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, 2008.

RINU, K.; PANDEY, Anita. Slow and steady phosphate solubilization by a psychrotolerant strain of Paecilomyceshepiali (MTCC 9621). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1055-1062, 2011.

RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W.; RUSSELL, David W. **Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set)**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001.

SAMSON, Robert A. Paecilomyces and some allied hyphomycetes. **Studies in mycology**, v. 6, p. 1-119, 1974.

SABARWAL, Akash; KUMAR, Kunal; SINGH, Rana P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health-cancer and other associated disorders. **Environmental toxicology and pharmacology**,v. 63, p. 103 – 114, 2018.

SCALZILLI, João Carlos Lopes; SCALZILLI, João Pedro de Souza; DIAS, Lucas Martins. Soja transgênica no Brasil: Anotações sobre a legislação de plantio, comercialização e direitos da propriedade intelectual. In: **Âmbito Jurídico**, Rio Grande, VIII, n. 23, set 2005. Disponível em: <http://www.ambito-juridico.com.br/site/index.php?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=248&revista_caderno=5>. Acesso em: 10 mai. 2019.

SAVCI, Serpil. An agricultural pollutant: chemical fertilizer. **International journal of environmental science and development**, v. 3, n. 1, p. 77 – 80, 2012.

SCHRANK, Augusto; VAINSTEIN, Marilene Henning. Metarhizium anisopliae enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267-1274, 2010.

SEXTON, A. C.; HOWLET, B. J. Parallels between fungal pathogenesis on plant and animal hosts. **Eukaryotic Cell**, v. 5, p. 1941 – 1949, 2006.

SHIMAZU, Mitsuaki; SATO, Hiroki. Media for selective isolation of an entomogenous fungus, Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hyphomycetes). **Applied Entomology and Zoology**, v. 31, n. 2, p. 291-298, 1996.

SIGLER, Lynne et al. Disseminated mycosis in veiled chameleons (Chamaeleo calyptratus) caused by Chamaeleomyces granulomatis, a new fungus related to Paecilomyces viridis. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3182-3192, 2010.

SILVA, Osmira Fátima da; WANDER, Alcido Elenor. O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos (INFOTECA-E)**, 63 p., 2013.

SIMONOVIC, Ana et al. Dimethyl sulfoxide improves sensitivity and specificity of RT-PCR and QRT-PCR amplification of low-expressed transgenes. **Arch Biol Sci**, v. 64, p. 865-876, 2012.

SIQUEIRA, J.O. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. MEC/ABEAS, Lavras, 1988. 235 p.

SŁABA, Mirosława; DŁUGOŃSKI, Jerzy. Efficient Zn2+ and Pb2+ uptake by filamentous fungus Paecilomyces marquandii with engagement of metal hydrocarbonates precipitation. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 954-960, 2011.

SŁABA, Mirosława et al. Comparative study of metal induced phospholipid modifications in the heavy metal tolerant filamentous fungus Paecilomyces marquandii and implications for the fungal membrane integrity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 4, 2013.

SŁABA, Mirosława et al. Efficient alachlor degradation by the filamentous fungus Paecilomyces marquandii with simultaneous oxidative stress reduction. **Bioresource technology**, v. 197, p. 404-409, 2015.

STROBEL, Gary; DAISY, Bryn. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.

SUNDARA, Rao WVB; SINHA, M. K. Phosphate solubilizing organisms in the soil and rhizosphere. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 33, p. 272-278, 1963.

SUNG, Gi-Ho et al. Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. **Studies in mycology**, v. 57, p. 5-59, 2007.

SZEWCZYK, Rafał et al. Mechanism study of alachlor biodegradation by Paecilomyces marquandii with proteomic and metabolomic methods. **Journal of hazardous materials**, v. 291, p. 52-64, 2015.

TRIPTI, Kumar A. et al. Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. **Journal of Environmental Management**, v. 190, p. 20-27, 2017.

VAN LEXMOND, Maarten Bijleveld et al. Worldwide integrated assessment on systemic pesticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n.1, p.1 -4, 2015.

VASCONCELOS, Yuri. Agrotóxicos na berlinda. **Revista Fapesp**, ano 19, n. 271, 2018.

VEGA, Fernando E. et al. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. **fungal ecology**, v. 2, n. 4, p. 149-159, 2009.

VERMA, Mausam et al. Antagonistic fungi, Trichoderma spp.: panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 1, p. 1-20, 2007.

WAQUIL, José Magid et al. Manejo de lepidópteros-praga na cultura do milho com o evento Bt piramidado Cry1A. 105 e Cry2Ab2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 12, p. 1529-1537, 2014.

WAQAS, Muhammad et al. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. **Molecules**, v. 17, n. 9, p. 10754-10773, 2012.

WHARTON, David. Nematode egg-shells. **Parasitology**, v. 81, n. 2, p. 447-463, 1980.

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

ZIKANKUBA, Vumilia Lwoga et al. Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. **Cogent Food & Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 1601544, 2019.

APÊNDICE

Esta seção destina-se à descrição de metodologias testadas durante a execução dessa pesquisa e que não apresentaram resultados satisfatórios para serem incluídos em sua discussão.

Considera-se que tais experiências serão essenciais para estudos a posteriori, pois demonstram dificuldades e peculiaridades que tiveram de ser superadas e elucidadas para que métodos alternativos fossem testados e pudessem responder às hipóteses levantadas por esse estudo.

Assim, toda a informação a seguir tem como principal objetivo permanecer como legado de conhecimento a ser transmitido a todos que busquem trilhar caminhos semelhantes e venham a se deparar com os mesmos desafios, especialmente ao Laboratório de Microbiologia do Solo (LSM).

Análise Molecular

Extração do DNA genômico e amplificação dos fragmentos de ITS e β-tubulina

As primeiras extrações de DNA dos isolados foram realizadas utilizando-se o kit Quick Universal da ZYMO Research® com algumas adaptações. Previamente ao protocolo sugerido pelo fabricante, o micélio fúngico, preparado para a extração após 7 dias de cultivo em ágar malte 2%, foi adicionado a microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL de solução de lise TES (Tris 100 mM; EDTA 10 mM; SDS 2%) e microesferas de vidro (Sigma). A mistura foi agitada em vórtex por 5 minutos e em seguida incubada a 65 ºC por 60 minutos. Após a incubação uma nova agitação em vórtex foi realizada e iniciou-se o procedimento de extração utilizando-se o kit.

Esse processo de extração de DNA demonstrou ser suficiente para a extração do DNA genômico dos fungos, visto que após o procedimento de extração, a corrida em gel de agarose revelou a presença de bandas únicas e com alto peso molecular, características da extração de DNA genômico. Entretanto a realização da PCR

convencional, conforme a Tabela 3 (item 3.2.2, da seção Material e Métodos), porém sem a adição de BSA e DMSO, mesmo após várias tentativas, alterando desde a concentração de reagentes até mesmo a temperatura de anelamento dos iniciadores durante a termociclagem, foi insuficiente para promover a amplificação dos fragmentos de DNA selecionados (ITS e β-tubulina).

Assim, após diversos testes sem sucesso, com reagentes e condições modificadas, optou-se por recomeçar o processo utilizando um novo protocolo de extração do DNA genômico, nesse caso o protocolo que utiliza a maceração do micélio com nitrogênio líquido.

A primeira extração foi realizada com micélio crescido em caldo BD por 7 dias. Já no momento inicial da extração, na lavagem do micélio, notou-se a intensa produção de exopolissacarídeos (goma) pelo micélio de todos os isolados. Além disso, na primeira extração realizada seguindo essa metodologia, a solução de lise não continha CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio). No momento da adição da solução de clorofórmio e álcool isoamílico, após a centrifugação, a interfase formada apresentava nitidamente grande quantidade de resíduo orgânico, especialmente os exopolissacarídeos, o que pôde-se concluir devido à dificuldade em recolher o sobrenadante, pois o depósito de exopolissacarídeos respondia à sucção com a micropipeta, como em um efeito “chiclete”. O procedimento de extração foi finalizado e após a leitura no Nanodrop, os resultados indicavam grande quantidade de DNA genômico, normalmente entre 500 até 3000 ng/µL, com a relação de leitura de absorbância 260/280 nm dentro da ideial desejada (1,8 a 2,0).

Após a extração e quantificação, cada amostra foi padronizada para 60 ng/ µL de DNA, considerada quantidade suficiente e ideal para a PCR, preparando-se uma diluição em água ultrapura. A primeira PCR realizada para a região ITS teve sucesso apenas para uma amostra, a do isolado LSM 73.

A falta de sucesso na amplificação levou ao questionamento sobre os fatores que poderiam estar impedindo o processo. Nas etapas anteriores, já haviam sido testados cada um dos reagentes utilizados na reação de PCR, e até mesmo reagentes novos foram comprados e testados. Todos estavam em perfeitas condições, pois verificava-se amplificação normal de controles positivos testados. Assim, o foco permaneceu nas

amostras, e a primeira hipótese levantada envolveu a presença dos exopolissacarídeos, acreditando que o metabolismo fúngico dos isolados estivesse produzindo compostos orgânicos, que poderiam estar envolvidos nessa secreção e que estivessem atuando como impeditivos da reação de amplificação.

A presença de moléculas impeditivas da ocorrência da reação de PCR é relatada em vários trabalhos científicos e, atualmente, sugere-se o uso de soro albumina bovina (BSA) como um aditivo na reação de PCR na tentativa de solucionar esse problema. Normalmente, as moléculas impeditivas de PCR atuam interagindo com a DNA Taq polimerase, inibindo seu correto funcionamento e, consequentemente, impedindo a amplificação. A BSA atua interagindo com essas moléculas para que o funcionamento da polimerase não seja prejudicado (Farell e Alexandre, 2012).

Dessa forma, com a hipótese da produção de moléculas impeditivas de PCR pelos isolados fúngicos em mente, foram realizados testes utilizando BSA na reação de PCR. Foram testadas as concentrações de 5% (1 µL) e 10% (2 µL) de BSA na reação. Não houve sucesso na amplificação mesmo com a adição de BSA. Concluiu-se que poderia haver altas concentrações de agentes atuando como impeditivos de PCR e optou-se por realizar a extração novamente com algumas modificações.

Na nova extração, a primeira alteração foi o período de crescimento. Trabalhou-se com micélio com 3 a 4 dias de crescimento, quando a produção e secreção de exopolissacarídeos ainda não era tão abundante. Além disso, CTAB foi adicionado à solução de lise. O CTAB é um detergente catiônico que auxilia na separação de polissacarídeos, proteínas, polifenóis e outros metabólitos secundários no momento da extração de DNA. Esses compostos são os que podem atuar como impeditivos da reação de PCR posteriormente (Azmat et al., 2012). Após a primeira centrifugação era visível a grande quantidade de resíduos depositada no fundo dos microtubos, indicando a retirada de uma quantidade significativamente maior de resíduos em comparação à primeira extração. No momento da limpeza com a solução de clorofórmio e álcool isoamílico também foi possível notar uma grande redução na quantidade de impurezas, incluindo uma boa redução nos polissacarídeos (“efeito chiclete”).

Ao final da extração, a quantificação em Nanodrop revelou excelentes quantidades de DNA, de 500 a 5.000 ng/µL, sendo que para a maioria dos isolados a concentração foi de 2.500 a 3500 ng/µL. A relação entre as absorbâncias 260 e 280 nm foi superior a 2,0 em todas as amostras, indicando boa qualidade do DNA genômico extraído.

Uma nova reação de PCR foi montada utilizando-se 2 µL de BSA como aditivo. Apenas mais uma amostra foi amplificada, a do isolado LSM 68.

Como última estratégia de limpeza e purificação do DNA extraído, realizou-se a purificação em sílica utilizando o kit Wizard ® SV Gel and PCR Clean-up System. Após a purificação com o kit uma nova reação de PCR foi realizada com 2 µL de BSA como aditivo e obteve-se sucesso para mais algumas amostras, as dos isolados LSM 20, 24, 72, 182 e 211, porém com bandas pouco intensas quando a amplificação foi verificada em gel de agarose.

A partir desse ponto, iniciou-se uma busca literária aprofundada e a troca de experiências com colaboradores externos, as quais permitiram elaborar uma nova hipótese, a de que após executar todos os processos de limpeza possíveis (em nossa estrutura laboratorial) do DNA genômico e otimizar a reação de PCR para reduzir o efeito dos agentes impeditivos do processo, o “problema final” a ser resolvido poderia estar no próprio DNA, o qual poderia apresentar as regiões a serem amplificadas com alto conteúdo GC.

Nesse caso, o alto conteúdo GC nos fragmentos de DNA leva à formação de estruturas secundárias que dificultam a desnaturação da fita para que possa ocorrer o anelamento e a amplificação do DNA alvo. A literatura recomenda o uso de solventes orgânicos, como formamida, DMSO, entre outros, como aditivos para PCR nesses casos. Pela disponibilidade, optou-se pela utilização de DMSO. Na reação de PCR, ele atua como agente desnaturante, interferindo nas ligações de hidrogênio presentes entre as bases nitrogenadas e nas estruturas secundárias formadas devido ao elevado conteúdo GC. Assim, o DMSO atua facilitando a separação das fitas de DNA, reduz a temperatura de *melting* (aquela na qual metade das fitas de DNA encontra-se no estado de hélice e a outra metade em fita simples) e melhora a especificidade do anelamento dos iniciadores.

Além disso, o DMSO aumenta a especificidade e a eficiência da DNA polimerase (Simonovic et al., 2012; Farell e Alexandre, 2012).

Diferentes concentrações de uso de DMSO são indicadas na literatura. Com base na mesma e em comunicação pessoal com outros pesquisadores, optou-se por utilizar DMSO a 0,5% (0,1 µL) na reação de PCR. Além da adição de DMSO a temperatura de anelamento dos iniciadores para a reação de ITS foi alterada para 58°C. Tanto para a região ITS quanto para β-tubulina houve amplificação do DNA de todas as amostras após a adição de DMSO.

Após a purificação das amostras amplificadas, todas as amostras tiveram as duas regiões do DNA sequenciadas com sucesso.

Caracterização *in vitro* do potencial de promoção de crescimento de plantas

Solubilização de Fósforo

Testes em meio sólido

Para realizar uma estimativa qualitativa do potencial dos isolados para a solubilização de fósforo insolúvel, os mesmos foram inoculados em placas de Petri contendo meios de cultura sem uma fonte de fósforo solúvel (Tabela A1) e incubados à temperatura de 25ºC por 7 dias. Os meios possuem coloração branca opaca, e a solubilização do fosfato no meio de cultura foi evidenciada pela formação de um halo transparente ao redor da colônia.

Tabela A1. Composição dos meios de cultura utilizados para a detecção de atividade de solubilização pelos fungos.

Ágar Pikovskaya (Sundara e Sinha, 1963)	**Ágar para atividade de solubilização (Nahas et al., 1994)**
Extrato de levedura ... 0,5 g	Cloreto de sódio (NaCl) ... 0,1 g
Dextrose ... 10,0 g	Cloreto de amônio (NH_4Cl) ... 1,0 g
Fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) ... 5,0 g	Cloreto de potássio (KCl) ... 0,2 g
Sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) ... 0,5 g	Cloreto de cálcio ($CaCl_2$) ... 0,1 g
Cloreto de potássio (KCl) ... 0,2 g	Sulfato de magnésio heptaidratado ($MgSO_4.7H_2O$) ... 1,2 g
Sulfato de magnésio ($MgSO_4$) ... 0,1 g	Glicose ... 10,0 g
Sulfato de manganês ($MnSO_4$) ... 0,0001 g	Extrato de levedura ... 0,5 g
Sulfato de ferroso ($FeSO_4$) ... 0,0001 g	Ágar ... 15,0 g
Ágar ... 15,0 g	Água destilada ... 1000 mL
Água destilada ... 1000 mL	**Soluções adicionais

** Para o meio de cultura de Nahas et al. (1994) também foram preparadas soluções de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) a 10% e de fosfato dibásico de potássio também a 10%. Para cada 100 mL de meio de cultura, após a autoclavagem, foram adicionados 3mL de solução de cloreto de cálcio e 2mL de solução de fosfato dibásico de potássio, levando à formação de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) que precipitou e deixou o meio opaco.

Para os testes em meio sólido, os fungos foram inoculados em triplicata (três pontos) na mesma placa de Petri e os halos observados foram qualificados em quatro categorias (Figura A1):

1 - Ø: ausência de halo

2 - +: halo presente mas pouco visível

3 - ++: halo presente e bem evidente

4 - +++: halos presentes e com sobreposição

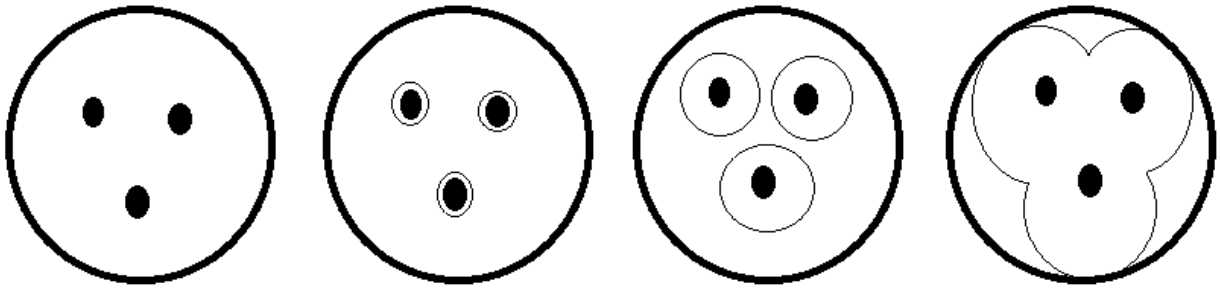


Figura A1. Formas de caracterização da produção de halos de solubilização de fósforo pelos isolados de *Purpureocillium* spp. e *M. marquandii* em meio de cultura sólido de Nahas et al. (1994).

Para o ágar Pikovskaya, apesar do desenvolvimento evidente do micélio, não houve a formação de halos. O meio é bastante opaco e dificultou a observação do potencial de solubilização de fósforo pelos micro-organismos testados. Na Tabela A2 encontram-se categorizadas as leituras visuais obtidas das placas contendo meio de cultura de Nahas et al. (1994). Para todas as culturas houve a detecção da formação de halos de solubilização de fósforo. Apenas o isolado 42 apresentou halo pouco visível (+), enquanto os isolados 18, 21 e 68 apresentaram halo evidente (++) e os demais apresentaram formação de grandes halos que se sobrepuseram no meio de cultura (+++). Em todas as placas foi observado bom crescimento do micélio, exceto para o isolado 42.

Tabela A2. Caracterização dos halos de solubilização de fósforo dos isolados fúngicos de *Purpureocillium* spp. e *M. marquandii* em meio de cultura de Nahas et al. (1994).

Cód. LSM	Carac. halo	Cód. LSM	Carac. halo	Cód. LSM	Carac. halo
6	+++ *	42	+	77	+++ *
13	+++	59	+++	78	+++
14	+++	62	+++	175	+++
17	+++ *	63	+++	177	+++
18	++	65	+++	178	+++ *
19	+++	67	+++ *	179	+++ *
20	+++	68	++	182	+++ *
21	++	72	+++	183	+++
22	+++	73	+++ *	187	+++
24	+++	74	+++ *	211	+++

* A marcação indica placas que apresentaram halos sobrepostos que chegaram a cobrir toda a placa, não havendo pontos onde fosse visível a presença de fósforo não solubilizado no meio de cultura.

Dada a dificuldade de seleção dos melhores isolados em meio de cultura sólido, optou-se pela execução do teste de solubilização em meio líquido (Nahas et al., 1994 - sem a adição de ágar) com leitura em espectrofotômetro e análise conjunta da produção de biomassa.

Teste em meio líquido com posterior análise espectrofotométrica

Em busca de uma análise quantitativa da capacidade de solubilização de fósforo em meio líquido, foram preparados erlenmeyers contendo meio líquido de Nahas et al. (1994) (Tabela A1). A obtenção do fósforo insolúvel foi feita da mesma maneira que no meio sólido, misturando-se as soluções de fosfato dibásico de potássio e cloreto de cálcio, e os frascos foram inoculados com discos de 8 mm de diâmetro de ágar BDA contendo micélio cultivado por 7 dias.

Os frascos foram incubados por 7 dias em agitador rotativo com temperatura regulada a 25ºC e rotação de 100 rpm. Após o período de incubação, o meio foi submetido à filtração a vácuo utilizando papel filtro previamente pesado em balança analítica para a separação do micélio do filtrado. Este foi então centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido à análise da quantidade de fósforo solúvel presente seguindo metodologia de Ames (1966), que envolve uma reação colorimétrica e posterior leitura das amostras em espectrofotômetro a 820 nm.

Os valores de absorbância obtidos foram incorporados em uma equação de reta obtida previamente a partir da montagem de uma curva padrão com concentrações definidas de fósforo. Além disso, a biomassa foi seca em estufa a 40ºC por 48h e novamente pesada para obtenção dos valores de massa do micélio, subtraindo-se o valor final, do valor inicial do filtro previamente pesado. Por fim, os valores de fósforo obtidos foram divididos pela biomassa obtendo-se como valor final para análise a quantidade de miligramas de fósforo solubilizado por grama de micélio produzido (mg P/ g).

O teste foi realizado na forma de delineamento inteiramente casualizado, sendo cada isolado considerado como um tratamento, com três repetições. Os dados foram analisados comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Tabela A3 apresenta as médias obtidas para cada isolado testado juntamente à sua comparação pelo teste estatístico, demonstrando que os isolados LSM 19, 182, 22, 175, 178 e 77 de *P. lilacinum* foram os mais eficientes na solubilização de fósforo em meio líquido, embora a significância estatística tenha ocorrido apenas para o isolado LSM

68 de *M. marquandii*, que demonstrou baixa capacidade de solubilização em relação aos demais isolados.

Tabela A3. Análise de variância das médias dos valores de fósforo solubilizado em meio de cultura (mg P/ g micélio) pelos isolados de *Purpureocillium* spp. e *M. marquandii*. As letras que seguem os valores indicam a similaridade estatística dos dados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Cód. LSM	mg P/g micélio	Cód. LSM	mg P/g micélio	Cód. LSM	mg P/g micélio
19	234,10520 a	59	194,87600 ab	20	168,96873 ab
182	229,16930 a	65	188,61420 ab	211	160,60933 ab
22	222,72950 a	78	181,52737 ab	183	156,01887 ab
175	214,60180 a	13	180,02587 ab	179	152,80667 ab
178	213,47413 a	42	179,30503 ab	67	145,56330 ab
77	210,95087 a	63	174,96477 ab	6	143,30597 ab
74	201,43443 ab	73	174,70073 ab	177	131,58027 ab
187	200,95730 ab	72	171,90113 ab	18	126,53590 ab
62	200,94190 ab	17	171,39610 ab	21	118,76067 ab
24	197,36643 ab	14	169,39233 ab	68	91,754533 b
DMS 5% = 118,1275					

Entretanto, algumas inconsistências foram observadas na execução dessa metodologia. Por exemplo, para o filtrado do controle do teste, que não recebeu inóculo, no momento da reação colorimétrica observou-se a formação de cor, que era detectada no momento da leitura em espectrofotômetro, indicando a imperfeição da estequiometria da reação de precipitação entre fosfato dibásico de potássio e cloreto de cálcio, que,

incompleta, permitia a presença de fosfato solúvel no meio de cultura, fato que pode ter interferido nos resultados de solubilização obtidos. Além disso, visualmente a presença do fosfato de cálcio deixa o meio turvo, com aspecto leitoso. Conforme a solubilização do mesmo acontece, o meio torna-se cristalino. Alguns isolados visivelmente mudaram a turbidez do meio mais que outros, porém, a diferenciação visual não foi coerente com os valores obtidos nas leituras de absorbância.

Como a triagem em meio sólido demonstrou a habilidade dos isolados em solubilizar muito bem o fosfato tricálcico, e o teste em meio líquido além de não elucidar os melhores solubilizadores apresentou inconsistências, julgou-se pertinente e complementar, o teste com a fluorapatita (item 3.3.1 da seção Material e Métodos).

Produção de ácido indolacético (AIA)

Para a detecção da produção de AIA, previamente à execução do teste com meio DYGS (item 3.3.2 da seção Material e Métodos) foi realizado um teste com meio líquido FAN (Tabela A4), segundo a metodologia descrita por Oliveira et al., 2012. O meio foi preparado em erlenmeyers contendo 50mL do mesmo e foi inoculado com três discos de 8 mm de diâmetro de micélio crescido em BDA por 7 dias. A incubação foi feita em agitador de rotação circular a 100 rpm, 25ºC por 7 dias. Após a incubação, o meio foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado. Ao sobrenadante foi adicionado o reagente de Salkowski (Tabela A4) na proporção de 2 partes do sobrenadante para 1 do reagente. A mistura foi incubada no escuro por 25 minutos e seguiu-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530nm para detectar e quantificar a presença de AIA.

Tabela A4. Composição dos meios de cultura FAN (Oliveira et al., 2012) e do reagente de Salkowski utilizados no teste de detecção da produção de AIA.

Meio FAN	Reagente de Salkowski
Glicose ... 20,0g	Cloreto férrico ($FeCl_3$) ... 0,5mol/L
Extrato de levedura ... 3,0g	Ácido perclórico ($HClO_4$) ... 35%
Fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) ... 0,6g	
Sulfato de magnésio ($MgSO_4$) ... 0,3g	
L-triptofano ... 100mg/L	

Na Tabela A5 encontram-se os dados para a produção de AIA em meio FAN. São apresentadas as médias das três repetições com a análise estatística. Como pode ser observado, os isolados que apresentaram melhor desempenho no teste, produzindo maiores quantidades de AIA, foram LSM 65 (*P. lilacinum*), 68 (*M. marquandii*) e 17 (*P. lilacinum*), respectivamente.

Entretanto, o uso da metodologia com o meio FAN não foi considerado consistente, uma vez que houve a produção e secreção de exopolissacarídeos, em menor ou maior grau, por todos os isolados, o que tornou o meio gelatinoso e dificultou a leitura de absorbância das amostras em espectrofotômetro. Ainda devido à essa secreção, a obtenção da biomassa foi dificultada, sendo que o filtrado foi obtido por meio de centrifugação, e, por isso, os dados de produção em meio FAN são apresentados em µg AIA/ mL de meio, e não por grama de micélio. Sendo assim, julgou-se necessária a realização de novos testes com um novo meio de cultura que fosse mais adequado para a análise requerida, optando-se pela metodologia de Milani (2017).

Tabela A5. Análise de variância das médias dos valores de microgramas de AIA produzidos em meio por mL de meio FAN (µg AIA/ mL) pelos isolados de *Purpureocillium* spp. e *M. marquandii*. As letras que seguem os valores indicam a similaridade estatística dos dados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Cód. LSM	µg AIA/mL	Cód. LSM	µg AIA/mL	Cód. LSM	µg AIA/mL
65	9,506 a	178	3,957 bcd	183	2,455 d
68	6,984 ab	67	3,879 bcd	42	2,433 d
17	6,628 abc	24	3,864 bcd	77	2,276 d
13	5,574 bcd	73	3,786 bcd	59	2,255 d
179	5,175 bcd	182	3,523 bcd	18	2,184 d
20	4,662 bcd	14	2,939 cd	177	2,184 d
211	4,620 bcd	19	2,932 cd	21	2,169 d
78	4,534 bcd	62	2,889 cd	63	2,120 d
6	4,384 bcd	72	2,740 d	175	2,119 d
187	3,957 bcd	74	2,469 d	22	2,077 d
DMS 5% = 3,814					

Na metodologia com o meio DYGS nenhuma dificuldade, especificamente relacionada à produção de exopolissacarídeos, foi encontrada. O fato de o isolado LSM 65 ter destacado-se em ambos os testes (Figura 5 na seção Resultados e Discussão) demonstra que apesar da dificuldade encontrada no teste com meio FAN, devido à produção de exopolissacarídeos, na ausência desse impecílio o método poderia ter oferecido resultados satisfatórios. A metodologia de Oliveira et al. (2012) foi desenvolvida

com isolados de *Trichoderma* e tal característica não é relatada, levando a concluir que foi um fato associado especificamente ao grupo de fungos em estudo.

Produção de quitinases

Teste de produção de quitinases em meio sólido

Para detecção da produção de quitinases, inicialmente foram executados testes em meio de cultura sólido, visando a observação da formação de halos de degradação de quitina. O primeiro meio testado foi o Czapek, sendo a fonte de carbono do meio, a sacarose, substituída por quitina coloidal a 1% como única fonte de carbono (Tabela A6). Depois, foi testado o meio de Renwick (Renwick et al., 1991) no qual a quitina coloidal atuou como única fonte de carbono e nitrogênio (Tabela A6). Para fins comparativos, foi utilizada a linhagem de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 (Instituto Biológico de Campinas) como controle positivo, pois trata-se de uma espécie entomopatógena, com capacidade de produção de quitinases já conhecida. As placas foram incubadas a 25ºC durante 14 dias. A produção de quitinases deveria ser constatada mediante a formação de um halo transparente ao redor da colônia, uma vez que os meios de cultivo apresentam aspecto leitoso em decorrência da quitina coloidal. As avaliações foram realizadas aos 7 e 14 dias após a inoculação.

Tabela A6. Composição dos meios de cultura utilizados para detecção da atividade de quitinases.

Ágar CzapeK c/ quitina coloidal 1%	Meio Renwick
Fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) ... 1,0 g	Carbonato de cálcio ($CaCo_3$) ... 0,2 g
Sulfato de magnésio heptaidratado ($MgSO_4.7H_2O$) ... 0,5 g	Sulfato ferrosol ($FeSO_4$. $7H_2O$) ... 0,01 g
Sulfato ferroso heptaidratado ($FeSO_4.7H_2O$) ... 0,01 g	Cloreto de potássio (KCl) ... 1,71 g
Cloreto de potássio (KCl) ... 0,5 g	Fosfato monobásico de sódio (Na_2HPO_4 . 12 H_2O) ... 4,11 g
Nitrato de sódio ($NaNO_3$) ... 3,0 g	Sulfato de magnésio ($MgSO_4.7H_2O$) ... 0,05 g
Quitina coloidal * ... 10,0 g (1%)	Quitina coloidal* … 8 mg/ mL
Ágar ... 15,0 g	Ágar … 15,0 g
Água destilada ... 1000 mL	Água destilada … 1000 mL
	pH ajustado para 5,5

;

Para o cultivo em ágar Czapek modificado, no qual a fonte de carbono (sacarose) foi substituída por quitina coloidal a 1% (10 g/L), todos os isolados apresentaram crescimento micelial no meio de cultura, entretanto não houve a formação de halo de degradação para a maioria dos isolados. Além disso, para as colônias que apresentaram a formação de halo, o mesmo não foi superior a 2 mm (isolados 18 de *P. lavendulum* e 62 de *P. lilacinum*) (Tabela A7).

Apesar da ausência de formação do halo, todos os isolados apresentaram crescimento no meio de cultura, produzindo hifas e esporulando, o que indica que foram capazes de utilizar a única fonte de carbono que se encontrava disponível no meio de cultura, a quitina. Dessa forma, todos os isolados foram considerados portadores da

habilidade de produzir quitinases, sendo o isolado LSM 62 de *P. lilacinum* (Figura A2) considerado o que poderia apresentar maior produção dessa enzima em virtude da formação do maior halo de degradação, seguido pelo isolado 18 de *P*. *lavendulum*.

Tabela A7. Detecção da atividade de quitinases para os isolados de *Purpureocillium* spp. e *M. marquandii* mediante teste de crescimento em ágar Czapek modificado com 1% de quitina coloidal. Caixas com o sinal "-" indicam ausência de halo.

Cód. LSM	Formação de halo (mm)			Cód. LSM	Formação de halo (mm)		
	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
6	1,0	1,0	1,0	67	1,0	1,0	1,0
13	-	-	-	68	-	-	-
14	-	-	-	72	1,0	1,0	-
17	1,0	1,0	1,0	73	1,0	1,0	-
18	1,0	2,0	2,0	74	-	-	-
19	-	-	-	77	-	-	-
20	-	-	-	78	-	-	-
21	1,0	1,0	-	175	1,0	-	-
22	-	-	-	177	-	-	-
24	-	-	-	178	1,0	1,0	1,0
42	1,0	1,0	-	179	1,0	1,0	1,0
59	-	-	-	182	-	-	-
62	2,0	2,0	2,0	183	-	-	-
63	-	-	-	187	-	-	-
65	-	-	-	211	1,0	1,0	1,0

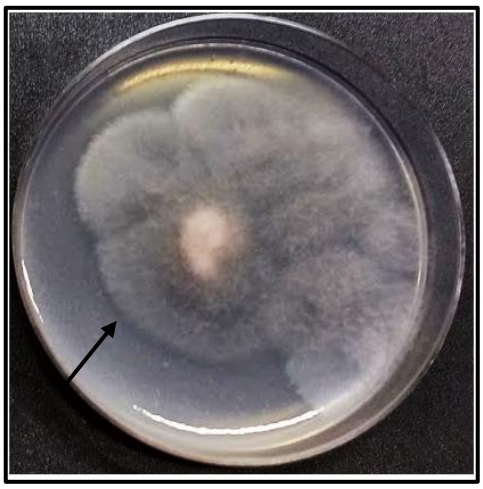


Figura A2. Crescimento do isolado 62 de *P. lilacinum* em ágar Czapek modificado com 1% de quitina coloidal como única fonte de carbono disponível. Ao redor da colônia pode ser observada a formação de um pequeno halo (2mm) (seta) indicativo da produção e secreção de quitinases.

Para o ágar de Renwick foram obtidos resultados semelhantes. Apesar do crescimento micelial ter ocorrido, não foram observados halos de degradação de quitina. Entretanto, no controle positivo houve a formação do halo para a linhagem de *M. anisopliae* IBCB425, como pode ser observado na Figura A3, a qual apresenta o isolado LSM 62 de *P. lilacinum* ao lado dessa linhagem.

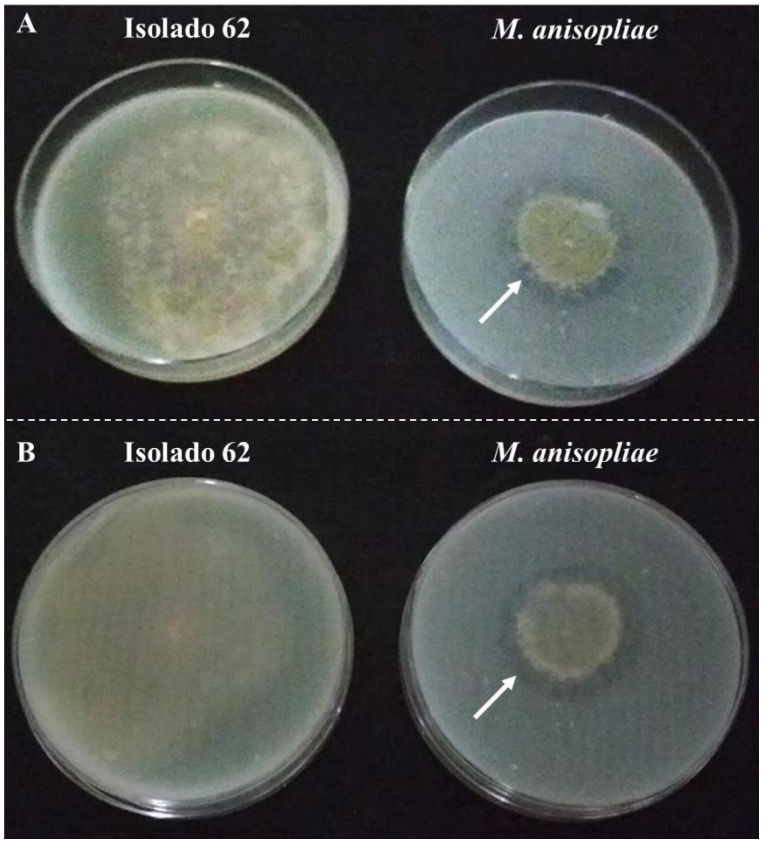


Figura A3. Teste de produção de quitinases em ágar Renwick contendo quitina coloidal como única fonte de carbono e nitrogênio. A figura ilustra a comparação do crescimento do isolado 62 de *P. lilacinum* com a linhagem IBCB425 de *M. anisopliae.* Figura A – vista frontal. Figura B – reverso da placa. A seta indica o halo de degradação de quitina formado apenas no controle positivo pela linhagem de *M. anisopliae* IBCB425.

Teste de produção de quitinases em meio líquido

Dados os resultados obtidos com os testes em meio sólido, optou-se pela tentativa de quantificar a produção de quitinases com testes em meio líquido. No primeiro, foram preparados erlenmeyrs de 250 mL contendo 50 mL de meio líquido Czapek modificado contendo apenas quitina coloidal a 1% como única fonte de carbono (Tabela A6).

Também foi realizado o mesmo teste com caldo Renwick (Tabela A6), preparado de forma idêntica. Cada amostra foi preparada, inoculada em triplicata com três discos de 8 mm de micélio ativo (7 dias de crescimento em BDA) e incubada sob agitação a 25 °C, 100 rpm, por dois períodos diferentes, 3 e 7 dias. A linhagem de *M. anisopliae* IBCB425 foi utilizada como controle positivo no teste.

Após o período de incubação, o meio foi filtrado a vácuo utilizando-se papel filtro previamente pesado em balança analítica. O filtrado foi utilizado para a detecção da atividade de quitinases, a qual se deu por análise espectrofotométrica com leitura a 575 nm segundo a metodologia de detecção de açúcares redutores com o reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalisílico) de Miller (1959). O papel filtro com a biomassa foi seco em estufa a 40ºC por 48h e novamente pesado para obtenção dos valores de massa do micélio, subtraindo-se o valor final, do valor inicial do papel filtro previamente pesado.

No Segundo teste, seguiu-se a metodologia de Agrawall e Kotasthane (2012), na qual três discos de 8 mm de micélio ativo (crescimento em BDA por 7 dias) foram inoculados em frascos contendo meio basal líquido (Tabela 5 do item 3.3.3 da seção Material e Métodos) sem o indicador púrpura de bromocresol e foram incubados a 28ºC por 5 dias sob agitação de 200 rpm. Após esse período o meio foi filtrado em papel filtro Whatman nº 1. Amostras de 1mL do filtrado foram coletadas e a esse volume foram adicionados 0,3 mL de tampão acetato de sódio 1M, pH 4,6 e 0,2 mL de solução de quitina coloidal. A mistura foi incubada a 40ºC por 20 horas e então centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos a 6ºC. Desse sobrenadante foram aliquotados 750 µL, aos quais foram adicionados 250 µL de solução de ácido dinitrosalicílico (DNS) 1% em NaOH 0,7 M e 100 µL de NaOH 10 M. A mistura foi aquecida a 100ºC por 5 minutos e então, após resfriamento à temperatura ambiente, realizou-se a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 582 nm.

Para comparação, uma curva padrão com N-acetilglicosamina foi elaborada, variando entre as concentrações de 40 a 800 mg/mL do açúcar. Como referência foi utilizado o extrato oriundo da linhagem *M. anisopliae* IBCB425.

Em ambos os testes a tentativa foi a de detectar e quantificar a produção de quitinases mediante a constatação da formação do produto de degradação da quitina, a

N-acetilglicosamina. A quitina é um homopolissacarídeo, ou seja, é composta por um único tipo de monômero, no caso, a N-acetilglicosamina, que é um açúcar redutor. Os açúcares redutores possuem o carbono anomérico (C1) livre, que pode ser oxidado.

Segundo Miller (1959) os açúcares redutores podem ser oxidados na presença do DNS que, consequentemente, sofre redução e é convertido em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, que possui coloração marrom. Assim, quanto maior a concentração de açúcares redutores, como a N-acetilglicosamina, na reação, mais intensa será a coloração.

A primeira avaliação foi feita na forma de piloto, com o caldo Czapek modificado contendo quitina coloidal e foram testados os isolados LSM 62 e 177 de *P. lilacinum* com período de incubação de 7 dias. Visualmente era possível notar a ausência de turbidez do meio, o mesmo tornou-se cristalino para ambos os isolados, indicando o consumo praticamente total da quitina coloidal. Entretanto, quando o sobrenadante foi submetido à reação com o DNS não houve mudança de coloração e a leitura a 575 nm foi nula.

Como o meio tornou-se cristalino e as leituras indicaram a ausência de N-acetilglicosamina, admitiu-se que o período de 7 dias poderia ter sido suficiente para que toda a quitina fosse consumida pelos fungos, não restando monômeros para a avaliação. Dessa forma, o teste foi repetido com 3 dias de incubação. Essa etapa também foi cumprida como piloto e foi adicionada a linhagem de *M. anisopliae* IBCB425 como controle positivo.

Após 3 dias de incubação, notou-se que houve o consumo de quitina coloidal pelos fungos, especialmente no controle positivo com *M. anisopliae*, em relação ao branco. Entretanto, novamente o teste de revelação com DNS não foi efetivo e apenas leituras nulas foram obtidas. Em ambos os ensaios piloto, uma curva padrão utilizado N-acetilglicosamina na reação com DNS foi construída, indicando a viabilidade dos reagentes utilizados. Após a execução dos dois pilotos e de novos testes com cinco dias com meio Czapek, a metodologia foi considerada ineficiente para os fins desejados. Além disso, na troca do caldo Czapek por Renwick os resultados foram semelhantes.

Posteriormente, foi executada a metodologia de quantificação da atividade de quitinases como proposta por Agrawall e Kotasthane (2012), entretanto, o mesmo padrão

encontrado para os testes anteriores ocorreu, e não foi possível quantificar a atividade de quitinases.

Após tantas tentativas e pelas dificuldades encontradas devido à produção de compostos que interferiram na análise molecular e na detecção da produção de AIA não foi possível concluir qual foi o problema relacionado à falta de sucesso nessa análise. O teste em meio basal sólido (item 3.3.3 da seção Material e Métodos) revelou que apesar de por vezes pequena, a produção de quitinases ocorre.