

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

Caracterização de *Trichoderma* spp. produtores de ácido indolacético e solubilizadores de fósforo: efeitos no crescimento inicial de plantas

Renato Boreli Silva
Engenheiro agrônomo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

Caracterização de *Trichoderma* spp. produtores de ácido indolacético e solubilizadores de fósforo: efeitos no crescimento inicial de plantas

Renato Boreli Silva

Orientador: Prof. Dr. André Rodrigues dos Reis

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

Ficha catalográfica

S586c	<p>Silva, Renato Boreli</p> <p>Caracterização de <i>Trichoderma</i> spp. produtores de ácido indolacético e solubilizadores de fósforo: efeitos no crescimento inicial de plantas / Renato Boreli Silva. -- Jaboticabal, 2024</p> <p>150 p. : il., tabs., fotos, mapas</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientador: André Rodrigues dos Reis</p> <p>1. <i>Trichoderma</i>. 2. Plantas Efeito da auxina. 3. Crescimento (Plantas). 4. Metabolismo regulação. 5. Estresse oxidativo. I. Título.</p>
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

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

Impacto potencial desta pesquisa

A utilização de microrganismos benéficos na agricultura intensificou nas últimas décadas, principalmente no controle de doenças de plantas e recentemente pesquisas com foco na promoção do crescimento e atenuação de estresses ambientais vem sendo fortemente investigadas. A alta capacidade de isolados nativos do fungo *Trichoderma* spp. em produzir auxina, o fitohormônio de crescimento e estresse das plantas e a solubilização de fósforo, um macronutriente essencial e de baixa disponibilidade nos solos, são potenciais candidatos para a utilização nos cultivos e o entendimento da interação desses isolados com as plantas em condições de ausência e estresse ambiental, permite maior compreensão dos efeitos na promoção ou regulação do crescimento das plantas. O resultado obtido dessa pesquisa traz elucidações dos mecanismos de modulação do metabolismo hormonal e antioxidante das plantas por isolados nativos do fungo benéfico *Trichoderma* spp. com alta habilidade de produção do fitohormônio auxina, ácido indolacético (AIA), que demonstraram promover a adaptação as plantas nas condições de ambiente, atenuando o estresse nutricional e regulando o crescimento das plantas. Estresses ambientais como a falta e excesso de chuvas, altas temperaturas, solos de baixa fertilidade e salinos são fatores que prejudicam a produção de alimentos, trazendo consequências negativas que afetam a economia e a sociedade, pelo aumento dos preços e baixa qualidade dos alimentos produzidos. A presente pesquisa buscou atender o objetivo 2, item 2.4 da Organização de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) que dispõe até 2030, garantir sistemas sustentáveis de produção de alimentos e implementar práticas agrícolas resilientes, que aumentem a produtividade e a produção, que fortaleçam a capacidade de adaptação às mudanças climáticas e que melhorem progressivamente a qualidade da terra e do solo. O estudo e desenvolvimento de bioprodutos a base de microrganismos capazes de regular e atenuar os estresses ambientais que afetam as culturas agrícolas são importantes ferramentas de manejo sustentáveis para a agricultura, trazendo benefícios econômicos, ambientais e sociais.

Potential impact of this research

The use of beneficial microorganisms in agriculture has intensified in recent decades, mainly in the control of plant diseases and recently research focusing on promoting growth and mitigating environmental stresses has been heavily investigated. The high capacity of native isolates of the fungus *Trichoderma* spp. in producing auxin, the plant growth and stress phytohormone and the solubilization of phosphorus, an essential macronutrient with low availability in soils, are potential candidates for use in crops and understanding the interaction of these isolates with plants in conditions of absence and environmental stress, allows greater understanding of the effects on promoting or regulating plant growth. The result obtained from this research provides elucidation of the mechanisms of modulation of hormonal and antioxidant metabolism in plants by native isolates of the beneficial fungus *Trichoderma* spp. with high ability to produce the auxin phytohormone, indoleacetic acid (IAA), which has been shown to promote plant adaptation to environmental conditions, mitigating nutritional stress and regulating plant growth. Environmental stresses such as lack and excess rainfall, high temperatures, low fertility and saline soils are factors that harm food production, bringing negative consequences that affect the economy and society, through increased prices and low quality of the food produced. This research sought to meet objective 2, item 2.4 of the United Nations (UN) Sustainable Development Organization (SDG), which provides until 2030, to guarantee sustainable food production systems and implement resilient agricultural practices, which increase productivity and production, which strengthen the capacity to adapt to climate change and which progressively improve the quality of land and soil. The study and development of bioproducts based on microorganisms capable of regulating and mitigating environmental stresses that affect agricultural crops are important sustainable management tools for agriculture, bringing economic, environmental and social benefits.


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. PRODUTORES DE ÁCIDO INDOLACÉTICO E SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO: EFEITOS NO CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS


AUTOR: RENATO BORELI SILVA

ORIENTADOR: ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal), pela Comissão Examinadora:


Documento assinado digitalmente
 **ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS**
Data: 07/05/2024 17:44:06-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / FCE UNESP Tupã


Documento assinado digitalmente
 **SERGIO MIGUEL MAZARO**
Data: 08/05/2024 13:31:54-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. SERGIO MIGUEL MAZARO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Agrárias / Universidade Tecnológica Federal do Parana (UTFPR) - Campos Dois Vizinhos/PR


Pesquisador Dr. CASSIANO FORNER (Participação Virtual)
Departamento de Plant Health / FMC Company Agriculture Science - Paulínia/SP

Documento assinado digitalmente
 **CASSIANO FORNER**
Data: 10/05/2024 08:27:29-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Pós-doutorando PEDRO HENRIQUE GORNI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **PEDRO HENRIQUE GORNI**
Data: 11/05/2024 13:00:23-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. CLEVERSON RODRIGUES (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Biosistemas / FCE UNESP Tupã

Documento assinado digitalmente
 **CLEVERSON RODRIGUES**
Data: 11/05/2024 14:28:44-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Jaboticabal, 07 de maio de 2024

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Renato Boreli Silva - Nascido na cidade de Patos de Minas, no dia 17 de agosto de 1986. Em 2008, obteve o título de engenheiro agrônomo pelo Centro Universitário de Patos de Minas-UNIPAM. Em 2013 obteve o título de mestre em Agronomia, área de concentração em Proteção de plantas, pela Universidade Estadual Paulista-UNESP, Câmpus Botucatu. Em agosto de 2020 ingressou no Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), da Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. André Rodrigues dos Reis desenvolvendo o trabalho “Caracterização de *Trichoderma* spp. produtores de ácido indolacético e solubilizadores de fósforo: efeitos no crescimento inicial de plantas”.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Nossa Senhora Aparecida, por guiarem meu caminho para as melhores escolhas.

À minha mãe Rojuhercymar Boreli Soares, meu pai Rigomar Soares da Silva e minhas irmãs Jéssica Lais Boreli Silva e Isabella Boreli Silva, pelo incentivo em todos os momentos.

Ao meu orientador, professor Dr. André Rodrigues dos Reis, pela oportunidade de ser seu orientado, pelos ensinamentos transmitidos sobre fisiologia vegetal e bioquímica de plantas, bem como pelo exemplo de determinação na sua vida profissional e pessoal.

Aos meus queridos amigos Cleverson Rodrigues, Lara Caroline Alves de Oliveira, Nandhara Angélica Carvalho Mendes, Ana Carolina Roque Cardoso, Vinicius Martins Silva, Pedro Henrique Gorni e Kamille Daleck Spera, que além da ajuda nas análises dos experimentos, a companhia e o acolhimento em todos os momentos desse grande desafio foram as mais valiosas.

A oportunidade me fornecida pela Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus Jaboticabal para realizar o Doutorado.

Ao Centro Universitário Padre Albino-UNIFIPA pela disponibilidade de sua estrutura e recursos para o desenvolvimento inicial dos experimentos, em especial João Paulo Ferreira, pela amizade, incentivo e apoio.

A FCM Agricultural Sciences Company pela disponibilidade de sua estrutura e recursos para o desenvolvimento dos experimentos em casa de vegetação, em especial Luiz Demant, Cassiano Forner, Jeanny Alice Velloso, Guilherme Florindo Bazzana Bosco, Carlos Bernardo e Victor Lino Carvalho da Silva pelo incentivo, amizade e ajuda nas avaliações dos ensaios.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais	9
1.1 <i>Trichoderma</i> spp. como bioestimulante de plantas: promotor ou regulador do crescimento?.....	9
1.2 Introdução.....	9
1.3 Revisão de literatura.....	11
1.3.1 Gênero <i>Trichoderma</i> : O Super-Fungo oportunista e simbiote	11
1.3.2 Produção de AIA por <i>Trichoderma</i> spp. e estudos na promoção do crescimento em plantas	24
1.3.3 O Papel das auxinas e flavonoides na modulação do crescimento das plantas.....	27
1.4 Conclusões e perspectivas.....	33
1.5 Referências	33
CAPÍTULO 2- Isolamento e caracterização de isolados nativos de <i>Trichoderma</i> spp. quanto a solubilização de fosfato de ferro e produção de AIA	45
2.1 Introdução	45
2.2 Material e Métodos.....	47
2.2.1 Isolamento de <i>Trichoderma</i> spp. nativos associados a cana-de-açúcar	47
2.2.2 Capacidade de solubilização de fosfato de ferro (FePO ₄)	52
2.2.3 Capacidade de produção de ácido indolacético (AIA).....	53
2.2.4 Análise estatística.....	54
2.3 Resultados e Discussão.....	55
2.3.1 Solubilização de FePO ₄ pelos isolados nativos de <i>Trichoderma</i> spp.	58
2.3.2 Produção de AIA pelos isolados nativos de <i>Trichoderma</i> spp.	62
2.4 Conclusão	66

2.5 Referências	67
CAPÍTULO 3 - Efeitos de <i>Trichoderma</i> spp. nativos com alta produção de AIA e solubilização de P no crescimento inicial e metabolismo bioquímico de plantas de milho sob estresse nutricional	71
3.1 Introdução	71
3.2 Material e Métodos.....	72
3.2.1 Isolados nativos de <i>Trichoderma</i> spp.	73
3.2.2 Ensaio de crescimento inicial de plantas de milho var. Airan	73
3.2.3 Análises de crescimento	75
3.2.5 Análise de flavonoides totais, AIA, GA ₃ e açúcares totais	77
3.2.5.1 Açúcares solúveis totais	77
3.2.5.2 Teores de flavonoides totais	78
3.2.5.3 Quantificação de AIA e GA ₃	79
3.2.6 Análises estatísticas	80
3.3 RESULTADOS	81
3.3.1 Efeitos no crescimento inicial das plantas	81
3.3.4 Efeitos no metabolismo bioquímico de flavonoides totais, AIA, GA ₃ e açúcares solúveis totais.....	85
3.4 Discussão dos resultados	100
3.5 Conclusões	104
3.6 Referências	104
CAPÍTULO 4 - Respostas no crescimento e metabolismo bioquímico de genótipo de tomate selvagem cv. Micro-tom e mutante dgt na interação com <i>Trichoderma</i> sp. PI3 produtor de AIA.....	110
4.1 Introdução	110
4.2 Material e métodos	112
4.2.1 Isolado nativo de <i>Trichoderma</i> spp. PI3.....	112

4.2.2 Plantas de tomate micro-tom e dgt.....	112
4.2.3 Ensaio de crescimento inicial em tomate micro-tom e mutante dgt	112
4.2.4 Análises de crescimento das plantas de tomate micro-tom e dgt....	113
3.2.7 Açúcares solúveis totais	116
4.2.8 Análise de flavonoides totais, AIA e GA₃.....	117
4.2.8.1 Teores de flavonoides totais	117
4.2.8.2 Quantificação de AIA e GA₃.....	118
4.2.9 Análises estatísticas	119
4.3 Resultados	120
4.3.1 Efeitos no crescimento inicial de plantas de tomate micro-tom e dgt	120
4.3.5 Efeito no teor de flavonoides totais, AIA e GA₃ em folhas e raízes do tomate micro-tom e dgt	126
4.5 Discussão dos resultados	137
4.6 Conclusão	141
4.7 Referências	141

CARACTERIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. PRODUTORES DE ÁCIDO INDOLACÉTICO E SOLUBILIZADORES DE FÓSFORO: EFEITOS NO CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS

RESUMO - Espécies de *Trichoderma* spp. tem sido investigada pela capacidade de promover o crescimento das plantas e tolerância a estresses abióticos, devido a habilidade de produção de AIA e solubilização de fósforo. Contudo, a alta concentração produzida de AIA pode trazer efeitos positivos, nulos e negativos no crescimento das plantas, nos quais ainda não são bem entendidos. Devido a diversidade das espécies de *Trichoderma* em diferentes condições de ambientes, a seleção de isolados nativos associados a diferentes condições agroecológicas, torna-se importante para o estudo e desenvolvimento de bioestimulantes. Esta pesquisa teve três objetivos: 1) bioprospectar isolados nativos com potencial de solubilização de fósforo e produção de AIA *in vitro*. 2) avaliar os efeitos na promoção ou regulação do crescimento inicial de um genótipo de milho var. Airan IAC, sob condição de estresse nutricional. 3) entender como isolados de *Trichoderma* com alta produção de AIA, promove ou regula o crescimento de micro tomate selvagem (cv. micro-tom) e genótipo mutante dgt (sensível a auxina) na ausência de estresse. Parâmetros de crescimento do comprimento, massa seca da parte aérea e raízes, razão parte aérea/raiz, alterações bioquímicas dos níveis endógenos de AIA, GA₃ e flavonoides da parte aérea/raízes, metabolismo oxidante (peróxido de hidrogênio - H₂O₂ e malondialdeído - MDA) e antioxidante enzimático (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e ascorbato peroxidase (APX) da parte aérea, proteínas totais e açúcares solúveis totais foram avaliados. Os isolados nativos obtidos foram eficientes na solubilização de fosfato de ferro (P-Fe) variando entre 11,6 a 0,2 µg PO₄³⁻.mL⁻¹ de P e alto potencial na produção de AIA, variando entre 0,51 a 623,5 µg AIA.mL⁻¹. Quatro isolados nativos com alta capacidade de produção de AIA (32 a 620 µg/mL⁻¹ AIA) foram utilizados nos ensaios de crescimento do genótipo de milho. Os isolados mostraram diferentes efeitos no crescimento e efeitos positivos foram verificados no comprimento das raízes e relação parte aérea/raiz das plantas de milho e atenuação do estresse oxidativo na condição de estresse nutricional. No ensaio com genótipos de tomate selvagem e mutante, utilizou o isolado nativo PI3, devido sua alta habilidade de produzir AIA *in vitro*, o qual apresentou efeito neutro/nulo no crescimento dos dois genótipos de micro tomate. Contudo, observamos um maior desenvolvimento de raízes adventícias nas plantas inoculadas. Os isolados nativos de *Trichoderma* spp. alteram o metabolismo primário e secundário das plantas, promovendo o balanço hormonal, oxidante e antioxidante, na presença e ausência de estresse do ambiente, melhorando a adaptação do crescimento e desenvolvimento das plantas nas condições do ambiente.

Palavras-chave: Fitohormônios, flavonoides, *Hypocrea*; milho, micro-tomate

CHARACTERIZATION OF *Trichoderma* spp. INDOLACETIC ACID PRODUCERS AND PHOSPHORUS SOLUBILIZERS: EFFECTS ON INITIAL PLANT GROWTH

ABSTRACT – Species of *Trichoderma* spp. has been investigated for its ability to promote plant growth and tolerance to abiotic stresses, due to its ability to produce IAA and solubilize phosphorus. However, the high concentration of IAA produced can have positive, null and negative effects on plant growth, which are not yet well understood. Due to the diversity of *Trichoderma* species in different environmental conditions, the selection of native isolates associated with different agroecological conditions becomes important for the study and development of biostimulants. This research had three objectives: 1) bioprospect native isolates with potential for phosphorus solubilization and IAA production in vitro. 2) evaluate the effects on promoting or regulating the initial growth of a corn genotype var. Airan IAC, under conditions of nutritional stress. 3) understand how *Trichoderma* isolates with high IAA production promote or regulate the growth of wild micro tomato (cv. micro-tom) and dgt mutant genotype (auxin sensitive) in the absence of stress. Length growth parameters, dry mass of shoots and roots, shoot/root ratio, biochemical changes in endogenous levels of IAA, GA₃ and flavonoids in shoots/roots, oxidant metabolism (hydrogen peroxide - H₂O₂ and malondialdehyde - MDA) and enzymatic antioxidant (superoxide dismutase - SOD, catalase - CAT and ascorbate peroxidase (APX) from the aerial part, total proteins and total soluble sugars were evaluated. The native isolates obtained were efficient in the solubilization of iron phosphate (P-Fe) ranging between 11.6 to 0.2 µg PO₄³⁻.mL⁻¹ of P and high potential in the production of IAA, ranging between 0.51 to 623.5 µg IAA.mL⁻¹. Four native isolates with high IAA production capacity (32 to 620 µg IAA.mL⁻¹) were used in the maize genotype growth assays. The isolates showed different effects on growth and positive effects were verified on root length and shoot/root ratio of corn plants and attenuation of oxidative stress under nutritional stress conditions. In the test with wild and mutant tomato genotypes, the native isolate PI3 was used, due to its high ability to produce IAA in vitro, which had a neutral/null effect on the growth of the two micro tomato genotypes. However, we observed a greater development of adventitious roots in the inoculated plants. Native isolates of *Trichoderma* spp. alter the primary and secondary metabolism of plants, promoting hormonal, oxidant and antioxidant balance, in the presence and absence of environmental stress, improving the adaptation of plant growth and development to environmental conditions.

Keywords: Phytohormones, flavonoids, Hypocrea; corn, micro-tomato

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 *Trichoderma* spp. como bioestimulante de plantas: promotor ou regulador do crescimento?

1.2 Introdução

A adoção de tecnologias inovadoras de bioinsumos microbiológicos que promovam o crescimento e a defesa das plantas são novas práticas de agricultura para preencher as lacunas de produtividade ainda existentes, não apenas para o controle de doenças que causam grandes prejuízos econômicos, mas também na promoção de crescimento e atenuação de estresses climáticos.

A agricultura está em fase de transição de mudança de práticas químicas para não-químicas, passando para tecnologias microbianas na forma de bio defensivos e biofertilizantes (Sharma e Sharma, 2020).

Produtos à base de *Trichoderma* spp. têm sido particularmente notados como agentes de controle biológico de sucesso contra diferentes fitopatógenos do solo e indutores de resistência a estresses bióticos (Singh et al., 2018; Sharma e Sharma, 2020; Alizadeh et al., 2024). Além do sucesso como agente de biocontrole, isolados de *Trichoderma* spp. provaram ter atividade bioestimulante, promoção do crescimento da planta, melhor rendimento e qualidade dos alimentos, e mitigador dos efeitos prejudiciais dos estresses abióticos (Sood et al., 2020; Tyskiewicz et al., 2022; Woo et al., 2023).

Espécies de *Trichoderma* spp. são capazes de promover o crescimento das plantas através de mecanismos indiretos, como a solubilização de fosfatos, potássio, produção de enzimas fosfatases, sideróforos e fitohormônios (Bader et al., 2020; Bononi et al., 2020; Chen et al., 2021; Tyskiewicz et al., 2022).

A produção de ácido indolacético (AIA) por microrganismos do solo e da rizosfera, incluindo *Trichoderma* spp., tem sido relacionado com a promoção do crescimento das plantas, mediante a modificação da arquitetura da raiz, crescimento e aumento dos pelos radiculares, resultando no aumento da biomassa radicular e

consequentemente, maior absorção de água e nutrientes pelas plantas (Contreras-Cornejo et al., 2009; Nieto-Jacobs et al., 2017; Bader et al., 2020; Abdenaceur et al., 2022). No entanto, diferenças contrastantes são observadas em experimentos de promoção de crescimento com *Trichoderma* produtores de AIA, com efeitos negativos, neutros e positivos no crescimento das plantas, sugerindo que os mecanismos envolvidos são multivariáveis e dependentes das condições ambientais (Nieto-Jacobo et al., 2017).

A correlação entre a síntese de AIA e a promoção do crescimento das plantas em sistemas baseados no solo é menos convincente, visto que muitos isolados de *Trichoderma* spp. são capazes de sintetizar AIA, mas poucos podem promover o crescimento das plantas (Hoyos-Carvajal et al., 2009; Nieto-Jacobo et al., 2017).

O AIA sintetizado por microrganismos associados às raízes das plantas podem interferir no seu desenvolvimento, perturbando o equilíbrio de auxinas nas plantas (Contreras-Cornejo et al., 2009; Nieto-Jacobo et al., 2017). O efeito da inoculação com isolados de *Trichoderma* spp. em plantas em condições naturais podem depender do tipo e concentração de auxinas produzidas pelos fungos (Contreras-Cornejo et al., 2009). Os autores demonstraram que a aplicação de compostos de AIA produzido por *T. virens* em plantas de *Arabidopsis* teve efeito dose-dependente no seu crescimento, aumentando a biomassa da planta em pequenas quantidades, mas inibindo o crescimento em concentrações mais altas.

A variação na resposta de crescimento das plantas pela ação de auxina é complexa e envolve a participação de flavonoides na interação planta-microrganismo bem como na modulação de proteínas de transporte de auxinas nas plantas (Sukumar et al., 2013; Kurepa et al., 2023).

Os flavonoides são importantes inibidores de transportadores de auxina na modulação da concentração de auxina em níveis celulares e intercelulares. Por outro lado, os flavonoides podem determinar gradientes em concentração de auxina em nível celular e tecidual, principalmente modulando o catabolismo da auxina, agindo como eliminadores de EROs (Pollastri e Tattini, 2011; Peer et al., 2011, 2013; Zhang e Peer, 2017).

A capacidade dos flavonoides de modular EROs, bem como a sinalização de AIA pode ajudar a explicar seu envolvimento nas respostas morfogênicas induzidas

pelo estresse, uma resposta geral das plantas “adaptarem” as condições ambientais adversas (Brunetti et al., 2018).

Essa revisão tem como objetivo dar à luz ao estado da arte sobre a ação do AIA produzido por *Trichoderma* e a interação com flavonoides e EROs nas respostas de promoção ou regulação do crescimento das plantas.

1.3 Revisão de literatura

1.3.1 Gênero *Trichoderma*: O Super-Fungo oportunista e simbiote

O Gênero *Trichoderma* foi descrito por Christiaan Hendrik Persoon (Pers.) em 1794 e corresponde a fungos filamentosos eficientes colonizadores do ambiente, oportunistas, avirulentos que exibem uma complexa relação simbiótica com as plantas (Sood et al., 2020). São fungos cosmopolitas e frequentemente predominantes da micoflora em solos, serapilheira, matéria orgânica e na rizosfera de ecossistema de todas as zonas climáticas (Singh et al., 2018).

Fungos do gênero *Trichoderma* spp. Pers. (1794) em sua fase teleomórfica ou sexuada pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Hypocreaceae e caracteriza-se por formação de estruturas reprodutivas chamadas de peritécios e a formação de ascósporos (esporos sexuais), porém sua fase sexuada é raramente formada em cultura pura, mas pode ser encontrada na natureza sobre fungos macroscópicos e madeira em decomposição (Samuels, 2006) (Figura 1).

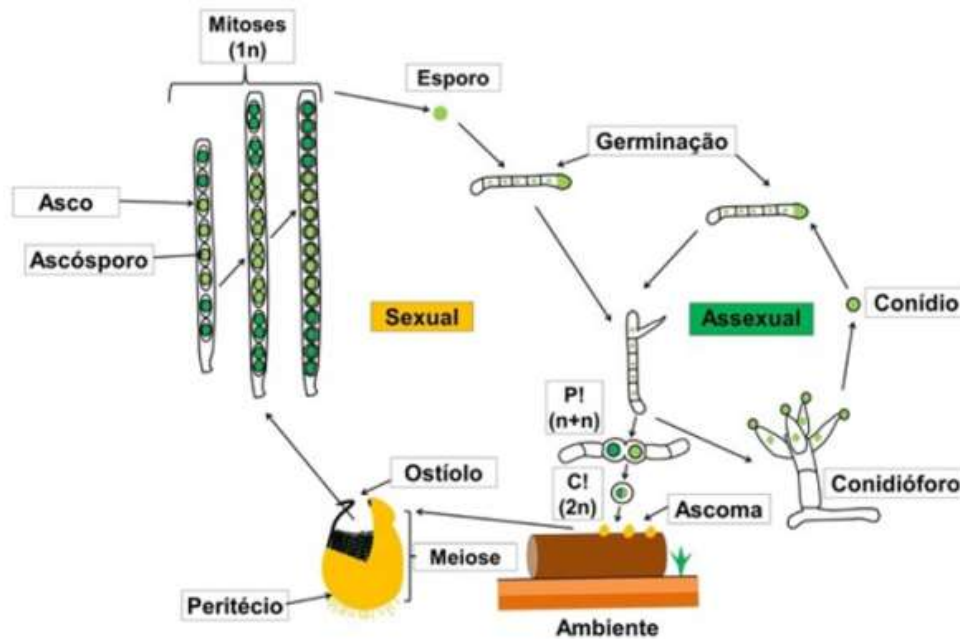


Figura 1. Ciclo de reprodução do fungo *Trichoderma* spp. em sua forma anamórfica (assexuada) e teleomórfica (sexual) (Sales et al., 2020).

Na fase anamórfica ou assexuada, *Trichoderma* spp. caracterizam-se por formação de estruturas reprodutivas chamadas de conidióforos com típicos conídios (esporos) unicelulares, esféricos, ovais ou alongados e são mais comumente observados e estudados em culturas puras (Samuels, 2006).

Na natureza, as formas assexuadas dos fungos persistem como indivíduos clonais, muitas vezes heterocarióticos, e em populações que provavelmente evoluem de forma independente na fase assexuada. Apresentam um alto nível de diversidade genética, e pode ser usado para produzir uma ampla gama de produtos de interesse comercial e ecológico (Harman et al., 2004).

Cerca de 530 espécies do gênero *Trichoderma* são registradas pelo Index Fungorum. A colonização do ambiente solo parece ser mais restrita a algumas espécies 'oportunistas ambientais', altamente adaptadas à vida e competição no solo e rizosfera e distribuídas em todo o planeta (Druzhinina et al., 2011).

As espécies de *Trichoderma* consideradas oportunistas ambientais são caracterizadas por alguns fenótipos em comum, como ampla distribuição geográfica, crescimento rápido e colonização agressiva dos nichos no solo e na rizosfera, alta capacidade de parasitar ou preda outros fungos (micoparasitismo) e também a capacidade de estabelecer interações benéficas com as plantas, resultando em

promoção de crescimento e indução de resistência a doenças e estresses abióticos (Harman et al., 2004).

Esses mecanismos de proteção a doenças e promoção de crescimento das plantas, colocam esse conhecido agente de controle biológico, como agente de multitalentos, multifuncional e de microrganismo ecológico (Sood et al., 2020; Woo et al., 2023; Alizadeh et al., 2024).

O oportunismo na rizosfera de plantas por *Trichoderma* é caracterizado pela alta capacidade deste fungo colonizar uma ampla gama de habitats, empregando uma combinação de características de competição por espaço e recursos nutricionais, resistência a estresses, reparação de danos celulares e modificação das condições ecológicas de vida a seu favor (Woo et al., 2023).

A promoção de crescimento promovida por *Trichoderma* spp. é comprovada por várias pesquisas utilizando diferentes hospedeiros e condições de ambiente, sendo na maioria das vezes relatados aumentos no crescimento e produção de culturas (Tabela 1).

A capacidade de solubilização de macro e micronutrientes do solo e o aumento da disponibilidade para as plantas são evidenciadas por várias pesquisas, em diferentes culturas. Diferentes espécies de *Trichoderma* spp. solubilizam e disponibilizam no solo e para as plantas, nutrientes essenciais importantes como os macronutrientes P, K, N, Ca, S, Mg, e micronutrientes como Zn, B, Mn (Tabela 2).

A solubilização de fósforo por *Trichoderma* é um mecanismo continuamente investigado por diversos pesquisadores e o resultado de seleções de isolados com potencial de solubilização de fosfatos no solo, através da produção enzimas fosfatase e ácidos orgânicos, apresenta resultados benéficos no crescimento das plantas, (Bononi et al., 2018).

Tabela 1. Efeito da interação *Trichoderma*-planta no crescimento e produtividade de culturas sob diferentes condições de ambiente.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Planta hospedeira	Condição de ambiente	Efeito no crescimento ou produtividade	Referências
<i>T. harzianum</i> e <i>T. viride</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	sem estresse	Aumento da germinação, população de perfilhos, e rendimento (t/ha)	Srivastava et al., 2006
<i>T. harzianum</i> Th 37	<i>Saccharum officinarum</i>	sem estresse	Aumento da produtividade devido ao maior número de perfilhos, altura e peso de colmo das plantas	Singh et al., 2010
<i>T. asperellum</i> (isolado-GF 332 - Lallemand)	<i>Saccharum officinarum</i>	estresse déficit hídrico	Aumento da altura da planta, largura da folha, peso fresco e seco dos caules, comprimento da raiz e peso seco da raiz	Scudeletti et al., 2021
<i>T. guizhouense</i>	<i>Zea mays</i>	estresse biótico	Promoção do crescimento e desenvolvimento de raízes laterais e aumento da produção de biomassa	Xu et al., 2020
<i>T. asperellum</i> (NRT2), <i>T. koningiopsis</i> (THB3) e <i>T. harzianum</i> (TRC3).	<i>Zea mays</i>	estresse salino	Aumento do comprimento de parte aérea e raízes, número de raízes secundárias, área foliar e biomassa de caule e folhas	Kumar et al., 2016
<i>T. asperellum</i> T34 (Biocontrol Technologie)	<i>Zea mays</i>	estresse déficit hídrico	Não houve aumento no crescimento sob estresse hídrico, porém houve aumento significativo no número e na massa seca de grãos por planta sem estresse hídrico.	Estévez-Gefriaud et al., 2020
<i>T. yunnanense</i> (Th4) e <i>T. afroharzianum</i> (Th6)	<i>Triticum aestivum</i>	estresse salino	Aumento da biomassa da parte aérea e raízes	Oljira et al., 2020
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> T6	<i>Triticum aestivum</i>	estresse salino	Aumento no comprimento, peso fresco e seco de perfilhos e raízes	Zhang et al., 2016
<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Oryza sativa</i>	sem estresse	Aumento da altura das plantas, número de folhas, perfilhos e comprimento das raízes	Doni et al., 2014
<i>Trichoderma</i> spp. isolado AMS	<i>Glycine max</i>	sem estresse	Aumento da biomassa aérea, área foliar e massa seca de raízes e altura de plantas	Bononi et al., 2020

<i>T. harzianum</i> isolados M10, T22, TH1, <i>T. asperellum</i> KV906 e <i>T. virens</i> isolado GV41	<i>Glycine max</i>	sem estresse	Em casa de vegetação, aumento do comprimento do caule (até 67%), comprimento da raiz (até 31%), peso fresco (até 68%), peso seco da planta (até 56%) e ramos florais (até 50%). Em ensaios de campo, aumentou o peso do caule, o número de vagens por planta, o peso total das vagens, o número de sementes por planta, o peso total das sementes e o peso de 100 sementes.	Marra et al., 2019
<i>T. harzianum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	estresse excesso hídrico	Aumento da biomassa da planta	Elkelish et al., 2020
<i>T. Harzianum</i> T22, Koppert Biological Systems.	<i>Solanum lycopersicum</i>	sem estresse	Aumento do peso, número e produção de frutos por planta	Carillo et al., 2020
<i>T. viride</i> (BBA 70239)	<i>Solanum lycopersicum</i>	sem estresse	Aumento da biomassa vegetal, maior tamanho das plantas e desenvolvimento significativo das raízes laterais.	Lee et al., 2016
<i>T. longibrachiatum</i> isolados KH, <i>T. longibrachiatum</i> isolados MA e <i>T. harzianum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	estresse déficit hídrico	Aumento do peso seco da parte aérea e maior volume de raiz	Khoshmanzar et al., 2019
<i>T. harzianum</i> e <i>T. asperellum</i>	<i>Passiflora caerulea</i>	sem estresse	Aumento da área foliar, acúmulo de biomassa e aumento do rendimento das frutas	Sesan et al., 2020
<i>Trichoderma azevedoi</i> CEN1241	<i>Lactuca sativa</i>	sem estresse	Aumento da massa fresca e seca total da planta, comprimento de parte aérea e raiz e largura das folhas.	Silva et al., 2021
<i>T. Harzianum</i> T22, Koppert Biological Systems.	<i>Cucurbita pepo</i>	sem estresse	Aumento na produção e biomassa seca de raízes	Formisano et al., 2021
<i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i> isolados T22	<i>Allium cepa</i> L.	sem estresse	Aumento da biomassa dos bulbos	Ortega-García et al., 2020
<i>T. atroviride</i> IMI206040 e <i>T. atroviride</i> B LU660;	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sem estresse	Aumento da biomassa fresca da planta	Nieto-Jacobo et al., 2017

<p><i>T. aggressivum</i> (DAOM222156 e IMI 393970); <i>T. asperellum</i> (GJS 02-65); <i>T. harzianum</i> (CBS 226.95); <i>T. longibrachiatum</i> (CBS 118642 e TR97); <i>T. pseudokoningii</i> (CBS 480.91 e CBS 130756); e <i>T. viride</i> (GJS 04-379)</p>	<p><i>Arabidopsis thaliana</i> e <i>Solanum Lycopersicum</i></p>	<p>sem estresse</p>	<p>Aumento de altura e biomassa das plantas e desenvolvimento das raízes laterais</p>	<p>Lee et al., 2016</p>
<p><i>Trichoderma asperellum</i> Q1</p>	<p><i>Arabidopsis thaliana</i></p>	<p>estresse deficiência de ferro</p>	<p>Aumento no comprimento das raízes</p>	<p>Zhao et al., 2020.</p>

Tabela 2. Ação de *Trichoderma* spp. na disponibilidade de nutrientes para as plantas e solubilização de nutrientes no solo.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Planta hospedeira	Disponibilidade ou absorção de N	Disponibilidade, solubilização ou absorção de P	Disponibilidade, solubilização ou absorção de K	Outros macronutrientes	Micronutrientes	Referências
<i>T. harzianum</i> Th 37	<i>Saccharum officinarum</i>	aumento (+) na disponibilidade em 27% no solo; aumento (+) na absorção de 0,42 - 0,71%	aumento (+) na disponibilidade de 65% no solo; aumento (+) na absorção de 0,056 - 0,110%	aumento (+) na disponibilidade de 44% no solo; aumento (+) na absorção de 0,5 - 1,14%	não afetado	aumento na absorção (+) de Mn (79%), Zn (66%) e Cu (6%)	Singh et al., 2010
<i>T. asperellum</i> (NRT2), <i>T. koningiopsis</i> (THB3) e <i>T. harzianum</i> (TRC3).	<i>Zea mays</i>	não avaliado	solubilização de fosfato (+) entre 40,79 a 56,13 µg/ml.	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Kumar et al., 2016
<i>T. asperellum</i> T34 (Biocontrol Technologie)	<i>Zea mays</i>	aumento (+) nas folhas e grãos	aumento (+) nas folhas e grãos	aumento (+) nos grãos	aumento (+) de S nas folhas	aumento (+) de Zn nas folhas e B nos grãos	Estévez-Gefriaud et al., 2020
<i>Trichoderma</i> spp. AMS	<i>Glycine max</i>	não avaliado	solubilização de fosfato (+); atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina (+); indicando a capacidade de mineralizar o fósforo orgânico na forma de fitato; produção de ácidos orgânicos durante o processo de solubilização: ácido lático, ácido fumárico, ácido ascórbico, ácido glucônico, ácido d-málico, ácido d-isocítrico, ácido cítrico e ácido fítico.	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Bononi et al., 2020

<i>T. harzianum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	aumento (+) 18% na absorção	aumento (+) 49% na absorção	aumento (+) 60% na absorção	não avaliado	não avaliado	Elkelish et al., 2020
<i>T. longibrachiatum</i> KH, <i>T. longibrachiatum</i> MA e <i>T. harzianum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	aumento (+) 62,7% na absorção	solubilização de fosfato entre 85,36 mg L ⁻¹ a 114,7 mg L ⁻¹ ; aumento da absorção de fósforo (+) 34,7%	Aumento (+) na absorção	não afetado	aumento na absorção (+) de Fe (39.3%) e Zn (47.6%)	Khoshmanzar et al., 2019
<i>T. Harzianum</i> T22, Koppert Biological Systems.	<i>Cucurbita pepo</i>	o conteúdo nas folhas não foram aumentados	aumento (+) 38.5% na absorção	content in the leaves was not affected	aumento na absorção (+) 21.6% de Mg; Ca e S não foram afetados	não avaliado	Formisano et al., 2021

Compostos orgânicos voláteis (COVs), como 6-pentil- α -pirona (6PP), produzidos por *Trichoderma* spp. em baixa concentração, podem atuar como moléculas sinalizadoras para modular a germinação de semente, crescimento da planta, arquitetura da raiz e respostas imunológicas das plantas (Vinale, et al., 2008; Garnica-Vergara et al., 2016; Silva et al. 2021).

Os genomas de *Trichoderma* possuem genes de fitohormônios envolvidos na produção de auxinas, giberelinas, ácido abscísico, ácido salicílico e citocininas, sendo dependente do isolado ou do ambiente (Guzmán-Guzmán et al., 2019) e têm sido associadas ao crescimento de hifas, à colonização de raízes, à ativação das enzimas antioxidantes e à promoção de desempenho das plantas sob estresse abiótico (Pedrero-Méndez et al. 2021; Illescas et al., 2021) (Tabela 3).

A interação planta-*Trichoderma* envolve moléculas de reconhecimento definidas como Padrões Moleculares Associados a Micróbios (MAMPS - Microbe-Associated Molecular Patterns) e efetores MAMPS. As moléculas efetoras ligam-se aos Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs - pattern-recognition receptors) e receptores intracelulares do hospedeiro e, assim, desencadeiam uma série de eventos que levam a resistência a doenças e a promoção de crescimento das plantas (Hermosa et al. 2012; Sood et al. 2022)

Trichoderma spp. atuam localmente e sistemicamente, envolvendo uma cascata de sinalização, ativação e acúmulo de metabólitos e enzimas como terpenoides, flavonoides, fitoalexinas, enzimas antioxidantes, além de açúcares e aminoácidos também são sintetizados (Tabela 4). A modificação do metabolismo pela interação *Trichoderma*-planta na promoção do crescimento são variáveis e dependentes do isolado e espécie de *Trichoderma*, espécie da planta e condições de ambiente (Tabela 4).

Tabela 3. Produção de fitohormônios por *Trichoderma* spp. e interação com o ambiente.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Planta hospedeira	Condição de ambiente	Auxina	Citocinina	Etileno	Ácido abscísico	Brassinosteroides	Referências
<i>T. guizhouense</i>	<i>Zea mays</i>	estresse biótico	expressão do gene de síntese YUC4 e gene de transporte PIN2 no tecido radicular	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Xu et al., 2020
<i>T. asperellum</i> (NRT2), <i>T. koningiopsis</i> (THB3) e <i>T. harzianum</i> (TRC3).	<i>Zea mays</i>	estresse salino	produção de AIA entre 5,5 a 36,40 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ com L-triptofano e 0,7 a 1,6 $\mu\text{g/ml}^{-1}$ sem L-triptofano	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Kumar et al., 2016
<i>T. yunnanense</i> (Th4) e <i>T. afroharzianum</i> (Th6)	<i>Triticum aestivum</i>	estresse salino	produção de AIA entre 0,05 a 0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Oljira et al., 2020
<i>T. harzianum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	estresse excesso hídrico	não avaliado	não avaliado	aumento dos níveis (+) na planta	aumento dos níveis (+) na planta	não avaliado	Elkelish et al., 2020
<i>T. harzianum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	sem estresse	sem expressão de genes associados	sem expressão de genes associados	super-expressão de genes associados	sem expressão de genes associados	sem expressão de genes associados	Manganiello et al., 2018
<i>T. longibrachiatum</i> KH , <i>T. longibrachiatum</i> MA e <i>T. harzianum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	estresse déficit hídrico	produção de AIA entre 2,98 a 10,01 mg L^{-1}	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Khoshmanzar et al., 2019
<i>T. Harzianum</i> T22, Koppert Biological Systems.	<i>Cucurbita pepo</i>	sem estresse	Aumento do precursor de AIA, 3-hidroxi-indole-3-butiril-CoA	Diminuição de citocinina N6-(D2-isopentenil)-adenosina 5'-difosfato	não modulado	não modulado	biossíntese da forma ativa homobrassinolida	Formisano et al., 2021
<i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i> T22	<i>Allium cepa</i> L.	sem estresse	aumento da produção de AIA depende do precursor: triptofol > triptamina > I-triptofano.	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Ortega-García et al., 2020

<i>T.reesei</i> QM6a; <i>T. atroviride</i> IMI206040; <i>T. virens</i> Gv29.8 e <i>T. asperellum</i> .	<i>Arabidopsis thaliana</i>	sem estresse	produção de AIA depende do isolado e do ambiente.	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Nieto-Jacobo et al., 2017
<i>Trichoderma asperellum</i> Q1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Estresse deficiência de ferro	Produção de AIA entre 0,36 a 2,92 mg L ⁻¹	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	Zhao et al., 2020.

Tabela 4. Metabolismo bioquímico na interação *Trichoderma*-planta em diferentes hospedeiros e condições de ambiente.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Planta hospedeira	Condição de ambiente	Enzimas antioxidantes	Acumulação de MDA	Carboidratos e açúcares	Aminoácidos	Proteínas	Flavonoides e fitoalexinas	Referências
<i>T. asperellum</i> (GF 332 - Lallemand)	<i>Saccharum officinarum</i>	estresse déficit hídrico	aumento de 11,5% da SOD e 20% da POD	não avaliado	redução de sacarose e açúcares totais	aumento de prolina em 63%	não avaliado	não avaliado	Scudeletti et al., 2021
<i>T. asperellum</i> (NRT2), <i>T. koningiopsis</i> (THB3) e <i>T. harzianum</i> (TRC3)	<i>Zea mays</i>	estresse salino	não avaliado	diminuição (-)	não avaliado	aumento em 2 vezes o conteúdo de prolina	não avaliado	aumento do conteúdo de fenóis	Kumar et al., 2016
<i>T. yunnanense</i> (Th4) e <i>T. afroharzianum</i> (Th6)	<i>Triticum aestivum</i>	estresse salino	não avaliado	não avaliado	não avaliado	conteúdo de prolina depende do isolado e cultivar da planta	não avaliado	não avaliado	Oljira et al., 2020
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> T6	<i>Triticum aestivum</i>	estresse salino	aumento de 29% da SOD, 39% POD e 19% CAT	diminuição (-)	aumento de 31% de açúcar solúvel	aumento de prolina em 35%	não avaliado	não avaliado	Zhang et al., 2016
<i>T. harzianum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	estresse excesso hídrico	aumento da expressão do gene FeSOD	diminuição (-)	aumento de açúcares totais	aumento do conteúdo de prolina	aumento de proteína solúvel e expressão do gene da aquaporina	aumento no conteúdo de flavonoides e antocianinas	Elkelish et al., 2020
<i>T. Harzianum</i> T22, Koppert Biological Systems.	<i>Solanum lycopersicum</i>	sem estresse	não avaliado	não avaliado	sem aumento de amido, glicose, frutose, sacarose	aumento do conteúdo de asparagina (+37%), GABA (+87%) e MEA (+102%)	aumento no conteúdo de proteína solúvel em 20%	sem aumento de polifenóis	Carillo et al., 2020
<i>T. harzianum</i> e <i>T. asperellum</i>	<i>Passiflora caerulea</i>	sem estresse	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	aumento de polifenóis e flavonoides em 35%	Sesan et al., 2020
<i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i> isolates T22	<i>Allium cepa</i>	sem estresse	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	não avaliado	aumento do flavonoide quercetina e fenol ácido gálico	Ortega-García et al., 2020

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO), produzidas por enzimas glicose oxidase, estão ligadas à imunidade intermediada por *Trichoderma* em algodão, arroz e *A. thaliana* (Djonović et al., 2006; Contreras-Cornejo, et al., 2014). A sinalização da defesa nas plantas envolve a participação de Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPK – mitogen-activated protein kinases) que ativam uma cascata de respostas celulares nas plantas (Sood et al., 2022) (Figura 2).

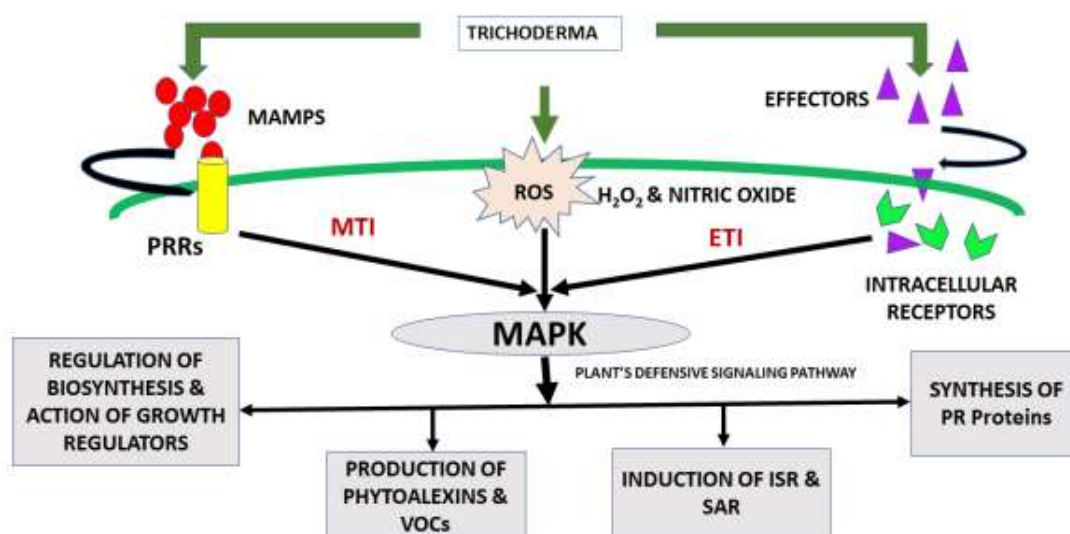


Figura 2. A interação planta-*Trichoderma* envolve as moléculas de reconhecimento, Padrões Moleculares Associados a Micróbios (MAMPS - microbe-associated molecular patterns) e efetores que desencadeiam diferentes respostas imunológicas e de crescimento em plantas (Sood et al., 2022).

O reconhecimento de elicitores e efetores MAMPS de *Trichoderma* por receptores das plantas iniciam a sinalização e regulação genética do hospedeiro, possibilitando a indução do metabolismo de defesa das plantas a estresses bióticos e abióticos. (SOOD et al., 2022; Alizadeh et al., 2024).

A exposição ao estresse ambiental (seca, salinidade, elementos tóxicos, baixa fertilidade do solo) leva ao aumento da produção EROs, como superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, que quando presente em excesso, impacta negativamente o crescimento e desenvolvimento das plantas, causando dano oxidativo a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (Nadarajah, 2020).

O *Trichoderma* spp. pode melhorar a defesa antioxidante de plantas submetidas a estresses abióticos, produzindo enzimas antioxidantes como, superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT),

resultando em uma diminuição dos níveis de EROs na planta, limitando os danos nos tecidos (Mastouri et al., 2012; Contreras-Cornejo et al., 2014; Pedrero-Méndez, et al. 2021) (Tabela 4).

Espécies de *Trichoderma* spp. desenvolveram a capacidade de se comunicar com a planta, produzindo benefícios múltiplos para seu hospedeiro e a complexidade desta associação planta-microrganismo estimulou acentuado interesse na pesquisa sobre *Trichoderma*; desde sua capacidade como promotor de crescimento de plantas devido à sua capacidade de estimular o crescimento local e sistêmico em respostas de defesa contra estresses bióticos e abióticos; até a ativação da memória transcricional afetando as respostas das plantas a estresses futuros (Woo, et al. 2023).

A interação *Trichoderma*-planta inicia com as MAMPs, na quais desencadeiam sinalizações de um complexo sistema de redes de fitohormônios que regulam as respostas da planta ao ambiente (Woo et al., 2023).

1.3.2 Produção de AIA por *Trichoderma* spp. e estudos na promoção do crescimento em plantas

A auxina é o fitohormônio mais estudado quanto a promoção de crescimento promovida por espécies de *Trichoderma* spp. O ácido indolacético (AIA) produzido por *Trichoderma* spp. desempenha papéis importantes nas interações de indução de defesa das plantas contra doenças e na promoção do crescimento, porém, as informações sobre sua participação nas interações de crescimento são pouco investigadas (López-Bucio et al., 2015) e ainda não estão bem definidas (Nieto-Jacobo et al., 2017).

A investigação da capacidade de isolados de *Trichoderma* spp. produzir AIA está dividida em dois tipos principais: vias independentes e dependentes de triptofano e tem sido realizada por meio da avaliação *in vitro* em meio de cultura líquido suplementado ou não com o aminoácido L-Triptofano, no qual tem sido usado como precursor fisiológico para biossíntese de auxinas em plantas e microrganismos (Oliveira et al., 2012).

Ortega-Garcia et al. (2015) demonstraram que *T. asperellum* sem precursor de AIA produziu baixos níveis, sendo que o aumento da produção de AIA dependia do precursor adicionado: Triptofol > Triptamina > L-triptofano.

A maioria trabalhos realizados na investigação de isolados de *Trichoderma* spp. produtores de AIA são realizados adicionando o precursor L-Triptofano e na sua presença, maiores concentrações de AIA são produzidas, quando comparado na ausência de L-Triptofano (Guzmán-Guzmán et al., 2019).

As auxinas produzidas por *Trichoderma* spp. têm sido associadas à iniciação dos pelos radiculares, estimulação do transporte e sinalização de AIA nas plantas, resultando em promoção do crescimento (Contreras-Cornejo et al., 2009; Sukumar et al. 2013; Nieto-Jacobo et al., 2017).

Estudos de Contreras-Cornejo et al. (2009) observaram que plantas de *Arabidopsis* mutantes em promotores de sinalização e transporte de auxinas (BIG, EIR1, AUX1 e AXR1) não responderam aos efeitos benéficos de *T. virens* e AIA sintético na promoção de crescimento e na indução da ramificação de raízes. A percepção de AIA pelas pontas das raízes induziram alterações no promotor marcador (DR5:GUS) responsivo à auxina, demonstrando a correlação do efeito da auxina com aumentos na proliferação celular e na formação de raízes laterais.

Os isolados de *Trichoderma* spp. investigados em diferentes experimentos, não possuem apenas a capacidade de produzir AIA, mas também a capacidade de solubilização de fósforo, um nutriente importante no crescimento desenvolvimento das plantas, juntamente com as auxinas (Harman et al., 2004; Junior et al., 2019; Bader et al., 2020). De acordo com Harman et al. (2004), diferenças entre isolados e espécies de *Trichoderma* spp. são esperadas e sabe-se que alguns são eficientes na expansão da superfície do sistema radicular por meio da solubilização de nutrientes, enquanto outros por meio da produção de auxinas.

Kumar et al. (2016) avaliaram o efeito de nove espécies de *Trichoderma* solubilizadores de fósforo e AIA na promoção do crescimento de milho em condições de cinco níveis de estresse salino, em condições de casa de vegetação. Dentre os isolados, *T. harzianum* (TRC3) aumentou significativamente os parâmetros fisiológicos como parte aérea, comprimento da raiz, área foliar, biomassa total e peso fresco do caule e folha em todos os níveis de estresse. TRC3 apresentou a capacidade de produção de AIA (36,40 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ com L-triptofano e 1,50 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ de AIA sem L-triptofano; e solubilização de fósforo de 51,90 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$).

Junior et al. (2019) avaliaram o crescimento de plantas de soja pelo isolado *T. asperellum* UFT 201, capaz de solubilizar fósforo - $9,9 \mu\text{g/ml}^{-1}$ e AIA - $1,9 \mu\text{g/ml}^{-1}$, no qual promoveu o aumento da matéria seca de parte aérea e raiz, em comparação ao controle.

Bader et al. (2020), avaliaram 19 isolados nativos de *Trichoderma* dos Pampas argentinos quanto à sua capacidade de produzir AIA e solubilizar fosfato. Doze cepas exibiram as maiores produções de AIA (variando de $13,38$ a $21,14 \mu\text{g/ml}^{-1}$) e foram capazes de solubilizar fosfato (variando de $215,80$ a $288,18 \mu\text{g/ml}^{-1}$ de fosfato de cálcio). Nessa pesquisa, quatro isolados de *Trichoderma* spp. foram selecionados pela produção de AIA e a capacidade de solubilizar fosfato tricálcico. Plantas de tomate inoculadas com os esses isolados aumentaram o teor de clorofila, comprimento, peso fresco e seco da parte aérea e raízes (Bader et al., 2020). Os autores observaram que todas as plantas inoculadas com *Trichoderma* spp. apresentaram maior proliferação de raízes laterais em comparação com as plantas controle.

As pesquisas apresentadas anteriormente demonstram que espécies de *Trichoderma* spp. são capazes de promover o crescimento, tanto pela capacidade de solubilização de fósforo, quanto pela produção de AIA. Contudo, o papel das auxinas produzidas por *Trichoderma* e outros microrganismos ainda não é bem definido como regra geral na promoção do crescimento das plantas (Contreras-Cornejo et al., 2009; Nieto-Jacobo et al., 2017).

Isolados de *Trichoderma* spp. escolhidos por sua habilidade de produção de AIA, foram testados quanto à sua capacidade de promover crescimento de *A. thaliana* em solo estéril (Nieto-Jacobo et al., 2017). Após quatro semanas de interação, três resultados diferentes foram observados pelos autores: 1-aumento na biomassa vegetal, 2- diminuição da biomassa e 3-nenhum efeito, quando comparado às plantas controle não inoculada.

Hoyos-Carvajal et al. (2009) não observaram relação entre a produção de AIA e a promoção do crescimento, quando as plantas foram avaliadas em solo. Os autores identificaram 101 isolados de *Trichoderma* coletados na Colômbia, 60% produziram derivados de AIA *in vitro*, mas apenas 18% tiveram a capacidade de induzir a promoção do crescimento de plantas de feijão.

Contreras-Cornejo et al (2009) demonstrou que, a aplicação exógena de AIA produzida por *T. Virens* e derivados de AIA em diferentes concentrações,

promoveram uma resposta dependente em acúmulo de biomassa de *Arabidopsis*, aumentando em baixas concentrações e reduzindo em altas concentrações de auxina.

A alta concentração de auxinas nas plantas pode ter negativo pela acidificação da rizosfera induzida por *Trichoderma* causando à inibição de crescimento radicular através de um mecanismo independente de auxina (Contreras-Cornejo et al., 2009; Pelagio-Flores et al., 2017; Woo et al., 2023).

López-Bucio et al (2015) sugeriu que os efeitos neutros e negativos apresentados por alguns isolados de *Trichoderma* spp., diferem dos efeitos positivos promovidos por outros isolados por suas capacidades de colonizar as raízes das plantas. As plantas respondem à colonização das raízes por *Trichoderma* spp, produzindo metabólitos secundários, como fitoalexinas, flavonoides, terpenoides, compostos fenólicos (Sood et al., 2020).

Os efeitos de promoção e/ou inibição exibidos pelo mesmo isolado, em diferentes interações, podem ser induzidas por diferenças de produção de metabólitos secundários, podendo ser prejudiciais para certos genótipos, dependendo do resultado dessa interação metabólica *Trichoderma*-planta (López-Bucio et al., 2015).

Em especial, os flavonoides têm a capacidade de modular a cascata de sinalização de EROs e afetar diretamente o catabolismo, transporte e sinalização da auxina nas plantas (Brunetti et al., 2018). Recentes estudos demonstraram que os flavonoides modulam a relação parte aérea/raiz regulada por auxina/citocinina, por meio das interações simbióticas entre plantas-microrganismos; além de agirem em conjunto com a auxina para promover as interações planta-microrganismo (Kurepa et al., 2023).

A investigação de isolados de *Trichoderma* spp. produtores de AIA na promoção de crescimento das plantas e o efeito no metabolismo bioquímico de auxinas/flavonoides nas plantas, em respostas ao ambiente de crescimento são ainda desafios futuros da pesquisa.

1.3.3 O Papel das auxinas e flavonoides na modulação do crescimento das plantas

As auxinas são um grupo de fitohormônios vegetais envolvidos em quase todos os processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como embriogênese, formação de raízes laterais, alongamento do hipocótilo, dominância apical e no fenômenos relacionados ao fototropismo e geotropismo (Zhang et al., 2022).

A atividade da auxina em vários processos fisiológicos pode ser espacialmente regulada através de três ações principais: biossíntese e inativação de auxinas, transporte dirigido por auxina e transdução de sinal das plantas como ilustrado na Figura 3 (Casanova-Sáez et al., 2021; Zhang et al., 2022).

A auxina possui dois sistemas de transporte distintos em plantas, mas interligados: 1- fluxo rápido e não direcional com fotoassimilados no floema, e 2- fluxo lento e transporte intercelular polar de auxina direcionado (Adamowski e Friml, 2015; Zhang et al., 2022). Os gradientes direcionais de auxina são indispensáveis para processos de desenvolvimento de plantas, como desenvolvimento de órgãos, formação de gancho apical, gravitropismo (curvatura para crescimento direcional de raízes) e fototropismo (Enders e Strader, 2015).

O transporte polar de auxinas depende de três proteínas de transporte: 1-família das proteínas transportadoras de importação AUX/LAX (AUX1), 2-família da proteína transportadora de exportação PIN (formada por pinos) e 3-família das proteínas transportadoras ABCB/MDR/PGP (cassete de ligação de ATP B/resistência a múltiplas drogas/p-glicoproteína) com funções de importação e exportação (Blakeslee et al, 2007; Zhang et al., 2022) (FIGURA 3).

Auxinas regulam muitos processos fisiológicos controlando a transcrição genética através do módulo de sinalização nuclear SCF^{TIR1/AFB}-Aux/AIA-ARF. O módulo requer um conjunto de três constituintes principais. 1-as proteínas F-box AFB1-AFB5/TIR1 são subunidades receptoras de auxinas da família ubiquitina SCF-Família E3, que liga a classe ativadora das proteínas de transcrição de fatores de resposta a auxina (ARF- Auxin Response Factor) e os repressores transcricionais Aux/AIA (Weijers e Wagner, 2016; Zhang et al., 2022). A percepção da auxina começa com a ligação da auxina aos receptores TIR1/AFB. Isto leva à degradação de proteínas Aux/AIA que interagem fisicamente com

fatores de transcrição de ARF e inibem a sinalização de auxina (Mockaitis e Estelle, 2008; Zhang et al., 2022) (Figura 3).

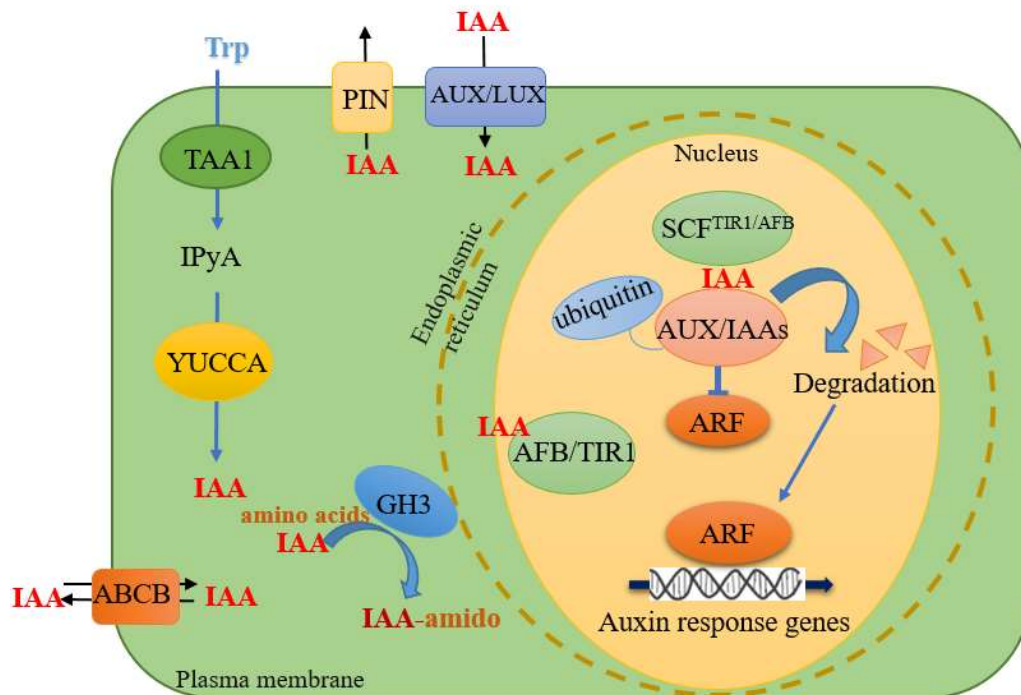


Figura 3. Modelo celular simplificado de biossíntese, transporte e sinalização de auxina (Zhang et al., 2022).

AIA é uma auxina endógena onipresente nas plantas, sintetizada por vias independentes de Trp (triptofano) e dependentes de Trp (Zhao, 2012). A biossíntese de AIA dependente de Trp em plantas de *Arabidopsis* é mediada via TAA/YUC (*Tryptophan Aminotransfer-ase of Arabidopsis/Yucca*) (Stepanova et al., 2011; Dai et al., 2013; Zhang et al., 2022).

A resposta da auxina é dependente da sua concentração em diferentes tecidos, apresentando respostas distintas a quantidades variadas de auxina exógena, sendo que em altas concentrações tendem a ser inibitórias, portanto, os níveis endógenos ideais tendem a ser controlados (Zhang et al., 2022).

Proteínas da família GH3 (*Gretchen Hagen 3*) desempenham um papel na regulação da resposta negativa a concentração de AIA, e o excesso de AIA regula positivamente a expressão de GH3, resultando no armazenamento ou degradação de AIA ligado a aminoácidos (Zhang et al., 2022) (Figura 3). A combinação e degradação de moléculas de aminoácidos e AIA ajudam a manter a homeostase (equilíbrio da concentração) do AIA nas plantas (Staswick et al.,

2005; Zhang et al., 2022). O gene GH3 é essencial para o crescimento equilibrado das plantas e adaptação ao estresse ambiental (Ludwig-Müller, 2011; Zhang et al., 2022).

O AIA é um dos principais fitohormônios que modulam a formação de raízes nas plantas (Xu et al., 2017; Shu et al., 2019). O desenvolvimento lateral da raiz envolve uma série de divisões celulares em células ativadas do periciclo para formar primórdios de raízes, que se diferenciaram em raízes emergentes laterais (Malamy e Benfey, 1997; Peret et al., 2009). Cada um desses eventos: iniciação, desenvolvimento, emergência e alongamento de raízes laterais, foi atribuído à regulação da biossíntese, transporte e sinalização das auxinas (Dubrovsky et al., 2008; Peret et al., 2009; De Smet, 2012).

O transporte de auxina é essencial para estabelecer a concentração de auxina na planta, levando à especificação do tipo celular e à indução de divisões celulares meristemáticas (Benková et al., 2003). As proteínas PIN (*PIN-FORMED*) são inseridas na camada polar da membrana plasmática no citoplasma, em lados específicos da célula, para controlar a direção do transporte de auxina na direção acropetal, basípeta ou lateral (Petrásek e Friml, 2009).

Em raiz de *Arabidopsis thaliana*, o transporte de auxina em direção acropetal, da base da raiz até a ponta da raiz, é principalmente mediado por PIN1, enquanto o transporte de auxina basípeta, da ponta da raiz para a zona de alongamento, é mediado pelo PIN2 (Rashotte et al., 2000; Michniewicz et al., 2007). Baixas concentrações de AIA na planta estimula o alongamento da raiz, enquanto relativamente altas concentrações influenciam a formação de raízes laterais e adventícias (Jaroszuk-Scisiel et al., 2019).

No entanto, altos níveis de AIA podem promover a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estimular a oxidação do AIA, reprimindo assim transitoriamente a sinalização de auxina na planta (Peer et al., 2013; Zhang e Peer, 2017).

A síntese de inibidores endógenos do transporte de auxina pode ser modulada por mudanças ambientais ou de alterações no desenvolvimento das plantas (Lomax et al., 1995). Uma classe de compostos que atuam como reguladores endógenos de auxina são os flavonoides (Jacobs e Rubery, 1988).

Os flavonoides são metabólitos secundários do subgrupo dos fenilpropanóides e estão envolvidos em diversas funções fisiológicas na planta, como atividade no controle do transporte de auxina, ativação de enzimas antioxidantes, proteção contra radiação luminosa, defesa contra fitopatógenos e interação microrganismo-planta (Falcone Ferreyra et al. 2012; Agatti et al., 2012; Sugiyama e Yazaki, 2014).

A relação entre flavonoides e a sinalização de auxina no desenvolvimento das plantas, tem demonstrado efeito no desenvolvimento das raízes, relacionado com o movimento acropetal e lateral das auxinas (Franco et al., 2015).

Flavonoides como quercetina, kaempferol e apigenina sintetizadas nas primeiras etapas da via biossintética dos flavonoides inibem transporte de auxina polar para regular o acúmulo de auxina na planta (Peer e Murph. 2007) (Figura 4).

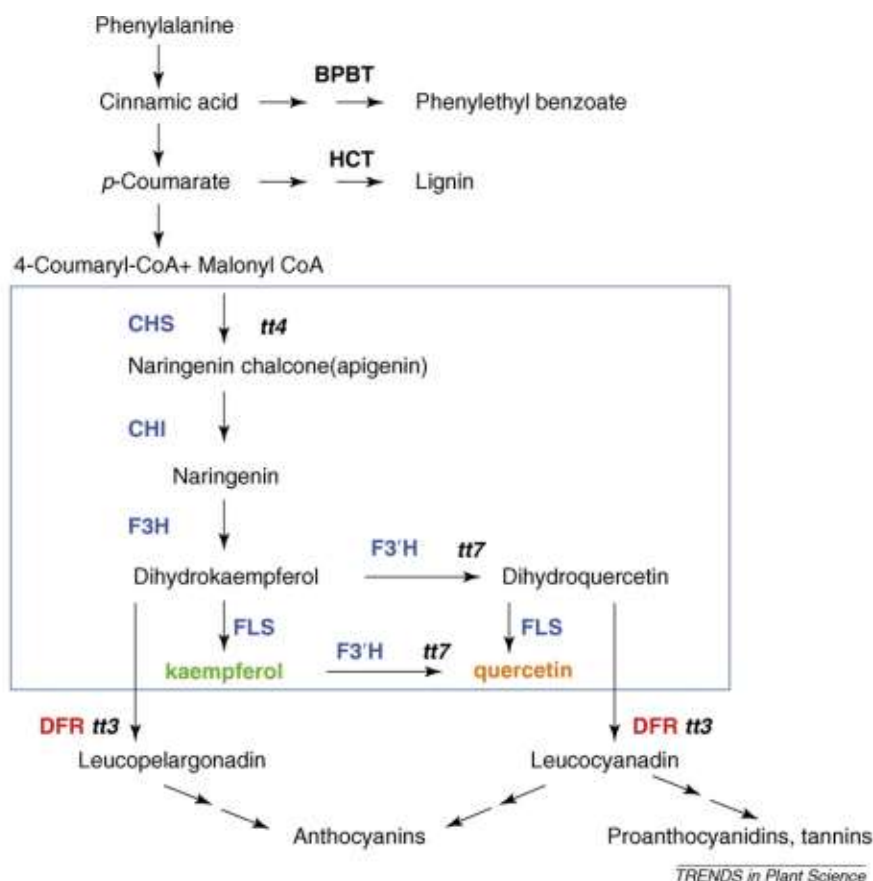


Figura 4 – Via biossintética simplificada dos fenilpropanóides, destacando o flavonoides kaempferol (verde) e quercetina (laranja) (Peer e Murph, 2007).

Os efeitos dos flavonoides nas proteínas de transporte de auxina PIN sugerem que as alterações na expressão e localização das proteínas PIN1 e PIN2, observada em plantas de *Arabidopsis* mutantes de flavonoides, podem ser atribuídas principalmente a alteração das concentrações locais de auxina, do que uma interação direta com os flavonoides (Peer et al., 2004; Peer e Murph., 2007). Portanto, os flavonoides são melhor vistos como moduladores de processos de transporte, em vez de essenciais reguladores (Peer e Murph., 2007; Chapman e Muday, 2021).

Recentemente pesquisas demonstraram que a auxina pode regular positivamente a biossíntese de flavonoides, limitando sua ação na formação do sistema radicular e protegendo a raiz do acúmulo excessivo de EROs, promovendo o surgimento de raízes laterais (Chapman e Muday, 2021; Kurepa et al., 2023).

As EROs podem funcionar como moléculas sinalizadoras para regular o desenvolvimento das plantas, as respostas do ambiente e a sinalização de auxina (Chapman et al., 2019; Kapoor et al., 2019; Nadarajah, 2020; Chapman e Muday, 2021).

A interação AIA-EROS-Flavonoides também tem implicação interessante no papel das auxinas à resposta à deficiência de nutrientes, em especial o fósforo (Kurepa et al., 2023). Por exemplo, a ação das auxinas aumenta em resposta aos baixos níveis de fósforo nos solos, o que normalmente leva ao aumento da iniciação e crescimento da raiz lateral para ajudar as plantas a garantir mais desses essenciais nutrientes (Kurepa e Smalle, 2022). Entretanto, foi visto que a ação das auxinas aumenta em resposta aos baixos níveis de P nos solos, resultando na diminuição do conteúdo de flavonoides kaempferol, quercetina nas raízes, que por sua vez promovem emergência de raízes (Kurepa et al., 2023; Chapman e Muday, 2021).

Uma vez que a biossíntese de flavonoides não é apenas regulada por hormônios, mas também controlada por uma infinidade de sinais ambientais (Fini et al., 2011; Falcone Ferreyra et al., 2012), os flavonoides parecem atuar como transdutores de mudanças ambientais na via da auxina que regula o desenvolvimento das raízes e, assim, pode permitir uma adaptação mais flexível às condições do solo (Brunetti et al., 2018; Kurepa et al., 2023).

Embora a biossíntese e o metabolismo dos flavonoides em plantas têm sido amplamente estudados, os papéis múltiplos desses compostos que medeiam as interações planta-microrganismo permanecem em grande parte inexplorados (Wang et al., 2022).

1.4 Conclusões e perspectivas

Notavelmente o complexo papel fisiológico das auxinas são essenciais para o estabelecimento, crescimento e desenvolvimento das plantas em diversos ambientes, bem como nas interações planta-microrganismos.

A ação das auxinas na promoção do crescimento das plantas, mediante a interação com *Trichoderma* spp. produtores de AIA, apresentam respostas positivas, contudo, ainda são variáveis em alguns casos, sendo dependente do potencial de produção de AIA pelos isolados e as condições de ambiente para o crescimento da planta.

Alguns isolados de *Trichoderma* spp. produtores de AIA podem apresentar resultados negativos no crescimento de algumas plantas, devido a concentração de AIA livre produzidos, podendo alterar os processos de biossíntese, sinalização e transporte de AIA endógeno nas plantas.

Essa relação de simbiose, na qual são moduladas por metabólitos secundários, como flavonoides e EROs, diante a interação com as raízes e o crescimento das plantas, em respostas as flutuações do ambiente de crescimento, são desafios futuros para pesquisadores da área.

Sugere-se que possivelmente, as respostas positivas, neutras e negativas na promoção de crescimento das plantas por *Trichoderma* spp., podem estar relacionadas a interação de AIA/Flavonoides no metabolismo das plantas.

A compreensão desses efeitos implica diretamente na seleção de potenciais isolados de *Trichoderma* spp. produtores de AIA, para o uso na agricultura como bioestimulantes.

1.5 Referências

Abdenaceur, R.; Farida, B.; Mourad, D.; Rima, H.; Zahia, O.; Fatma, S. Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites

enhancing plant growth. **International Microbiology**, p. 817-829, 2022. doi: 10.1007/s10123-022-00263-8

Adamowski, M.; Friml, J. PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. **Plant Cell**, v. 27, p. 20-32, 2015.

Agatti, G., Azzarello, E., Pollastri, S., and Tattini, M. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67–76, 2012. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.014

Alizadeh, M. Qaderi, S. Roshanroo, M. Karimzadeh, S. Fazli, M. Saeedi, M. Akhtari, A. Heidarzadeh, A. Contouring Multifaceted Biological Activities and Applications of *Trichoderma* spp. for Managing Plant Health. **Journal of Crop Health**, Ed. Spring, mar., 2024. doi.org/10.1007/s10343-024-00976-y

Bader, A.; Salermo, G.; Covacevich, F.; Consolo, V. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control with disease on tomato (*Solanum Lycopersicum* L.). **Journal of King Saud University**, Ed. Science, p. 867-873, 2020. doi: 10.1016/j.jksus.2019.04.002

Benková, E. Michniewicz, M. Sauer, M. Teichmann, T. Seifertová, D. Jürgens, G. Friml, J. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. **Cell**, v. 115, p. 591-602, 2003.

Blakeslee, J.J. et al. Interactions among PIN-FORMED and Pglycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v. 19, p. 131-147, 2007.

Bononi, L.; Chiaramonte, J.; Pansa, C.; Moitinho, M.; Melo, I. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant. **Scientific Reports**, p. 1-13, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-59793-8

Brunetti, C.; Fini, A.; Sebastiani, F.; Gori, A.; Tattini, M. Modulation of Phytohormone Signaling: A Primary Function of Flavonoids in Plant-Environment Interactions. **Frontier Plant Science**, v. 9 p. 1042, 2018. doi: 10.3389/fpls.2018.01042

Carillo, P.; Woo, S.L.; Comite, E.; El-Nakhel, C.; Roupael, Y.; Fusco, G.M.; Borzacchiello, A.; Lanzuise, S.; Vinale, F. Application of *Trichoderma harzianum*, 6-Pentyl- α -pyrone and Plant Biopolymer Formulations Modulate Plant

Metabolism and Fruit Quality of Plum Tomatoes. **Plants**, ed. 9, v. 771, p.1-15, 2020. doi:10.3390/plants9060771

Casanova-Sáez, R.; Mateo-Bonmatí, E.; Ljung, K. Auxin Metabolism in Plants. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 13, p. 1-22, 2021. doi: 10.1101/cshperspect.a039867

Chapman, J. M., Muhlemann, J. K., Gayomba, S. R., and Muday, G. K. RBOH-Dependent ROS synthesis and ROS scavenging by plant specialized metabolites to modulate plant development and stress responses. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, p. 370-396, 2019.

Chapman, J.M.; Muday, G.K. Flavonoids modulate lateral root emergence by scavenging reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 296, 2021.

Chen, D.; Hou, Q.; Jia, L.; Sun, K. Combined use of two *Trichoderma* strains to promote growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.). **Agronomy**, p. 1-11, 2021. doi: 10.3390/agronomy11040726

Contreras-Cornejo, H.; Macías-Rodríguez, L.; Cortés-Penagos, C.; López-Bucio, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fun-gus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, p. 1579-1593, 2009. doi: 10.1104/pp.108.130369

Contreras-Cornejo, H.A. Macías-Rodríguez, L. Alfaro-Cuevas. R. López-Bucio, J. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 27, p. 503-514, 2014. doi.org/10.1094/mpmi-09-13-0265-r

Dai, X.; Mashiguchi, K.; Chen, Q.; Kasahara, H.; Kamiya, Y.; Ojha, S.; DuBois, J.; Ballou, D.; Zhao, Y. The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *Arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 1448-1457, 2013.

De Smet, I. Lateral root initiation: one step at a time. **The New Phytologist**, v. 193, p. 867-873, 2012.

Djonovi'c, S.; Pozo, M.J.; Dangott, L.J.; Howell, C.R.; Kenerley, C.M. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens*

induces plant defense responses and systemic resistance. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 19, p. 838–853, 2006.

Doni, F.; Isahak, A.; Che Mohd Zain, C.; Wan Yusoff, W. Physiological and growth response of rice plants. **AMB Express**, p. 1-7, 2014. doi: 10.1186/s13568-014-0045-8.

Druzhinina, I.S. Seidl-Seiboth, V. Herrera-Estrella, A. Horwitz, B.A. et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Review Microbiology**, v. 9, p. 749-759, 2011. doi.org/10.1038/nrmicro2637

Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J. Benková, E. Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 8790-8794, 2008.

Elkelish, A.A.; Alhaithloul, H.A.S.; Qari, S.H.; Mona H. Soliman, M.H.; Hasanuzzaman, M. Pretreatment with *Trichoderma harzianum* alleviates waterlogging-induced growth alterations in tomato seedlings by modulating physiological, biochemical, and molecular mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 171, 2020. Doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103946

Enders, T.A.; Strader, L.C. Auxin activity: Past, present, and future. **American Journal of Botany**, v. 102, p. 180-196, 2015.

Estévez-Geffriaud, V.; Vicente, R.; Vergara-Díaz, O.; Reinaldo, J.J.N.; Trillas, M.I. Application of *Trichoderma asperellum* T34 on maize (*Zea mays*) seeds protects against drought stress. **Planta**, Ed. Springer Nature, v. 252, p. 1-12, 2020. Doi.org/10.1007/s00425-020-03404-3

Falcone Ferreyra, M.L.; Rius, S.P.; Casati, P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, p. 222, 2012.

Fini, A.; Brunetti, C.; Di Ferdinando, M.; Ferrini, F.; Tattini, M. Stress-induced flavonoid biosynthesis and the antioxidante machinery of plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p. 709-711, 2011.

Formisano, L.; Miras-Moreno, B.; Ciriello, M.; El-Nakhel, C.; Corrado, G.; Lucini, L.; Colla, G.; Roupael, Y. *Trichoderma* and Phosphite Elicited Distinctive

Secondary Metabolite Signatures in Zucchini Squash Plants. **Agronomy**, v. 11, p. 1205, 2021. [Doi.org/10.3390/agronomy11061205](https://doi.org/10.3390/agronomy11061205)

Franco, D.M; Silva, E.M; Saldanha, L.L; Adachi, S.A; Schley, T.R; Rodrigues, T.M; Dokkedal, A.L; Nogueira, F.T.S; Almeida, L.F.R. et al. Flavonoids modify root growth and modulate expression of SHORT-ROOT and HD-ZIP III. **Journal of Plant Physiology**, v. 188, p. 89-95, 2015.

Garnica-Vergara, A.; Barrera-Ortiz, S.; Muñoz-Parra, E.; Raya-González, J.; et al. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ethylene insensitive 2 functioning. **New Phytologist**, v. 209 p. 1496-1512, 2016. doi.org/10.1111/nph.13725.

Guzmán-Guzmán, P.; Porras-Troncoso, M.D.; Olmedo-Monfil, V.; Herrera-Estrella, A.; *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. **Phytopathology**, v. 109 p. 6-16, 2019. doi.org/10.1094/phyto-07-18-0218-rvw

Harman, G.; Howell, C.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, p. 43-56, 2004.

Hermosa, R.; Viterbo, A.; Chet, I.; Monte, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p. 17-25, 2012.

Hoyos-Carvajal, L.; Orduz, S.; Bissett, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological Control**, v. 51, p. 409-416, 2009. [doi:10.1016/j.biocontrol.2009.07.018](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.07.018)

Illescas, M.; Pedrero-Méndez, A.; Pitorinibovolini, M.; Hermosa, R.; Monte, E. Phytohormone production profiles in *Trichoderma* species and their relationship to wheat plant responses to water stress. **Pathogens**, v. 10, n. 8, article 991, 2021. doi.org/10.3390/pathogens1008099.

Jacobs, M.; Rubery, P.H. Naturally Occurring Auxin Transport Regulators. **Science**, v. 24, May, 1988.

Jaroszukcise J, Tykiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Majewska M, Hanaka A, et al. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of

auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with these strain conidia. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, 2019.

Junior, A.F.C; Chagas, L.F.B; Miller, L.O.M. Oliveira, J.C. Efficiency of *Trichoderma asperellum* UFT 201 as plant growth promoter in soybean. **African Journal of Agricultural Research**, v. 14, p. 263-271, 31/Jan, 2019. Doi: 10.5897/AJAR2018.13556

Kapoor, D.; Singh, S.; Kumar, V.; Romero, R.; Prasad, R.; Singh, J. Antioxidant enzymes regulation in plants in reference to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). **Plant Gene**, v. 19, 2019.

Khoshmanzar, E.; Aliasgharzad, N.; Neyshabouri, M.R.; Khoshru, B.; Arzanlou, M.; Asgari Lajayer, B. Effects of *Trichoderma* isolates on tomato growth and inducing its tolerance to water-deficit stress. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 17, p. 869–878, 2020. Doi.org/10.1007/s13762-019-02405-4

Kumar, K.; Manigundan, K.; Amaresan, N. Influence of salt tolerant *Trichoderma* spp. on growth of maize (*Zea mays*) under diferent salinity conditions. **Journal Basic Microbiology**, p. 141-150, 2017. Doi: 10.1002/jobm.201600369

Kurepa, J.; Shull, T.E.; Smalle, J.A. Friends in Arms: Flavonoids and the Auxin/Cytokinin Balance in Terrestrialization. **Plants**, v. 12, p. 517, 2023. doi.org/10.3390/plants12030517

Kurepa, J.; Smalle, J.A. Auxin/Cytokinin antagonistic control of the shoot/root growth ratio and its relevance for adaptation to drought and nutrient deficiency stresses. **International Journal of Molecular Science**, v. 23, p. 1933, 2022.

Lee, S.; Yap, M.; Behringer, G.; Hung, R.; Bennett, J. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. **Fungal Biology and Biotechnology**, p. 1-14, 2016. Doi: 10.1186/s40694-016-0025-7

Lomax, T.L. Muday, G.K. Rubery, P. Auxin transport. In: PJ Davies, ed. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. **Kluwer Academic Press**, Norwell, The Netherlands, pp 509-530, 1995.

López-Bucio, J. Pelagio-Flores, R. Herrera-Estrella, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p.109-123, 2015.

Ludwig-Müller, J. Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 1757-1773, 2011.

Malamy J.E. Benfey P.N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. **Development**, v. 124, p. 33-44, 1997.

Manganiello, G. et al. Modulation of Tomato Response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and Its Secondary Metabolite Harzianic Acid. **Frontiers in Microbiology**, v. 30, p. 1-19, 2018.

Marra, R.; Lombardi, N.; d'Errico, G.; Troisi, J.;Scala, G.; Vinale, F.; Woo, S. L.; Bonanomi, G.; Loritom, M. Application of *Trichoderma* Strains and Metabolites Enhances Soybean Productivity and Nutrient Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Ed. ACS Publications, v. 67, p. 1814–1822, 2019. Doi: 10.1021/acs.jafc.8b06503

Mastouri, F., Björkman, T. Harman, G. E. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidante defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 25, p. 1264-1271, 2012.

Michniewicz, M., Zago, M. K., Abas, L., Weijers, D., Schweighofer, A., Meskiene, T., et al. Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. **Cell**, v. 130, p. 1044-1056, 2007. doi: 10.1016/j.cell.2007.07.033

Mockaitis, K. Estelle, M. Auxin receptors and plant development: A new signaling paradigm. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 24, p. 55-80, 2008.

Nadarajah, K.K. ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Science**, v. 21, p. 5208, 2020.

Nieto-Jacobo, M.; Steyaert, J.; Salazar-Badillo, F.; Vi Nguyen, D.; Rostás, M.; Braitwaite, M; De Souza, J.; Jimenez-Bremont, J.; Ohkura, M.; Stewart, A.; Mendoza-Mendoza, A. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Plant Science**, p. 1-18, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.00102

Oliveira, A.; Junior Chagas, A.; dos Santos, G. Miller, L.; Chagas, L. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, p. 149-155, 2012.

Oljira, A.M. Hussain, T. Waghmode, T.R. Zhao, H. Sun, H. Liu, X. Wang, X. Liu, B. *Trichoderma* Enhances Net Photosynthesis, Water Use Efficiency, and Growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Salt Stress. **Microorganisms**, v. 8, 1565, 2020. Doi:10.3390/microorganisms8101565

Ortega-Garcia, J.; Montes-Belmont, R.; Rodríguez-Monroy, M.; Ramírez-Trujillo, J.; Suárez-Rodríguez, R.; Sepúlve-da-Jiménez, G. Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions. **Scientia Horticulturae**, p. 8-16, 2015.

Pedrero-Méndez, A. et al. Why is the correct selection of *Trichoderma* strains important? The case of wheat endophytic strains of *T. harzianum* and *T. simmonsii*. **Journal Fungi**, v. 7, p. 1087, 2021.

Peer, W. A.; Murphy, A. S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends Plant Science**, v. 12, p. 556-563, 2007. doi: 10.1016/j.tplants.2007.10.003

Peer, W. A., Bandyopadhyay, A., Blakeslee, J. J., Makam, S. N., Chen, R. J., Masson, P. H., et al. Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 16, p. 1898-1911, 2004. doi: 10.1105/tpc.021501

Peer, W. A.; Blakeslee, J. J.; Hanga, H.; Murphy, A. S. Seven things we think we know about auxin transport. **Molecular Plant**, v. 4, p. 487-504, 2011. doi: 10.1093/mp/ssr034

Peer, W. A.; Cheng, Y.; Murphy, A. S. Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, p. 2629-2639, 2013. doi: 10.1093/jxb/ert152

Pelagio-Flores, R.; Esparza-Reynoso, S.; Garnica-Vergara, A.; López-Bucio, J.; Herrera-Estrella, A. *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. **Frontiers Plant Science** v. 8, p. 822, 2017.

Peret, B.; De Rybel, B.; Casimiro, I.; Benkova, E.; Swarup, R.; Laplaze, L.; Beeckman, T.; Bennett, M.J. *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 399-408, 2009.

Petrásek, J.; Friml, J. Auxin transport routes in plant development. **Development**, v. 136, p. 2675-2688, 2009.

Pollastri, S.; Tattini, M. (2011). Flavonols: old compound for old roles. **Annals of Botany**, v. 108, p. 1225-1233, 2011. doi: 10.1093/aob/mcr234

Rashotte, A.; Brady, S.; Reed, R.; Ante, S.; Muday, G. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 122, p. 481-490, 2000.

Sales, C.S.; Magalhães, V.C; Neto, D.S.; Andrade, J.P.; Figueiredo, C.N.; Souza, H.G. DE.; Souza, J.T. DE.; Marbach, P.A.S. Diversidade Taxonômica e Identificação de *Trichoderma*. In: **Tópicos em Microbiologia**; Soares, A.C.F.; Evangelista-Barreto, N. S.; Marbach, P.A.S. Eds. UFRB: Cruz das Almas, Brasil, v. 8, p. 187-217, 2020.

Samuels, G. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. **Phytopathology**, p. 195-206, 2006. doi: 10.1094/PHYTO-96-0195

Scudeletti, D.; Crusciol, C.; Bossolani, J.; Moretti, L.; Momesso, L.; Servaz Tubãna, B.; De castro, S.; De Oliveira, E.; Hungria, M. *Trichoderma asperellum* inoculation as a tool for attenuating Drought Stress in Sugarcane. **Frontier in Plant Science**, Article 645542, 2021. Doi: 10.3389/fpls.2021.645542

Sesan, T.E.; Oancea, A.O.; Stefan, L.M.; Mănoiu, V.S.; Ghiurea, M.; Răut, I.; Constantinescu-Aruxandei, D.; Toma, A.; Savin, S.; Bira, A.F.; Pomohaci, C.M; Oancea, F. Effects of Foliar Treatment with a *Trichoderma* Plant Biostimulant Consortium on *Passiflora caerulea* L. Yield and Quality. **Microorganisms**, ed. 8, v. 123, 2020. Doi:10.3390/microorganisms8010123

Sharma, A. K.; Sharma, P. *Trichoderma*: Host Pathogen Interactions and Applications. **Rhizosphere Biology**. Ed. Springer Nature, Singapore, p. 331, 2020. doi: 10.1007/978-981-15-3321-1

Shu, W.; Zhou, H.; Jiang, C.; Zhao, S.; Wang, L.; Li, Q.; Yang, Z.; Groover, A.; Lu, M.Z. The auxin receptor TIR1 homolog (PagFBL 1) regulates adventitious rooting through interactions with Aux/IAA28 in *Populus*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 17, p. 338-349, 2019.

Silva, L. R. da; Valadares-Inglist, M. C.; Peixoto, G. H. S.; Luccas, B. S. G.; Muniz, P. H. P. C.; Magalhães, D. M.; Moraes, M. C. B.; Mello, S. C. M. de. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma azevedoi* promote the growth of lettuce plants and delay the symptoms of white mold. **Biological Control**, v. 152, 2021.

Singh, A.; Shukla, N.; Kabadwal, B.; Tewari, A.; Kumar, J. Review on Plant-*Trichoderma*-Pathogen Interaction. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, p. 2382-2397, 2018.

Singh, V. et al. Increasing the efficacy of *Trichoderma harzianum* for nutrient uptake and control of red rot in sugarcane. **Journal of Horticulture and Forestry**, p. 66-71, 2010.

Sood, M.; Kapoor, D.; Kumar, V.; Sheteiw, M.; Ramakrishnan, M.; Landi, M.; Araniti, F.; Sharma, A. *Trichoderma*: The "secrets" of multitasking biocontrol agent. **Plants**, p. 1-25, 2020. doi: 10.3390/plants9060762

Srivastava, S. N.; Singh, V.; Awasthi, S. K. *Trichoderma* induced improvement in growth, yield and quality of sugarcane. **Sugar Tech**, p. 166–169, 2006.

Staswick, P.E.; Serban, B.; Rowe, M.; Tiryaki, I.; Maldonado, M.T.; Maldonado, M.C.; Suza, W. Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. **Plant Cell**, v. 17, p. 616-627, 2005.

Stepanova, A.N. Yun, J. Robles, L.M. Novák, O. He, W. Guo, H. Ljung, K. Alonso, J.M. The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. **Plant Cell**, v. 23, p. 3961- 3973, 2011. doi:10.1105/tpc.111.088047

Sugiyama, A; Yazaki, K. Flavonoids in plant rhizospheres: secretion, fate and their effects on biological communication. **Plant Biotechnology**, v. 31, p. 431-443, 2014. Doi: 10.5511/plantbiotechnology.14.0917

Sukumar, P. Legué, V. Vayssières, A. Martin, F. Tuskan, G.A. Kalluri, U.C. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial

plant-microorganism interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, p. 909-919, 2013.

Tyskiewicz, R. Nowak, A. Ozimek, E. Jaroszukcise J. *Trichoderma*: the current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. **International Journal Molecular Science**, v. 23, 2022.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Barbetti, M., Li, H., Woo, S., Lorito, M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v. 72, p. 80-86, 2008.

Wang, L.; Chen, M.; Lam, P.-Y.; Dini-Andreote, F.; Dai, L.; Wei, Z. Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. **Microbiome**, ed. 10, v. 233, 2022.

Weijers, D.; Wagner, D. Transcriptional Responses to the Auxin Hormone. **Annual Review Plant Biology**, v. 67, p. 539-574, 2016. doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-112122.

Woo, S.L.; Hermosa, R.; Lorito, M.; Monte, E. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. **Nature Review Microbiology**, v. 21, p. 312-326, 2023. Doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5

Xu, X.; Li, X.; Hu, X.; Wu, T.; Wang, Y.; Xu, X.; Zhang, X.; Han, Z. High miR156 Expression Is Required for Auxin-Induced Adventitious Root Formation via MxSPL26 Independent of PINs and ARFs in *Malus xiaojinensis*. **Frontiers Plant Science**, v. 8, p. 1059, 2017.

Xu, Y. et al. Extracellular proteins of *Trichoderma guizhouense* elicit. **Plant Soil**, 17/jan, p. 133–149, 2020.

Zhang, J.; Peer, W.A. Auxin homeostasis: The DAO of catabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, p. 3145–3154, 2017.

Zhang, Q.; Gong, M.; Xu, X.; Li, H.; Deng, W. Roles of Auxin in the Growth, Development, and Stress Tolerance of Horticultural Plants. **Cells**, v. 11, p. 2761, 2022. Doi.org/10.3390/cells11172761

Zhang, S.; Gan, Y.; Xu, B. Application of Plant-GrowthPromoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1405, 2016. Doi:10.3389/fpls.2016.01405

Zhao, L.; Wang, Y.; Kong, S. Effects of *Trichoderma asperellum* and its siderophores on endogenous auxin in *Arabidopsis thaliana* under iron-deficiency stress. **International Microbiology**, Ed. Springer, 21/Jan, 2020. doi.org/10.1007/s10123-020-00122-4

CAPÍTULO 2- Isolamento e caracterização de isolados nativos de *Trichoderma* spp. quanto a solubilização de fosfato de ferro e produção de AIA

RESUMO - *Trichoderma* spp. são fungos presentes em diversos ecossistemas terrestres e podem estimular crescimento das plantas e aumentar a aquisição de nutrientes pela capacidade produção de fitohormônios, como ácido indolacético e solubilização de fósforo. Devido a diversidade das espécies de *Trichoderma* em diferentes condições de ambientes, a seleção de isolados de fungos nativos, torna-se uma importante ferramenta para desenvolver novos bioprodutos que possam incrementar a produtividade do setor. Foram realizadas duas estratégias de isolamento para obtenção de isolados nativos de *Trichoderma* spp.: 1) uso de iscas em áreas cultivadas de cana-de-açúcar; e 2) a partir de solo de rizosfera de touceiras individuais de cana-de-açúcar var. crioula, em áreas não cultivadas. Os resultados inferiram diferenças fenotípicas das colônias dos isolados nativos de *Trichoderma* spp. Todos isolados nativos foram capazes de produzir AIA, variando entre 0,51 a 623,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA. O isolado 7 produziu 623,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, 178 vezes maior produção de AIA em comparação ao isolado 18 (3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que apresentou menor capacidade de produção de AIA. Dez isolados nativos foram eficientes na solubilização de fosfato de ferro (FePO_4) variando entre 11,6 e 0,22 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ e oito isolados não apresentaram habilidade de solubilizar P a partir de FePO_4 . O isolado 15 solubilizou 11,6 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, aumentando em 53 vezes a disponibilidade de P, em comparação ao isolado 3, que apresentou a menor capacidade de solubilização de FePO_4 (0,22 $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$). As estratégias de isolamento foram eficientes para a bioprospecção de potenciais isolados nativos de *Trichoderma* spp. bioestimulantes promotores de crescimento em plantas.

Palavras-chave: auxina, *Hypocrea*, biossolubilização, fósforo

2.1 Introdução

Trichoderma (teleomorfo *Hypocrea*) é um gênero de fungos filamentosos capazes de se alimentar de outros fungos (micoparasitismo) e um colonizador de diversos ambientes (incluindo agrícolas, ecossistemas florestais, montanhosos, pastagens, desérticos, além de ecossistemas úmidos e águas marinhas) (Woo et al., 2023). Essas características podem ser atribuídas a três grandes mudanças ao longo da evolução dos hábitos nutricionais e dos papéis ecológicos (saprofitismo, micoparasitismo e simbiose), que impactaram o estilo de vida de *Trichoderma* spp., em que cada transição levou a explosões notáveis na diversificação de espécies (Harman et al., 2004; Woo et al., 2023; Contreras-Cornejo et al., 2024).

A bioprospecção de *Trichoderma* spp. em diferentes nichos agrícolas são interessantes para o estudo e seleção de potenciais isolados nativos, com características evolutivas saprofiticas e simbióticas em ambientes e interações específicas com as plantas (Woo et al., 2023).

Espécies de *Trichoderma* spp. são capazes de promover o crescimento das plantas através de mecanismos diretos, como a solubilização de fosfato insolúvel, produção de enzimas fosfatases e produção de fitohormônios (Bononi et al., 2020; Chen et al., 2021; Abdenaceur et al., 2022).

O fósforo (P) é um dos elementos mais estudados no mundo, dada a sua dinâmica e baixa disponibilidade em solos tropicais; que em sua maioria são ácidos, nos quais ocorrem combinações de P com Fe^{3+} (fosfato de ferro – FePO_4^-) e Al^{3+} (fosfato de alumínio – AlPO_4^-); e em solos próximos a alcalinidade com o Ca^{2+} (fosfato de cálcio – CaPO_4^-) (Barroso e Nahas, 2008; Pereira et al., 2021). Solos intemperizados aliados a altos teores de argilas, possuem grande capacidade de adsorção e precipitação de fosfatos, tornando o fósforo indisponível para absorção pelas plantas (Barroso e Nahas, 2008; Bononi et al., 2020; Pereira et al., 2021).

Vários estudos têm sido realizados com isolados de *Trichoderma* spp. avaliando a capacidade de solubilização de P a partir de fosfato de cálcio (Ortega-García et al., 2015; Kumar et al., 2016; Prasad et al., 2023; Khoshmanzar et al., 2019; Bader et al., 2020; Bononi et al., 2020), enquanto para solubilização de fosfato de ferro são escassos. Esse fato, evidencia a importância de avaliar outras fontes de fosfatos, visto que os solos das áreas

agrícolas do Brasil apresentam geralmente condição ácida e predomínio sesquióxidos de Fe^{3+} e Al^{3+} (Barroso e Nahas, 2008; Pereira et al., 2021).

Várias espécies de *Trichoderma* produzem fitohormônios auxínicos, especialmente o AIA, indispensável para a maioria dos processos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento das plantas (Tyskiewicz et al., 2022).

A promoção do crescimento vegetal por espécies de *Trichoderma* está fortemente associada à atividade do AIA e seus derivados (Contreras-Cornejo et al., 2009; Nieto-Jacobo, et al. 2017; Contreras-Cornejo et al., 2024). Compostos derivados de AIA produzidos por *Trichoderma* são potentes sinalizadores que induzem a atividade de Proteína Quinase ativada por Mitógeno 6 (MPK6 - Mitogen-Activated Protein Kinase 6) nas plantas hospedeiras, associados com características de crescimento e desenvolvimento das plantas (Contreras-Cornejo et al., 2015).

A bioprospecção de *Trichoderma* spp. nativos com habilidade em produção de AIA e solubilização de P, tem sido realizada em diferentes sistemas agrícolas (França et al., 2017; Haque et al., 2020; Bader et al., 2020; Oljira et al., 2020), possibilitando a seleção de isolados potenciais para o desenvolvimento de bioestimulantes.

Considerando a característica de oportunista ambiental de *Trichoderma*, o objetivo dessa pesquisa foi bioprospectar isolados nativos de *Trichoderma* spp. oriundos de ambientes naturais e agrícolas, associado a cultura da cana-de-açúcar, quanto ao potencial de solubilização FePO_4^- e a produção de AIA.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Isolamento de *Trichoderma* spp. nativos associados a cana-de-açúcar

Duas estratégias de isolamento foram realizadas para a obtenção de isolados de *Trichoderma* spp. nativos associados a cana-de-açúcar. A primeira por meio de iscas em duas áreas cultivadas com cana-de-açúcar (isentas de tratamento com produtos comerciais a base de *Trichoderma* sp.) nos municípios de Pindorama e Elisiário no Estado de São Paulo, Brasil (Figura 1) e, a segunda, a partir de solo de rizosfera de touceiras individuais de cana-de-açúcar var.

crioulas em áreas não cultivadas, nos municípios de Patos de Minas e Presidente Olegário no Estado de Minas Gerais, Brasil (Figura 2).

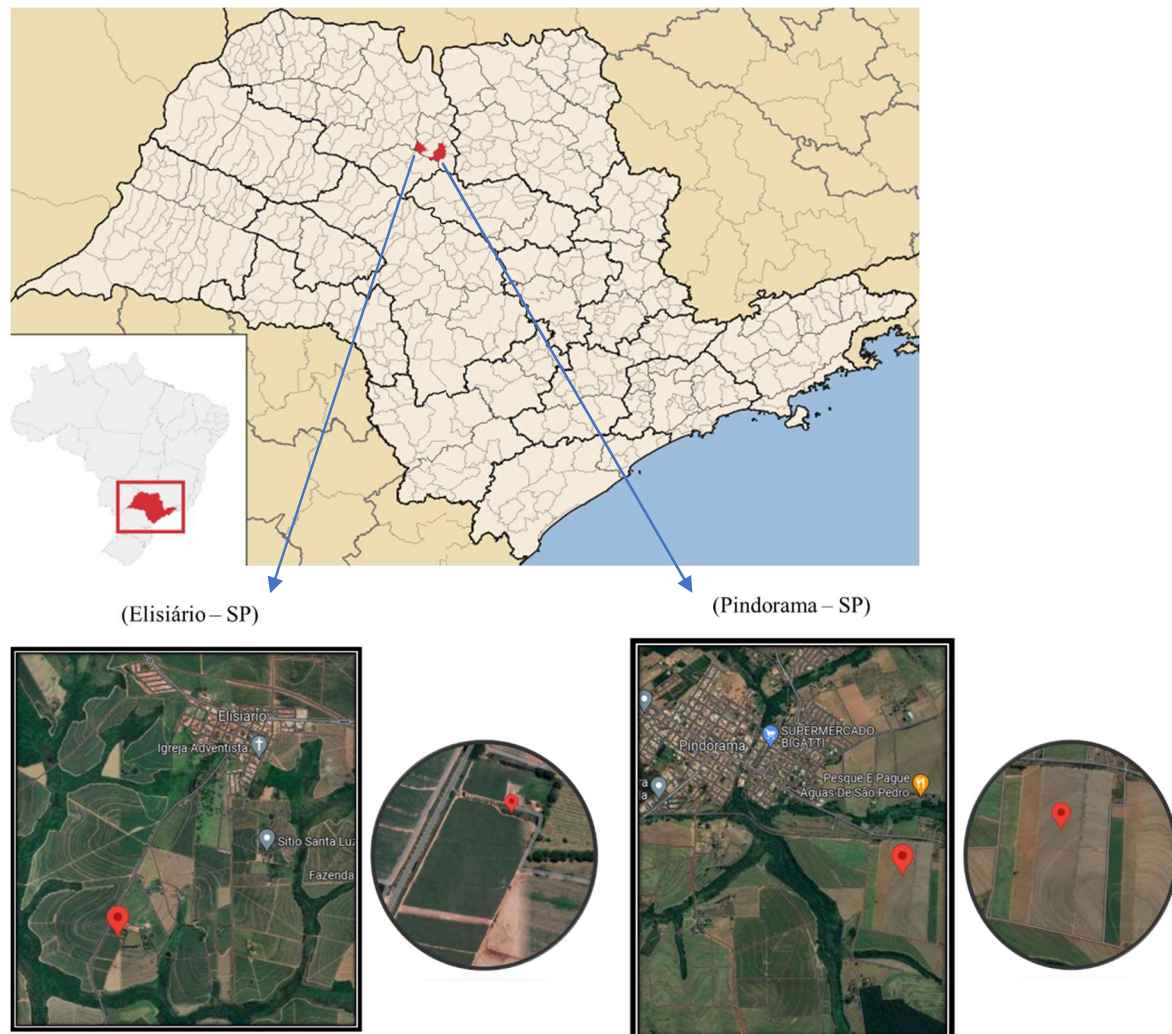


Figura 1. Local de coleta isolados nativos de *Trichoderma* spp. por meios de iscas em superfície de solo de áreas cultivadas com cana-de-açúcar.



Figura 2. Local de coleta de solo de rizosfera de plantas individuais de cana-de-açúcar variedades crioulas.

Nas áreas cultivadas de cana-de-açúcar foi realizado o isolamento On Farm por meio de iscas de toletes de cana-de-açúcar (Bernardo et al., 2019). Toletes com comprimento de 25 a 30 cm foram colocados com a parte interna voltado para baixo na superfície do solo, ao lado de touceiras na linha de plantio da cana-de-açúcar clone comercial (Figura 3). Após sete dias os toletes foram coletados e levados ao laboratório e as partes infectadas foram seccionadas e

colocadas em caixa gerbox com papel filtro adicionado de 2,5 mL água destilada e incubadas em câmara de germinação tipo BOD a 28° C com fotoperíodo de 12h.

Após cinco dias, os micélios de fungos com características de *Trichoderma* spp. foram transferidos para toletes saudáveis de cana-de-açúcar com 7 a 10 cm de comprimento, colocados dentro de caixas gerbox com papel de filtro (2,5 mL água destilada) e incubadas novamente BOD nas mesmas condições de temperatura e fotoperíodo. Após 5 dias de colonização do tolete, transferiu-se as estruturas puras em meio de cultura BDA. Foi realizado para confirmação a observação em microscópio de luz das estruturas reprodutivas características de *Trichoderma* spp.

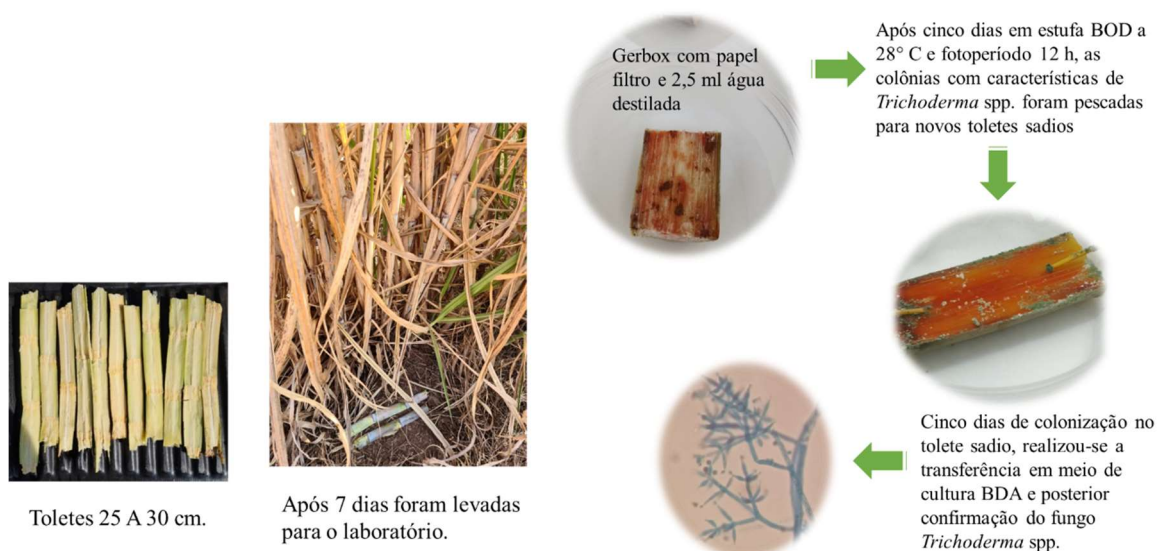


Figura 3. Isolamento de *Trichoderma* spp. a partir de iscas em superfície de solo (método On farm) em áreas cultivadas de cana-de-açúcar.

Os isolamentos de *Trichoderma* spp. a partir do solo de rizosfera foram obtidos de touceiras de plantas individuais de cana-de-açúcar cultivada em área não cultivada, de crescimento natural no ambiente. Foram coletados 300 g de solo de rizosfera de duas touceiras de cana-de-açúcar (amostra de Patos de Minas - var. caiana amarela e amostra de Presidente Olegário - var. caiana roxa) e colocadas em sacos plásticos sendo posteriormente armazenadas em geladeira até o momento do isolamento em laboratório.

Para cada amostra foi realizado o método de diluição seriada e 1 g de solo foi adicionado 9 mL de água destilada autoclavada em tubos de ensaio e

realizadas diluições seriadas até concentração de 10^{-4} (Figura 4). Em seguida 100 μL foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA, suplementado com 200 mg L^{-1} de cloranfenicol e 1 mL L^{-1} de Triton X-100 (Barbosa et al., 2021). Após três a oito dias de incubação em estufa BOD a 28°C e fotoperíodo 12 h luz/12 h escuro, colônias com característica de *Trichoderma* spp. foram repicados para obtenção das culturas puras.

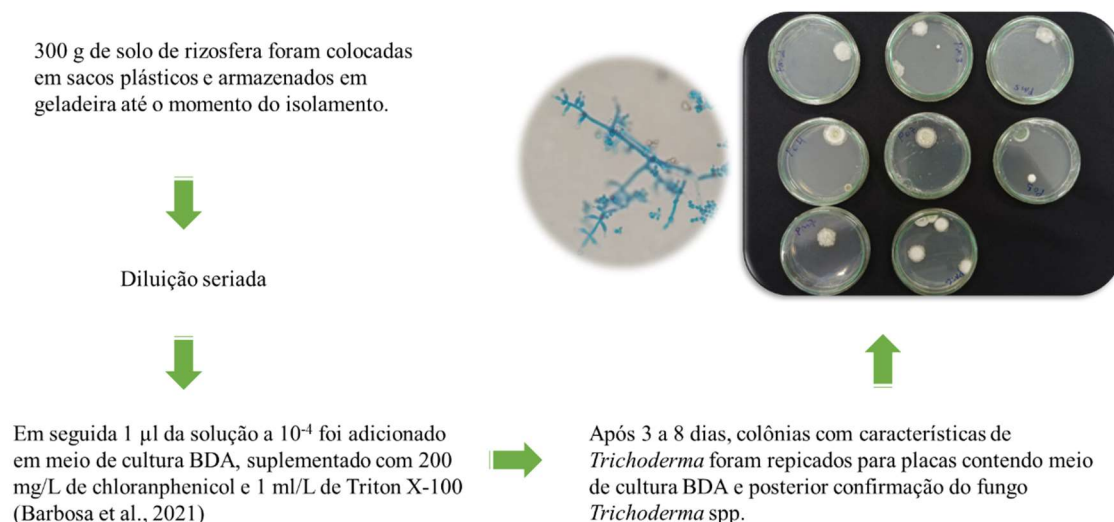


Figura 4. Isolamento de *Trichoderma* spp. a partir de solo de rizosfera de planta individual de cana-de-açúcar var. crioula.

Após esporulação dos isolados, foram realizadas em microscópio óptico, observações para confirmação das estruturas reprodutivas anamórfas características de *Trichoderma* spp. Todos os isolados obtidos foram preservados pelo método de Castellane e de tubo inclinado com óleo mineral.

Os registros fotográficos das colônias de *Trichoderma* spp. foram realizados por meio do método PRHQ, proposto por Rodrigues et al. (2022).

Os isolados nativos de *Trichoderma* spp. obtidos foram registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) – cadastro AB2BC5F (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados nativos de *Trichoderma* spp., obtidos por meio de iscas em áreas de canaviais (EL e PI) e do solo de rizosfera de touceiras de cana-de-açúcar (PM e PO).

Código	Isolados de <i>Trichoderma</i>	Método de coleta / ambiente	Cana-de-açúcar	Cidade/Estado	Coordenadas geográficas
2	EL1	Solo de superfície / área agrícola	Clone comercial	Elisiário - SP	21°11'13.9"S 49°07'18.1"W
3	EL2				
4	EL3				
5	PI1	Solo de superfície / área agrícola	Clone comercial	Pindorama - SP	21°11'55.8"S 48°53'21.0"W
6	PI2				
7	PI3				
8	PM2	Solo de rizosfera de touceira individual / ambiente não agrícola	Clone var. crioula caiana amarela	Patos de Minas - MG	18°32'22.5"S 46°27'37.8"W
9	PM3.1				
10	PM3.2				
11	PM5				
12	PM6				
13	PM6.1				
14	PM6.2				
15	PM6.3				
16	PM7	Solo de rizosfera de touceira individual / ambiente não agrícola	Clone var. crioula caiana roxa	Presidente Olegário - MG	18°18'19.6"S 46°10'26.6"W
17	PO4				
18	PO5				
19	PO7				

2.2.2 Capacidade de solubilização de fosfato de ferro (FePO₄)

Para determinar a capacidade de solubilização de fósforo foi utilizado o meio de cultura líquido MS – mod. (Barroso e Nahas, 2008) utilizando como fonte de P o fosfato de ferro (FePO₄). O meio líquido foi fracionado 50 mL em erlenmeyer de 250 mL, cobertos com gaze e alumínio, seguido de autoclavagem a 120°C a 1 atm por 15 minutos. Após resfriamento a inoculação foi realizada utilizando 2 discos de 0,8 mm de diâmetro, contendo micélios e conídios dos isolados nativos de *Trichoderma* spp. cultivados em meio BDA, e incubados em câmara BOD à temperatura de 30°C, sem agitação na ausência de luz durante 11 dias.

Ao final do período de incubação, o meio de cultura foi filtrado em funil de vidro com papel de filtro Whatman n° 1. A determinação do fósforo solubilizado foi realizada pelo método de Ames (Ames, 1996), utilizando microtubos de

ependorf de 1,5 mL, contendo 50 μL do filtrado dos isolados, 750 μL de água ultrapura e 700 μL de solução de Ames, seguido de agitação em vortex e incubação em estufa a 45°C por 20 minutos; após a incubação foram realizadas leituras com quatro repetições utilizando espectrofotômetro digital UV-visível (modelo GTA-96, Global Analyzer) com absorvância de 820 nm em cubeta de vidro. A curva padrão para quantificação de P foi realizada a partir de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) ($0,1753 \text{ g L}^{-1} = 40 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$) e as concentrações calculadas em $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ (Gráfico 1).

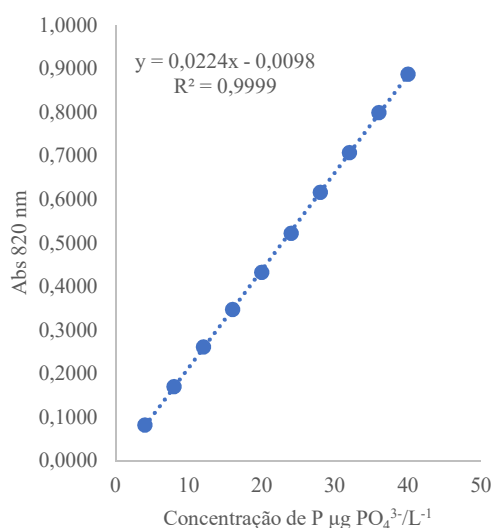


Gráfico 1. Curva padrão de calibração para quantificação de fósforo (P), utilizando fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) - ($0,1753 \text{ g L}^{-1} = 40 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$).

2.2.3 Capacidade de produção de ácido indolacético (AIA)

Para determinação da produção de AIA pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp. foi utilizado a metodologia (Oliveira et al., 2012), com algumas modificações na concentração de L-Triptofano e o volume do meio de cultura. Foi utilizado o meio de cultura BD (caldo batata-dextrose) sem antibiótico, suplementado com $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de L-Triptofano. Em erlenmeyer de 250 mL foi fracionado 120 mL do meio $\text{BD}^{+\text{Tri}p}$, cobertos com gaze e alumínio, seguido de autoclavagem a 120°C a 1 atm por 15 minutos.

Após resfriamento a inoculação foi realizada utilizando um disco de 0,8 mm de diâmetro dos isolados crescido em BDA contendo micélio e conídios e

mantidos em incubadora Shaker (modelo NL 343) sob agitação a 200 rpm, 28 °C na ausência de luz por 9 dias.

Para a determinação do AIA, diariamente foi retirado uma alíquota de 10 mL do material incubado e transferido para tubos falcon de 15 mL em seguida foi centrifugado a 12000 rpm por 15 min.

A análise colorimétrica de AIA utilizou a metodologia de Gordon e Weber (1951). A reação foi realizada utilizando microtubo eppendorf de 1,5 mL: contendo 500 µL do reagente Salkowski (FeCl_3 0,5 mol L^{-1} + HClO_4 (35%)) e 1000 µL do sobrenadante do isolado, seguido de incubação por 25 min no escuro. Após a incubação as leituras foram realizadas com quatro repetições, utilizando espectrofotômetro digital UV-visível (modelo GTA-96, Global Analyzer) a 530 nm de absorvância, com uso de cubeta de Quartzo. As concentrações, $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram calculadas a partir de uma curva padrão de AIA na forma sintética, na concentração de 0,015 g 100 mL^{-1} (Gráfico 2).

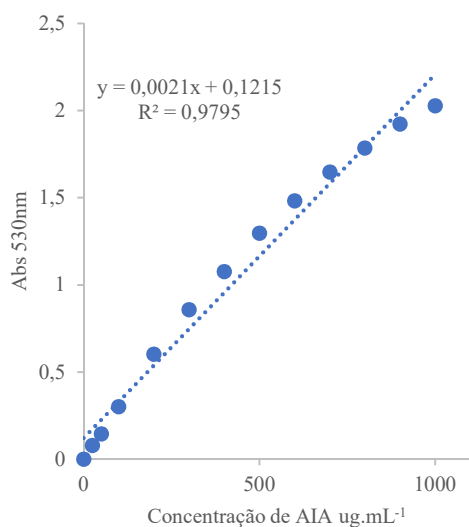


Gráfico 2. Curva padrão de AIA sintético, na concentração de 0,015 g 100 mL^{-1}

2.2.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e analisados utilizando software Minitab para verificação de outlier e teste de normalidade. Posteriormente foram realizadas as análises de variância das médias (ANOVA) e comparadas pelo

teste de Scott-Knott a 1% de significância ($p < 0,01$), por meio do software Sisvar e a elaboração dos gráficos utilizando o software SigmaPlot 12.5.

2.3 Resultados e Discussão

Foram obtidos 18 isolados de *Trichoderma* spp., sendo seis isolados por meio das iscas colocadas na superfície do solo das áreas cultivadas com cana-de-açúcar: três isolados denominados: 2-EL1, 3-EL2 e 4-EL3, oriundos da cidade de Elisiário-SP e três isolados denominados 5-PI1, 6-PI2 e 7-PI3, oriundos da cidade de Pindorama-SP (Tabela 1).

Os outros 12 isolados foram obtidos do solo de rizosfera de touceiras individuais var. crioulas em área não cultivadas: nove isolados denominados como 8-PM2; 9-PM3.1, 10-PM3.2; 11-PM5; 12-PM6, 13-PM6.1, 14-PM6.2, 15-PM6.3 e 16-PM7, associados a rizosfera da var. caiana amarela, oriundos da cidade de Patos de Minas-MG e três isolados denominados 17-PO4, 18-PO5 e 19-PO7, associados a rizosfera da var. caiana roxa, oriundos da cidade de Presidente Olegário-MG.

Devido aos diferentes ambientes e método de coleta das amostras (superfície de solo, tipo de solo e genética das plantas de cana-de-açúcar), foi observado diferenças fenotípicas das colônias e estruturas reprodutivas entre isolados nativos de *Trichoderma* spp. obtidos (Figuras 5 a 9).

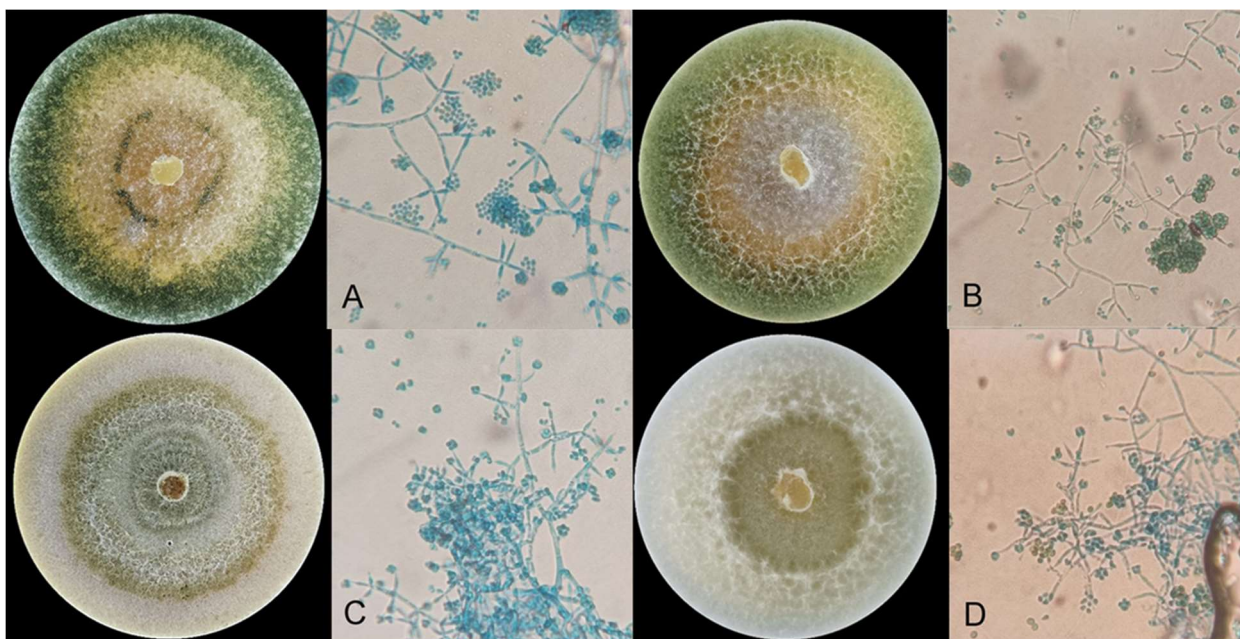


Figura 5. Aspecto das colônias aos 14 dias, conidióforos e conídios de isolados nativos de *Trichoderma* spp. associados a cana-de-açúcar: A-2 EL1; B-3 EL2; C-4 EL3; D-5 PI1;

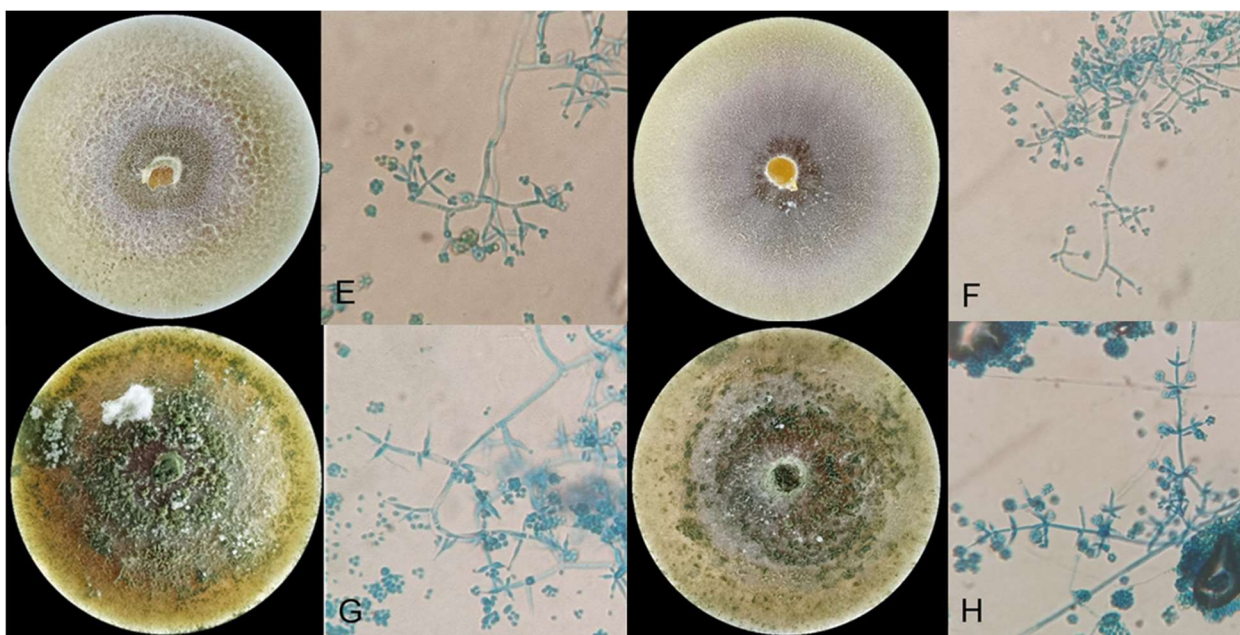


Figura 6. Aspecto das colônias aos 14 dias, conidióforos e conídios de isolados nativos de *Trichoderma* spp. associados a cana-de-açúcar: E-6 PI2; F- 7 PI3; G- 8 PM2; H- 9 PM3.1;

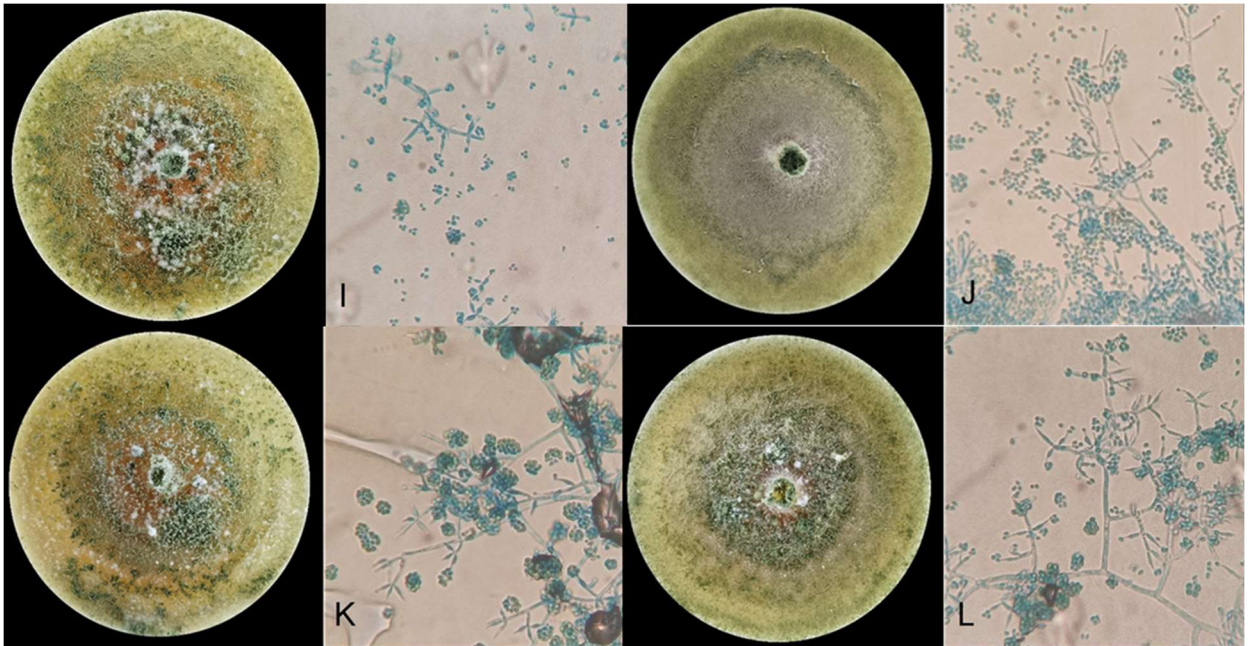


Figura 7. Aspecto das colônias aos 14 dias, conidióforos e conídios de isolados nativos de *Trichoderma* spp. associados a cana-de-açúcar: I- 10 PM3.2; J- 11 PM5; K- 12 PM6; L- 13 PM6.1;

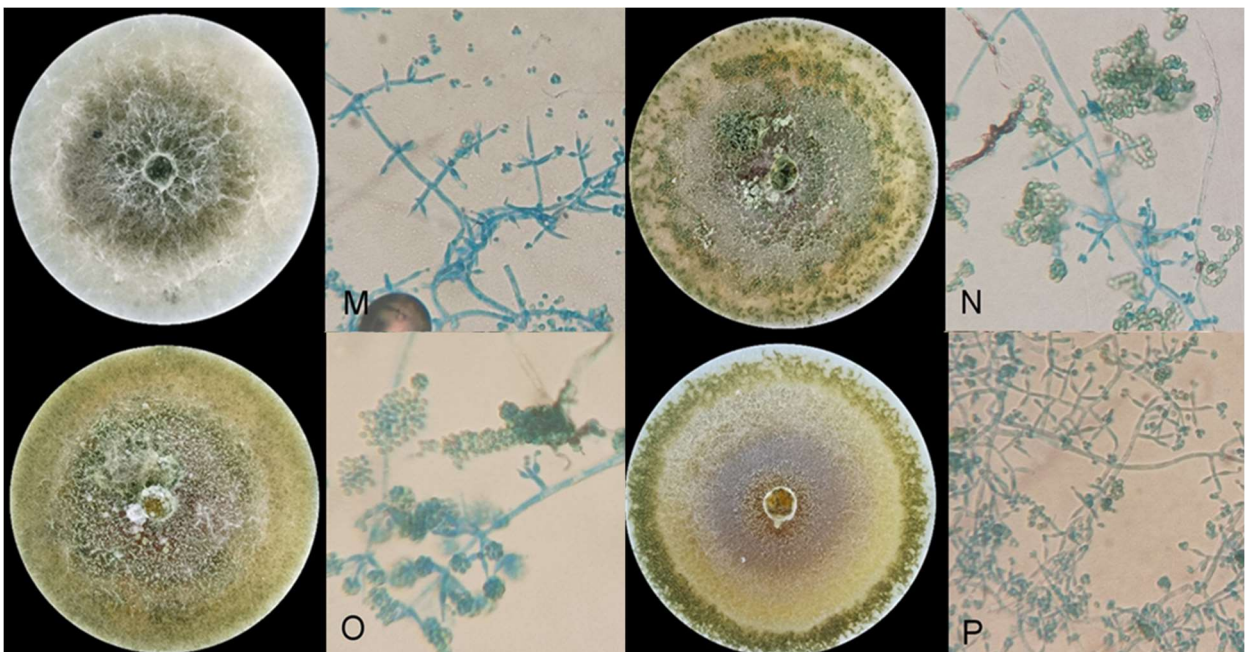


Figura 8. Aspecto das colônias aos 14 dias, conidióforos e conídios de isolados nativos de *Trichoderma* spp. associados a cana-de-açúcar: M- 14 PM6.2; N- 15 PM6.3; O- 16 PM7; P- 17 PO4.

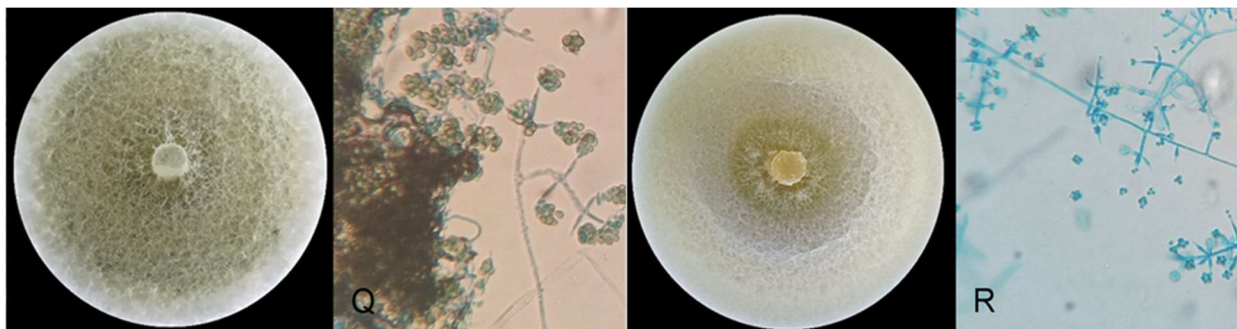


Figura 9. Aspecto das colônias aos 14 dias, conidióforos e conídios de isolados nativos de *Trichoderma* spp. associados a cana-de-açúcar: Q- 18 PO5; R- 19 PO7.

2.3.1 Solubilização de FePO_4^- pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Os resultados da capacidade de solubilização de fósforo entre os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram diferenças significativas (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de fósforo ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) solubilizado por isolados nativos de *Trichoderma* spp. a partir de fosfato de ferro (FePO_4^-).

Código isolado	[] $\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$ *
2	1,3 e
3	0,7 f
4	0,0 f
5	0,0 f
6	1,7 e
7	4,4 d
8	1,7 e
9	0,0 f
10	0,2 f
11	0,0 f
12	0,0 f
13	0,0 f
14	6,9 c
15	11,6 a
16	0,0 f
17	0,0 f
18	3,7 d
19	8,7 b
CV%	34,32
NMS:0,01	0,00

*Letras diferentes diferem estatisticamente pela análise de variâncias das médias (ANOVA) e o teste de Scott-Knott $p < 0,01$.

Os maiores valores de solubilização de fósforo a partir de FePO_4^- , foram obtidos pelos isolados 15 ($11,6 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$), 19 ($8,7 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) e 14 ($6,9 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$), apresentando diferenças significativas entre si e em comparação aos demais isolados (Gráfico 3).

Os isolados 7 e 18 solubilizaram $4,4$ e $6,7 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, respectivamente, não havendo diferenças entre si, mas apresentaram diferenças significativas comparados aos demais (Gráfico 3).

Os isolados 2, 8 e 6 solubilizaram $1,25$, $1,67$ e $1,65 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, respectivamente, diferenciando significativamente dos outros isolados (Gráfico 3).

Os isolados 3 e 10 solubilizaram pequenas quantidades de P, $0,22$ e $0,65 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$, respectivamente, porém, não se diferenciaram significativamente dos isolados 4, 5, 9, 11, 12, 13, 16 e 17 que não apresentaram capacidade de solubilizar P a partir de FePO_4^- (Gráfico 3).

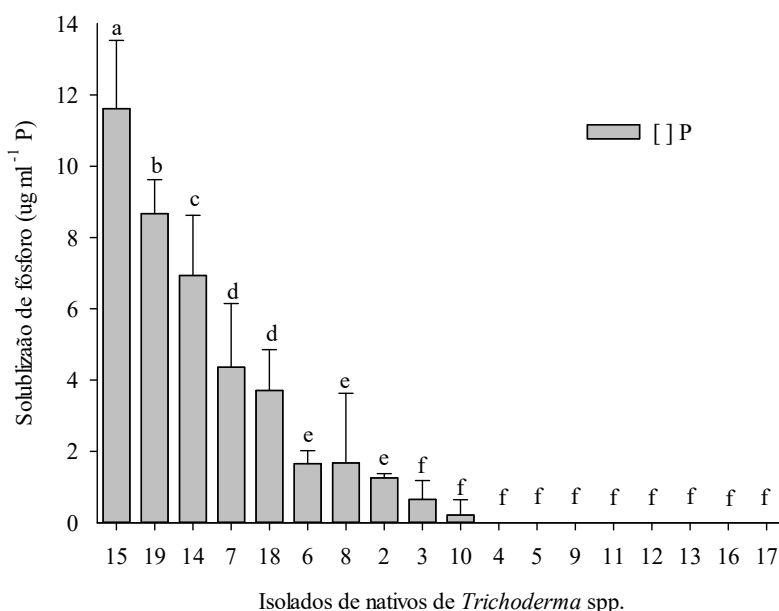


Gráfico 3. Solubilização de P ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por isolados de *Trichoderma* spp. a partir de fosfato de ferro após 11 dias de incubação. Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-knott a 1% de probabilidade.

A diferenças na capacidade de solubilização de FePO_4^- pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp. mostram a importância de se avaliar outras fontes

de fosfatos com forte energia de retenção do P precipitado, visto que a mesma capacidade de solubilização não pode ser atribuída a todos isolados e outras fontes de fosfato como de AlPO_4^- alumínio e CaPO_4^- (Barroso e Nahas, 2008).

Diversas pesquisas realizadas com isolados de *Trichoderma* spp. tem avaliado a capacidade de solubilização de P a partir de fontes de fosfato de cálcio (Ribas et al., 2016; Bader et al., 2020; Bononi et al., 2020; Khoshmanzar et al., 2020; Prasad et al., 2023), que possui fraca energia de precipitação do P, em relação a retenção com alumínio e ferro, respectivamente (Barroso e Nahas, 2008; Pereira et al.; 2021).

Promwee et al (2014), avaliaram quatro isolados nativos de *Trichoderma* spp., oriundos de amostras de solo de seringueiras e de solo florestal na Tailândia, quanto a capacidade de solubilização de fósforo a partir de rocha fosfática, no qual utilizou a fonte de fosfato de ferro para obtenção da curva de calibração da concentração de fósforo P ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Os autores encontraram valores de concentração de variando de $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $9,31 \mu\text{g mL}^{-1}$ de P.

Em comparação aos valores encontrados por Promwee et al (2014), maiores valores de solubilização de fósforo (P-Fe) foram obtidos pelos isolados 15 ($11,6 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$) e 19 ($8,7 \mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$), o que pode indicar bom potencial desses isolados nativos de *Trichoderma* spp. para o aumento da disponibilidade de P para as plantas.

A solubilização de FePO_4^- por isolados de *Trichoderma* spp. ainda são pouco investigadas (Tabela 3), havendo a necessidade de mais pesquisas direcionadas a investigação e elucidação dos mecanismos envolvidos na bio-solubilização entre as diferentes fontes de fosfatos, em especial FePO_4^- encontrado nos solos tropicais.

Tabela 3. Concentração de fósforo (P) solubilizado por isolados de *Trichoderma* spp. a partir de fosfato de cálcio (CaPO_4^-) e ferro (FePO_4^-).

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Origem	CaPO_4^-	FePO_4^-	Referência
Nativos de <i>Trichoderma</i> spp.	Solo florestal (Tailândia)	-	6,25 a 9,31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P	Promwee et al (2014)
Nativos de <i>T. harzianum</i>	Solo hortícola (Argentina)	215,80 e 288,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P	NA	Bader et al (2020)
<i>T. asperellum</i> e <i>T. viride</i>	Solo rizosfera de cana-de-açúcar (Índia)	410,3 e 459,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P	NA	Haque et al (2020)
<i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i>	NI	24,76 e 20,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P	NA	Chagas et al (2017)
<i>Trichoderma</i> spp.	Solo de área de produção orgânica	7,06 a 11,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P	NA	França et al (2017)
<i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i>	NI	9,9 e 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P	NA	Junior et al (2019)
<i>Trichoderma</i> spp.	NI	2,0 a 9,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P	NA	Ribas et al (2016)
Nativos AMS <i>Trichoderma</i> spp.	Solo florestal da Amazônia	2 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P	NA	Bononi et al (2020)

NI= não indicado; NA=não avaliado.

Bader et al (2020) avaliaram a solubilização de fósforo em meio NBRIP com fosfato tricálcico, de cinco isolados nativos de *T. Harzianum*, obtidos de solos hortícolas na província de Buenos Aires, na Região do Pampa, Argentina, nos quais apresentam concentração de fósforo solúvel nos filtrados variando entre 215,80 e 288,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Isolados de *T. asperellum* e *T. viride*, obtidos do solo de rizosfera em de área de cana-de-açúcar na Índia, foram capazes de solubilizar alta concentração de fosfato de cálcio, 410,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 459.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P, respectivamente (Haque et al., 2020). Chagas et al (2017) avaliou isolados de *T. Asperellum* e *T. harzianum* capazes de solubilizar fósforo a partir de fosfato de cálcio, nos quais apresentaram diferenças entre concentrações de 24,76 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 20,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. França et al., 2017 demonstraram que isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de solos de áreas de produção orgânica de tomateiro, foram capazes de solubilizar fosfato tricálcico em meio NBRIP, variando 7,06 a 11,10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Junior et al (2019) avaliaram a capacidade de solubilização de fósforo a partir de fosfato tricálcico por isolados de *T. asperellum* e *T. harzianum*,

e observaram valores de concentração de P de 9,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Ribas et al (2016) observaram baixa solubilização de fosfato de tricálcio obtidas por isolados de *Trichoderma* spp. variando de 2,0 a 9,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de P.

Existe grandes variações entre isolados de *Trichoderma* spp. com capacidade de solubilizar fósforo, independente da fonte de fosfato, isso demonstra a importância da seleção de isolados para os estudos de promoção de crescimento das plantas via solo.

2.3.2 Produção de AIA pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram capacidade de produção de AIA, com grandes diferenças significativas na concentração ao longo de nove dias de incubação (Tabela 4).

Tabela 4. Concentração de AIA produzido por isolados nativos de *Trichoderma* spp. na presença de L-Triptofano.

Código isolado	[] $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$ *
2	172,8 g
3	518,5 c
4	361,0 d
5	207,0 f
6	342,5 e
7	623,5 a
8	51,5 j
9	56,3 j
10	55,0 m
11	85,3 i
12	168,0 g
13	69,3 i
14	48,5 j
15	32,8 l
16	147,3 h
17	154,0 h
18	35,0 m
19	580,0 b
CV%	4,75
NMS:0,01	0,00

*Letras diferentes diferem estatisticamente pela análise de variâncias das médias (ANOVA) e o teste de Scott-Knott $p < 0,01$.

Os isolados 11 ($85,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), 13 ($69,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), 9 ($56,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), 8 ($51,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), 10 ($5,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), 15 ($32,8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 18 ($3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), apresentaram significativamente as menores concentrações de AIA em comparação com os demais isolados (Tabela 4).

Os isolados 4 ($361 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 6 ($342,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) não apresentaram diferenças significativas entre si na produção de AIA, bem como os isolados 2 ($172,8 \mu\text{g mL}^{-1}$), 12 ($168 \mu\text{g mL}^{-1}$), 17 ($154 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 16 ($147,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Gráfico 4).

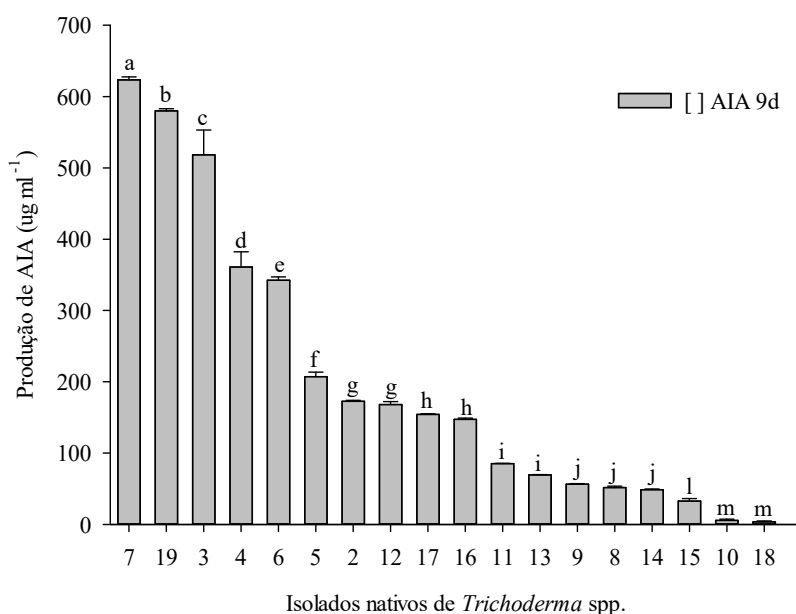


Gráfico 4. Produção de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por isolados nativos de *Trichoderma* spp. aos nove dias de incubação. Barras seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente, segundo o teste de Scott Knott a 1% de probabilidade.

Os isolados 7, 19 e 3, produziram as maiores concentrações de AIA, com valores de $623,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $580 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $518,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, apresentando diferenças significativas entre si (Gráfico 4).

O isolado 7 apresentou singular coloração do sobrenadantes após reação com reagente Salkowski em comparação aos outros isolados de *Trichoderma* spp., despertando a atenção quanto ao potencial de produção de AIA, visto que apresentou a maior média de concentração de AIA ($623,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ AIA) (Figura 10).

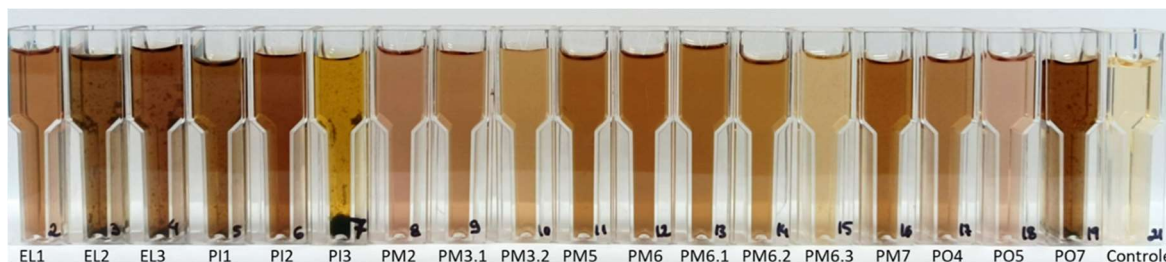


Figura 10. Coloração do sobrenadante após reação com reagente Salkowski ao 9º dia de incubação para produção de AIA pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Nieto-Jacobs et al (2017), observou mudança na coloração do sobrenadante de um isolado de *T. virens* contendo AIA e derivados de AIA na ausência de L-Triptofano e que na presença não foi tão evidente.

Contreras-Cornejo et al (2009) verificaram que um isolado de *T. virens* produziu três compostos auxínicos: ácido indol-3-acético (AIA), ácido-indol-3-acetaldeído (AIAld) e ácido-indol-3-etanol (AIEt), tanto na presença e ausência do precursor L-Triptofano. Os autores observaram concentrações de $13,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, $59,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIAld e $72,33 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIEt na ausência de L-Triptofano; e concentrações de $233,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, $70,15 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIAld e $141,88 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIEt na presença de L-Triptofano, sendo este último somam um total de $445 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA e derivados, valor próximo apresentado pelos isolados nativos 3, 4, 6, 7 e 19.

Haque et al (2020) analisaram dois isolados de *Trichoderma* spp. obtidos do solo de áreas cultivadas com cana-de-açúcar e encontrou valores altos de produção de AIA de $120.31 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo isolado MK937669 (*T. asperellum*) e $130.101 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo isolado MK503705 (*T. viride*).

Em comparação aos resultados obtidos por Haque et al (2020) e aos obtidos pelos isolados 7 ($623,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), 19 ($580 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 3 ($518,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) de *Trichoderma* spp. nativos deste trabalho, também associados a cana-de-açúcar, apresentou concentrações bem superiores. Essas concentrações de AIA produzidas por esses isolados, podem ser consideradas até o momento as mais altas relatadas, diante outras pesquisas realizadas com diferentes isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração de AIA e derivados ($\mu\text{g mL}^{-1}$) produzido por isolados de *Trichoderma* spp.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Origem	AIA	Referência
Nativos de <i>Trichoderma</i> spp.	Solo de cultivo de Oliveiras	1,30 a 21,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Abdenaceur et al (2022)
Nativos de <i>T. harzianum</i>	Solo hortícola (Argentina)	7,19 a 21,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Bader et al (2020)
<i>T. asperellum</i> e <i>T. viride</i>	Solo rizosfera de cana-de-açúcar (Índia)	120,31 e 130,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Haque et al (2020)
<i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i>	NI	3,9 e 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Chagas et al (2017)
<i>Trichoderma</i> spp.	Solo de área de produção orgânica	42 e 44 $\mu\text{g mL}^{-1}$	França et al (2017)
<i>T. asperellum</i> e <i>T. harzianum</i>	NI	1,9 e 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Junior et al (2019)
<i>Trichoderma</i> spp. halotolerantes	Solo de rizosfera de <i>Tamarix chinensi</i> em área de fitorremediação (China)	0,05 e 0,11 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Oljira et al (2020)
<i>T. asperellum</i> e <i>T. longibrachiatum</i>	Solo rizosfera de banana	não produziram AIA	Santos et al (2021)
<i>T. virens</i>	NI	233,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA, 70,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIAId e 141,88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIEt	Contreras-Cornejo et al (2009)

NI=não identificado

Bader et al (2020) demonstraram que 19 isolados nativos de *Trichoderma* spp., obtidos de solos hortícolas na província de Buenos Aires, na Região do Pampa, Argentina, foram capazes de produzir AIA, variando de 7,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 21,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que quatro isolados de *T. harzianum* (FCCT 16, FCCT 58, FCCT 199-2 e FCCT 363-2), exibiram as maiores concentrações, 15,98 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 13,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 17,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 21,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Abdenaceur et al (2022) avaliaram 15 isolados *Trichoderma* spp. obtidos do solo em áreas de cultivo de oliveiras e todos foram capazes de produzir AIA, variando de 1,30 a 21,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em um grupo de 17 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos de solos de áreas de produção orgânica de tomateiro, somente dois isolados, F e G foram capazes de produção de AIA, apresentando valores de 42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 44 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (França et al., 2017). Junior et al (2019) avaliaram a capacidade de produção de AIA de isolados de *T. asperellum* e *T. harzianum*, e

observaram valores de concentração de AIA de $1,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Oljira et al (2020) analisaram dois isolados *Trichoderma* spp. halotolerantes (adaptação a alta salinidade), coletados da rizosfera de Tamarindo rosa (*Tamarix chinensis* L.) em área de fitorremediação na China, quanto a produção de AIA, os quais produziram $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*T. afroharzianum*) e $0,11 \mu\text{g mL}^{-1}$ (*T. yunnanense*) tanto na presença de estresse salino (200 mM NaCl), quanto na ausência do estresse salino.

As variações na capacidade e concentrações de produção de AIA por diferentes isolados de espécies de *Trichoderma* spp. são esperadas e verificadas em diferentes estudos. A produção de AIA é dependente do isolado de *Trichoderma* spp. e vários estímulos externos estão associados à sua produção (Nieto-Jacobo et al., 2017), como a ausência ou presença do precursor L-Triptofano e sua concentração utilizada, valor de pH, temperatura, salinidade e tempo de incubação (Napitupulu et al., 2019).

Os isolados de *Trichoderma* spp. nativos apresentaram alta amplitude na concentração de AIA produzida ($3,5$ a $623,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), com valores mais altos comparado com outros isolados de *Trichoderma* spp. mencionados anteriormente.

2.4 Conclusão

Metodologias de bioprospecção em agroecossistemas mostrou ser uma importante ferramenta para obtenção de potenciais isolados nativos de *Trichoderma* spp. com habilidade de produção de AIA e solubilização de P.

A solubilização do fosfato de ferro e produção de AIA apresentaram diferenças entre os isolados nativos de *Trichoderma* spp., podendo o mesmo isolado ter alta capacidade de produção de AIA e baixa capacidade de solubilização de fosfato de ferro e vice e versa.

Os isolados 7 e 15 mostraram-se candidatos potenciais para produção de AIA e solubilização P a partir de FePO_4 , respectivamente.

2.5 Referências

Abdenaceur, R.; Farida, B.; Mourad, D.; Rima, H.; Zahia, O.; Fatma, S. Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. **International Microbiology**, p. 817-829, 2022. Doi: 10.1007/s10123-022-00263-8

Ames, B.N. Assay of Inorganic Phosphate, Total Phosphate and Phosphatases. **Methods in Enzymology**, p. 115-118, 1966. Doi: 10.1016/0076-6879(66)08014-5

Bader, A.; Salerno, G.; Covacevich, F.; Consolo, V. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control with disease on tomato (*Solanum Lycopersicum* L.). **Journal of King Saud University**, Ed. Science, p. 867-873, 2020. Doi: 10.1016/j.jksus.2019.04.002

Barbosa, G.; Costa, F.; Costa, A.; Ulhoa, C. Isolados de *Trichoderma* spp. nativos do Estado de Mato Grosso do Sul contra o fungo *Colletotrichum musae*. **Brazilian Journal of Development**, v. 29, p. 484-502, 2021. Doi:10.34117/bjdv7n3-592

Barroso, C.; Nahas, E. Solubilização de fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p. 529-535, 2008.

Bernardo, J.; Aguilera, J.; Da Silva, R.; Vian, R.; Niella, G.; Ulhoa, C.; Medeiros, I. Isolamento on farm de *Trichoderma*: uma ferramenta no controle de doenças de solo para os agricultores no Brasil. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, p. 263-270, 2019. Doi: 10.21674/2448-0479.53.263-270

Bononi, L.; Chiaramonte, J.; Pansa, C.; Moitinho, M.; Melo, I. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant. **Scientific Reports**, p. 1-13, 2020. Doi: 10.1038/s41598-020-59793-8

Chagas, L.F.B; Junior, A.F.C.J; Castro, H. G. Phosphate solubilization capacity and indole acetic acid production by *Trichoderma* strains for biomass increase on basil and mint plants. **Brazilian Journal of Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 176 -185, 2017.

Chen, D.; Hou, Q.; Jia, L.; Sun, K. Combined use of two *Trichoderma* strains to promote growth of pakchoi (*Brassica chinensis* L.). **Agronomy**, p. 1-11, 2021. doi: 10.3390/agronomy11040726

Contreras-Cornejo, H.; Macías-Rodríguez, L.; Cortés-Penagos, C.; López-Bucio, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, p. 1579-1593, 2009. Doi: 10.1104/pp.108.130369

Contreras-Cornejo, H.A. Schmoll, M. Esquivel-Ayala, B.A.E. Gonzalez-Esquivel, C.E. Rocha-Ramírez, V. John Larsen, J. Mechanisms for plant growth promotion activated by *Trichoderma* in natural and managed terrestrial ecosystems. **Microbiological Research**, v. 281, 2024.

Contreras-Cornejo, H.A.; Lopez-Bucio, J.S.; Mendez-Bravo, A.; Macías-Rodríguez, L.; Ramos-Vega, M.; Guevara-García, A.A.; Lopez-Bucio, J. Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 28, p. 701–710, 2015.

França, D.V.C; Kupper, K.C; Magri, M.M.R; Gomes, T.M.; Rossi, F. *Trichoderma* spp. isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 47, n. 4, p. 360-368, Oct./Dec. 2017.

Gordon, S.A.; Weber, R.P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**, p. 192-195, 1951. Doi: 10.1104/pp.26.1.192

Haque, Z.; Iqbal, M.; Ahmad, A.; Khan, M.; Singh, S.; Prakash, J. Explorations of tolerant *Trichoderma* spp. as plant growth promoter and biocontrol agent against *Colletotrichum falcatum*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, p. 327-339, 2020. Doi: 10.22207/JPAM.14.1.34

Harman, G.; Howell, C.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, p. 43-56, 2004.

Junior, A.F.C; Chagas, L.F.B; Miller, L.O.M. Oliveira, J.C. Efficiency of *Trichoderma asperellum* UFT 201 as plant growth promoter in soybean. **African Journal of Agricultural Research**, v. 14, p. 263-271, 31/Jan, 2019. DOI: 10.5897/AJAR2018.13556

Khoshmanzar, E., Aliasghar zad, N., Neyshabouri, M.R. et al. Effects of *Trichoderma* isolates on tomato growth and inducing its tolerance to water-deficit stress. **International Journal Environment Science and Technology**, v. 17, p. 869–878, 2020. Doi.org/10.1007/s13762-019-02405-4

Kumar, K.; Manigundan, K.; Amaesan, N. Influence of salt tolerant *Trichoderma* spp. on growth of maize (*Zea mays*) under different salinity conditions. **Journal Basic Microbiology**, p. 141-150, 2017. Doi.org/10.1002/jobm.201600369

Napitupulu, T.P. Kanti, A. Sudiana, I.M. Evaluation of the environmental factors modulating indole-3-acetic acid (IAA) production by *Trichoderma harzianum* InaCC F88. IOP Conference Series: **Earth Environmental Science**, p. 308, 2019.

Nieto-Jacobo, M.; Steyaert, J.; Salazar-Badillo, F.; Vi Nguyen, D.; Rostás, M.; Braitwaite, M.; De Souza, J.; Jimenez-Bremont, J.; Ohkura, M.; Stewart, A.; Mendoza-Mendoza, A. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Plant Science**, p. 1-18, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.00102

Oliveira, A.; Junior Chagas, A.; dos Santos, G. Miller, L.; Chagas, L. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde**, p. 149-155, 2012.

Oljira, A.M. Hussain, T. Waghmode, T.R. Zhao, H. Sun, H. Liu, X. Wang, X. Liu, B. *Trichoderma* Enhances Net Photosynthesis, Water Use Efficiency, and Growth of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Salt Stress. **Microorganisms**, v. 8, p. 1565, 2020. Doi:10.3390/microorganisms8101565

Ortega-Garcia, J.; Montes-Belmont, R.; Rodríguez-Monroy, M.; Ramírez-Trujillo, J.; Suárez-Rodríguez, R.; Sepúlve-da-Jiménez, G. Effect of *Trichoderma asperellum* applications and mineral fertilization on growth promotion and the content of phenolic compounds and flavonoids in onions. *Scientia Horticulturae*, 2015; pp. 8-16.

Pereira, D.; Da Costa, Y.; De carvalho, L. O element P: formas e dinâmica em solos tropicais. **Revista Agronomia Brasileira**, p. 1-4, 2021. Doi: 10.29372/rab202124

Prasad, A.; Dixit, M.; Meena, S.; Suman.; Kumar, A. Qualitative and quantitative estimation for phosphate solubilizing ability of *Trichoderma* isolates: A natural soil

Health. **Materials Today: Proceedings**, v. 81, p. 360–366, 2023. Doi: 10.1016/j.matpr.2021.03.305

Promwee, A. Issarakraisila, M. Intana, W. Chamswarnng, C. Yenjit, P. Phosphate Solubilization and Growth Promotion of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) by *Trichoderma* Strains. **Journal of Agricultural Science**; v. 6, ed. 9, 2014

Ribas, P.; Rech, R.; Dos Santos, Matsumura, A.; Van Der Sand, S. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Biosciences**, p. 70-75, 2016.

Rodrigues, C.; David, G.; Dos Reis, A.R. Photograph registratrion of petri dishes in high quality and image editing of microbiological assays. **International Microbiology**, p. 561-570, 2022. Doi: 10.1007/s10123-022-00242-z

Santos, J.M.R, Taniguchi, C.A.K. Silva, C.F.B. Natale, W. Artur, A. G. *Trichoderma* in the promotion of growth and nutrition of dwarf cashew rootstock. **Revista Ciência Agronômica**, v. 52, n. 4, p. 76-97, 2021.

Tyskiewicz, R. Nowak, A. Ozimek, E. Jaroszkucise J. *Trichoderma*: the current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth. **International Journal Molecular Science**, v. 23, p. 23-29, 2022.

Woo, S.L. Hermosa, R. Lorito, M. Monte, E. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. **Nature Review Microbiology**, v. 21, p. 312-326, 2023. Doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5

CAPÍTULO 3 - Efeitos de *Trichoderma* spp. nativos com alta produção de AIA e solubilização de P no crescimento inicial e metabolismo bioquímico de plantas de milho sob estresse nutricional

RESUMO - Espécies de *Trichoderma* spp. são capazes de promover o crescimento das plantas e ajudar na tolerância contra estresses abióticos do solo e do clima. No entanto, os efeitos de promoção do crescimento podem ser dependentes da interação com o hospedeiro e principalmente da capacidade de produção de AIA pelo isolado, visto que altos níveis de AIA podem provocar efeitos negativos, dependendo das condições do ambiente. Quatro isolados de *Trichoderma* spp. com alta capacidade de produção de AIA e solubilização de P foram utilizados. O objetivo foi verificar os efeitos na promoção ou regulação do crescimento inicial e os efeitos no metabolismo hormonal e antioxidante de plantas de milho var. Airan por isolados nativos de *Trichoderma* spp., sob condição de deficiência de nutrientes no solo. Efeitos positivos foram verificados no comprimento das raiz e razão parte aérea/raiz das plantas. Os isolados nativos de *Trichoderma* modularam os níveis de AIA, GA₃, flavonoides totais, açúcares totais e enzimas antioxidantes CAT e APX nas condições de estresse nutricional das plantas de milho.

Palavras-chaves: ácido indolacético, giberelina, flavonoides, *Hypocrea*, *Zea mays*

3.1 Introdução

A utilização de microrganismos benéficos na agricultura com capacidade de promover o crescimento das plantas, tem recebido notável atenção nas últimas décadas. Fungos do Gênero *Trichoderma* spp. tem demonstrado ter a capacidade bioestimulante, promovendo o crescimento das plantas, melhorando o rendimento e qualidade dos alimentos, além de mitigar os efeitos prejudiciais dos estresses abióticos (Rouphael e Colla, 2020; Alizadeh et al., 2024; Woo et al., 2023).

Espécies de *Trichoderma* tem demonstrado a capacidade de solubilização de fósforo e produção de fitohormônios, em especial as auxinas, promovendo o crescimento das plantas relacionado a modificação da arquitetura da raiz, crescimento e aumento dos pelos radiculares, resultando no aumento da

biomassa radicular e conseqüentemente, maior absorção de nutrientes e água pelas plantas (Abdenaceur et al., 2022; Sood et al., 2020; Bader et al., 2020; Guzmán-Guzmán et al., 2019; López-Bucio et al., 2015).

No entanto, diferenças são observadas em experimentos de promoção de crescimento com *Trichoderma* produtores de AIA, com efeitos negativos, neutros e positivos no crescimento das plantas, sugerindo que os mecanismos envolvidos são multivariáveis e dependentes das condições ambientais (Nieto-Jacobo et al., 2017; Contreras-Cornejo et al., 2009).

O acúmulo de AIA no tecido específico induz também acúmulo de flavonoides (Peer e Murph. 2007; Brow et al., 2001), os quais têm a capacidade de modular a cascata de sinalização de espécies reativas de oxigênio (EROs) e afetar diretamente o catabolismo, transporte e sinalização da auxina nas plantas (Brunetti et al., 2018), causando efeitos negativos e/ou positivos no crescimento e desenvolvimento das plantas, dependendo das condições do ambiente (Chapman e Muday, 2020; Brunetti et al., 2018; Peer et al., 2013; Brow et al., 2001). Além do AIA, o fitohormônio giberelina (GA₃) também desempenha um importante papel regulador neste processo, pois o GA₃ suprime o acúmulo de flavonoides na ponta da raiz (Tan et al., 2019) e essa inibição modula o estado de estresse oxidativo e o desenvolvimento das raízes laterais e pêlos radiculares, impactando todo sistema radicular das plantas (Hetherington et al., 2021; Achard et al., 2008). No entanto, a sinalização de GAs durante as interações *Trichoderma*-planta é pouco conhecida (Contreras-Cornejo et al., 2024).

Contudo, é incipiente a investigação da interação planta/*Trichoderma* com alta capacidade de produção de AIA e os efeitos no balanço de AIA, GA₃, flavonoides, EROs e enzimas antioxidantes do hospedeiro.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a interação de isolados nativos de *Trichoderma* spp. com alta produção de AIA no crescimento inicial e efeitos no metabolismo bioquímico hormonal e antioxidante em plantas de milho var. Airan em condições de estresse nutricional.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Os isolados nativos de *Trichoderma* spp. foram selecionados previamente com base nos resultados da capacidade de solubilização de P e produção de AIA *in vitro* (Tabela 1).

Tabela 1. Capacidade de solubilização de P e produção de AIA de isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Isolados de <i>Trichoderma</i> spp.	Solubilização de P ($\mu\text{g PO}_4^{3-} \text{ mL}^{-1}$)	Produção de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
3-EL2	1,25	518,5
7-PI3	4,4	623,5
15-PM6.3	11,6	32,8
19-PO7	8,7	580

3.2.2 Ensaio de crescimento inicial de plantas de milho var. Airan

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando vasos de polietileno de três litros e solo composto por uma mistura de 1:1:1 (Substrato HA [Casca de Pinus, Vermiculita, PG Mix 14.16.18, Nitrato de Potássio, Superfosfato Simples e Turfa], areia média e solo argiloso distrófico).

O solo argiloso foi coletado na profundidade de 20 a 40 cm em área agrícola (Tabela 2-Análise do solo) e posteriormente foi peneirado para compor a mistura de solo utilizada.

Tabela 2. Análise química do solo.

Solo	pH (CaCl ₂)	M.O (g.dm ⁻³)	P-resina (mg.dm ⁻³)	K-sresina	Ca-resina	Mg -resina (mmolc/dm ³)	H +Al	SB	CTC	V %
	5,3	5	3	0,3	9	3	18	12,5	32,5	38
Argila	Silte	Areia	-----							
607	253	140								

Na montagem do experimento foram realizados sulco de três centímetros de profundidade em cada vaso, com intuito de simular a aplicação dos tratamentos via sulco de plantio, em um volume de calda de 50 L/ha.

A solução e concentração de esporos dos isolados nativos de *Trichoderma* spp. foram obtidas por meio do crescimento em placas de Petri,

contendo meio BDA após 10 dias de incubação em câmara BOD, a 28 °C e fotoperíodo 12 h/12 h. A calibração da concentração dos esporos de cada isolado, foram realizadas em câmara de Neubauer, ajustando as concentrações para $1. 10^8$ esporos/ml⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição dos tratamentos.

Tratamento	Descrição	[] esporos /ml	Aplicação	Volume p/ vaso-sulco (ml)
T1	Controle	-	-	0
T2	3 (EL2)	$1. 10^8$	Sulco	0.435
T3	7 (PI3)	$1. 10^8$	Sulco	0.435
T4	15 (PM 6.3)	$1. 10^8$	Sulco	0.435
T5	19 (PO7)	$1. 10^8$	Sulco	0.435

Os experimentos foram realizados em delineamento experimental em blocos casualizados (DBC), contendo cinco tratamentos e oito repetições. Cinco repetições foram usadas para avaliações de crescimento e três repetições utilizadas para análises bioquímicas.

A interação *Trichoderma*-milho foram conduzidas durante o período de 38 dias e as condições climáticas do ambiente (temperatura e umidade relativa do ar (média, máxima e mínima), foram registrados automaticamente na casa de vegetação (Gráfico 1).

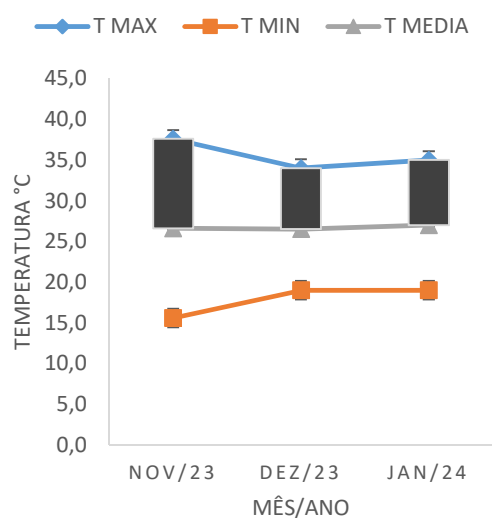


Gráfico 1. Condição climática na casa de vegetação (T°C e UR%).

3.2.3 Análises de crescimento

Foram avaliados o comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raízes (CPR), massa seca de parte aérea (MSA), massa de raízes (MSR) e razão parte aérea/raiz (A/R).

O CPA foi realizado com auxílio de régua milimetrada (cm), medindo a altura das plantas a partir do colo até o ápice da maior folha posicionada para cima. O CPR foi avaliado após a retirada das raízes do solo dos vasos, seguida de lavagem em água corrente.

A MSA e MSR foram realizadas utilizando balança analítica (g), após a secagem em estufa com circulação de ar, a temperatura de 64 °C, durante 3 dias. A razão A/R foi calculada a partir dos valores de MSA e MSR.

3.2.4 Análises do metabolismo oxidante e antioxidante

3.2.4.1 Teores de H₂O₂ e MDA

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica (MDA - malondialdeído), 1 g de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e extraído em 10 mL solução TCA (ácido tricloroacético) 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min à 4 °C, e o sobrenadante utilizado para as análises.

Na quantificação de H₂O₂, 200 µL do sobrenadante foi adicionado 200 µL de solução de 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M iodeto de potássio. Essa solução foi incubada em gelo por 1 h. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 390 nm e ajustada com a curva padrão de calibração de H₂O₂ (Gráfico 2). A quantidade de H₂O₂ foi expressa em µmol g⁻¹ de massa fresca (Alexieva et al., 2001).

Para a quantificação de MDA, 200 µL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de 0,5% TBA (ácido tiobarbitúrico) em 20% TCA. Essa solução foi incubada a 95 °C por 30 min, e a reação foi interrompida com banho de gelo. As absorbâncias foram de 535 nm e 600 nm, o resultado foi expresso em nmol g⁻¹ de massa fresca (Heath; Packer, 1968).

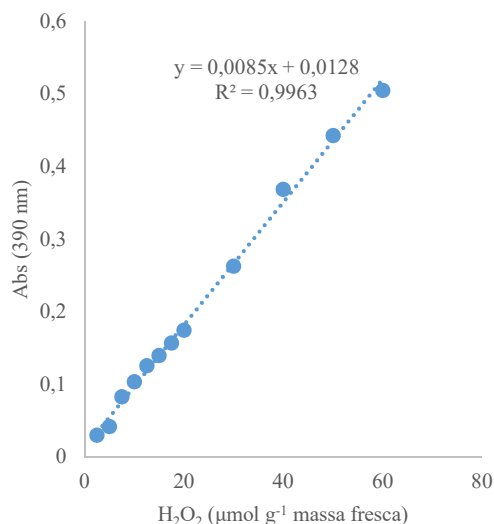


Gráfico 2. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3.2.4.2 Teores de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX)

A determinação do metabolismo antioxidante foi realizada analisando os componentes: atividade da superóxido dismutase (SOD, EC:1.15.1.1), catalase (CAT, EC:1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX, EC:1.11.1.11). Para a extração 1 g de material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e adicionado 8 mL de Tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min à 4 °C, e o sobrenadante utilizado para as análises.

A atividade de SOD foi determinada utilizando a metodologia adaptada de Giannopolitis e Ries (1977). O teste foi exposto à luz por 20 minutos em temperatura ambiente, e as amostras foram lidas em espectrofotômetro com 560 nm. A atividade da CAT foi determinada pela degradação do H₂O₂, sob a referência da leitura em espectrofotômetro 240 nm (absorbância) (Azevedo et al., 1998). A atividade APX foi avaliada pelo teste da avaliação temporal da atividade da enzima, com leitura em espectrômetro a 290 nm (Moldes et al., 2008). Todas as enzimas antioxidantes foram calculadas com base na concentração de proteína.

3.2.4.3 Teores de proteínas totais

Para extração de proteínas, 1 g de folhas frescas foram moídas com nitrogênio líquido e logo após extraído em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5. Os teores de proteínas totais foram determinados de acordo com Bradford (1976), 10 µL de extrato foi adicionado em 1 mL do reagente Bradford, após 5 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595nm. Para a curva foi utilizado a albumina de soro bovina (Gráfico 3).

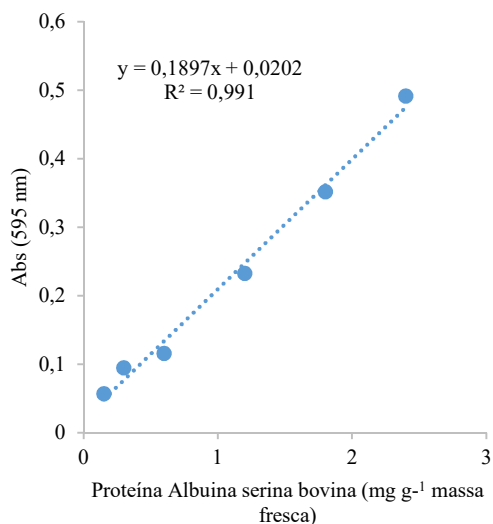


Gráfico 3. Curva de calibração da concentração de proteína albumina de soro bovina.

3.2.5 Análise de flavonoides totais, AIA, GA₃ e açúcares totais

As análises dos teores de flavonoides totais (FLAV), açúcares solúveis totais (AST) e concentração de AIA e GA₃ foram quantificadas nas folhas e raízes das plantas.

3.2.5.1 Açúcares solúveis totais

Para determinar os AST, 1 g de folhas frescas e raízes foram macerados e adicionados a tubos Falcon contendo 10 mL de solução MCA (60% v/v metanol, 25% v/v clorofórmio e 15 % v/v água). Após 48 h, 4 mL do sobrenadante foram coletados e transferidos para outro tubo Falcon e foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água deionizada. Para quantificação de AST foi

utilizado o método fenol-sulfúrico de acordo com a metodologia de Dubois et al (1956), utilizado a glicose como padrão (Gráfico 4).

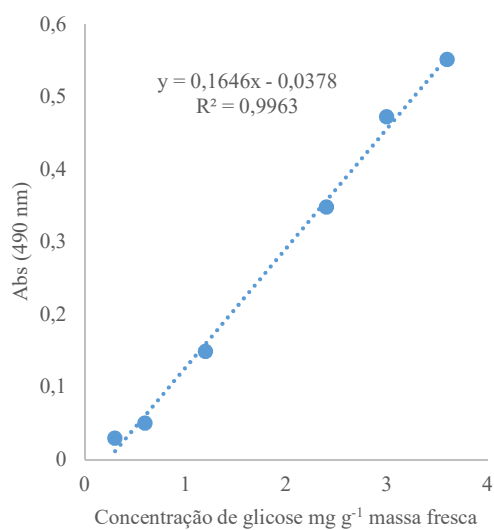


Gráfico 4. Curva padrão de calibração de açúcares totais (6 mg mL⁻¹ glicose).

3.2.5.2 Teores de flavonoides totais

Para extração dos flavonoides, 1 g de folhas frescas e 1,5 g de raízes foram extraído em etanol absoluto. As amostras foram incubadas em banho-maria a 60 °C por 2 h. Para a determinação de flavonoides totais utilizou-se NaNO₂ 5%, AlCl₃ 10%, e NaOH (1 M) de acordo com Yao et al (2013), utilizando-se rutina como padrão (Gráfico 5).

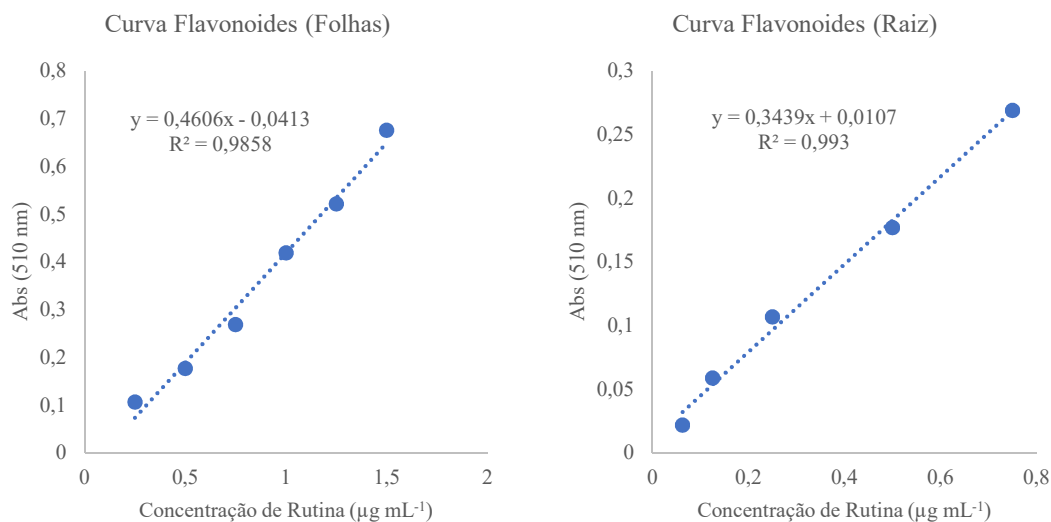


Gráfico 5. Curva padrão de calibração de flavonoides totais utilizando rutina (folha e raiz)

3.2.5.3 Quantificação de AIA e GA₃

Para quantificação de ácido indolacético (AIA) e ácido giberélico (GA₃), 1 g de folhas e 1,5 g de raízes foram extraídas usando tampão fosfato 0,06 M (pH 7,4). Os extratos vegetais foram homogeneizados e centrifugados a 10.000 × g por 30 min a 4 °C. A quantificação de AIA foi determinada utilizando a solução Salkowisk de acordo com Gordon e Weber (1971), utilizando AIA como padrão (Gráfico 6). A determinação de GA₃ foi realizada utilizando HCl (3,75 M) de acordo com Graham e Thomas (1961), utilizando GA₃ como padrão (Gráfico 5).

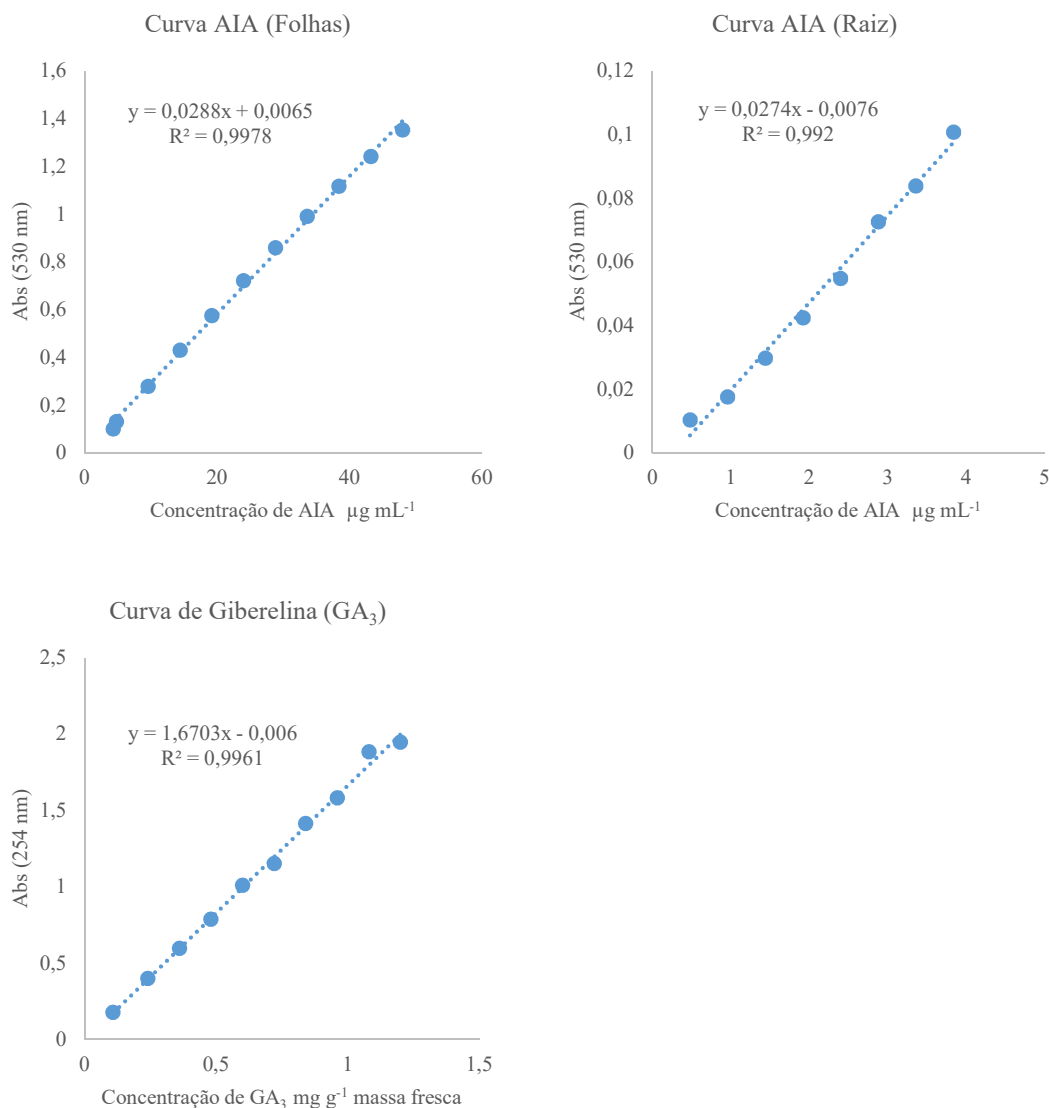


Gráfico 6. Curva padrão de calibração da concentração de AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$ (folha e raiz) – 0,012 g AIA em 250 mL de água ($48 \mu\text{g mL}^{-1}$) e GA_3 (mg g^{-1} MF) – 0,012 g GA_3 em 10 mL de etanol 98 ($1,2 \text{mg mL}^{-1}$).

3.2.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram processados utilizando software Minitab para verificação de outlier e teste de normalidade Anderson Darling. Os dados de crescimento para o parâmetro de massa seca de raiz (MSR) foram transformados utilizando \sqrt{x} . Foram realizadas as análises de variância das médias (ANOVA) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para todas as variáveis tanto de crescimento, quanto para as análises bioquímicas, utilizando o software Sisvar. Os valores médios de cada tratamento (controle e isolados) foram utilizados para

análise multivariada de componentes principais (ACP) utilizando software Minitab. Os coeficientes de correlação de Pearson foram determinados para as variáveis dos CP1 e CP2 em conjunto ($p < 0,05$), utilizando o software Sigma Plot.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Efeitos no crescimento inicial das plantas

O crescimento inicial do milho var. Airan em condição de estresse nutricional na interação com os quatro isolados nativos de *Trichoderma* spp., apresentaram efeitos neutros ou nulos no CPA, MSA e MSR, não havendo diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). No entanto, o comprimento da raiz (CPR) e razão parte aérea/raiz (A/R) apresentaram diferenças significativas (Tabela 4, Gráfico 7).

Tabela 4. Comprimento de parte aérea (CPA) e raízes (CPR), massa seca da parte aérea (MSA) e raízes (MSR) e razão parte aérea/raiz do milho var. Airan na interação com isolados nativos de *Trichoderma* spp.

Tratamento	CPA	CPR*	MSA	MSR	A/R*
-	(cm)		(g)		
Controle	78,6a	57,6c	6,2a	(6,3) 2,5a	1,0b
EL2	82,6a	64,2bc	6,6a	(5,7) 2,3a	1,2ab
PI3	79,0a	88,8ab	7,0a	(5,3) 2,2a	1,4a
PM6.3	85,5a	89,5a	7,2a	(6,4) 2,5a	1,1ab
PO7	80,7a	99,9a	5,9a	(4,4) 2,1a	1,3a
CV %	9,13	16,18	14,49	11,12	15,21
p < 0,05	0,579	0,000	0,212	0,101	0,032

*Letras diferentes na coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); CV%=coeficiente de variação; Valores não transformados em parantêses.

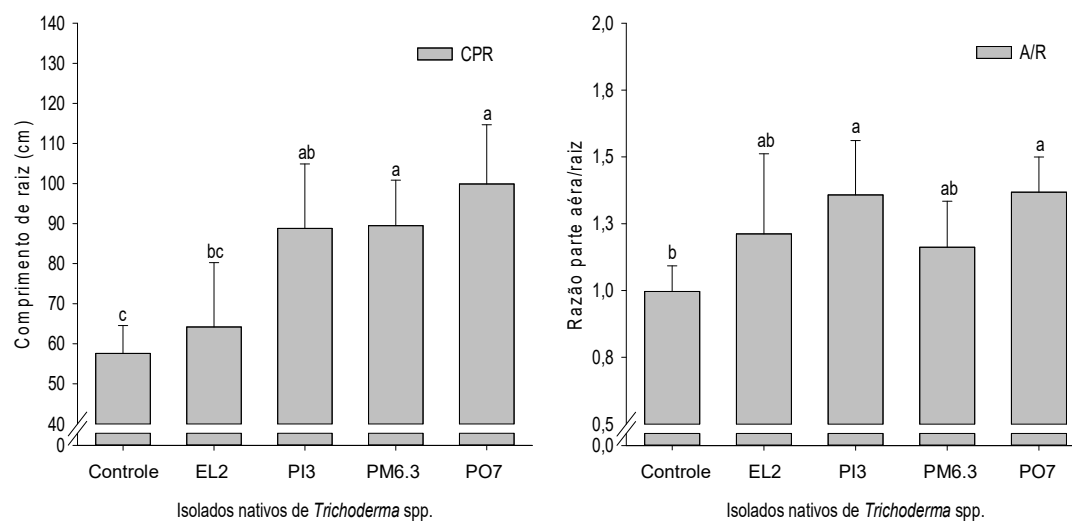


Gráfico 7. Comprimento de raiz (CPR) e razão parte aérea/raiz (A/R) de plantas de milho var. Airan aos 38 dias após tratamento via sulco com isolados de *Trichoderma* spp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O CPR teve efeito positivo no crescimento das plantas em interação com os isolados PI3, PM6.3 e PO7, aumentando em 54%, 55% e 73%, respectivamente, em comparação ao tratamento controle (Gráfico 7). O isolado EL2 não apresentou diferença comparado ao controle e o isolados PI3, no entanto teve menor CPR em comparação aos isolados PM6.3 e PO7 (Gráfico 7).

A razão A/R foi significativamente maior com a interação dos isolados PI3 e PO7 em comparação ao controle e os isolados EL2 e PM6.3 não se diferenciaram do controle e dos isolados PI3 e PO7 (Gráfico 7).

Os isolados PI3 e PO7 se destacaram em promover o crescimento no CPR e o aumento na razão A/R sob condições de deficiência de nutrientes no solo.

3.3.2 Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e dano oxidativo (MDA)

O efeito nos teores de H_2O_2 e MDA apresentaram diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os isolados EL2, PO7 e PI3 aumentaram os níveis de H_2O_2 , em 118, 61 e 16%, respectivamente, em comparação ao controle e apresentaram diferenças

entre si. De maneira oposta, o isolado PM6.3 diminuiu em 23% em comparação ao tratamento controle (Gráfico 8).

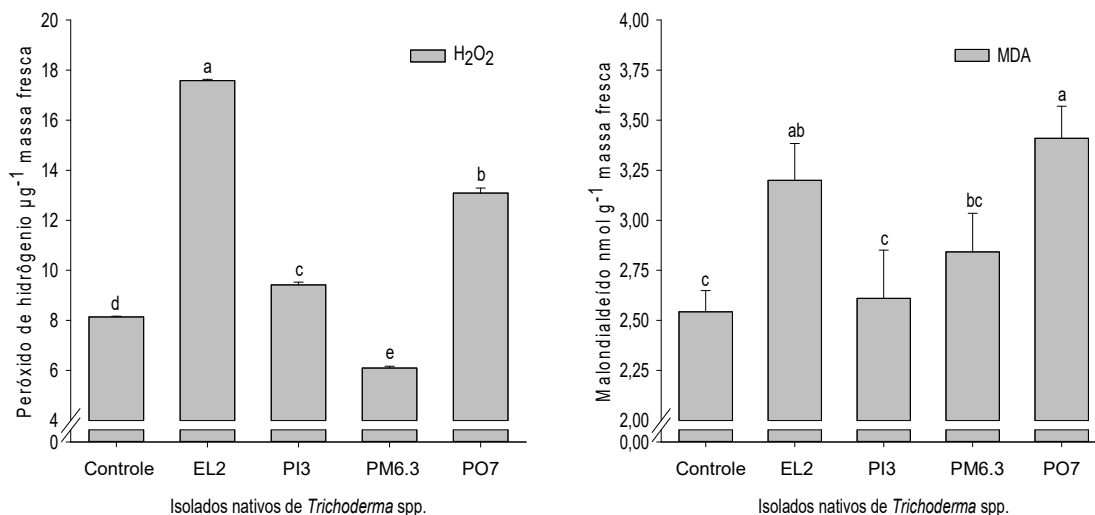


Gráfico 8. Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e MDA (peroxidação lipídica) em folhas do milho var. Airan aos 38 dias de interação com os isolados nativos de *Trichoderma* spp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (p<0,05).

A resposta do aumento de H₂O₂ pelos isolados EL2 e PO7 resultou no aumento dos níveis de MDA em 26 e 34%, respectivamente, em comparação ao tratamento controle (Gráfico 8), causando estresse oxidativo nas plantas. Já os isolados PI3 e PM6.3 não apresentaram aumento significativo de MDA em comparação ao tratamento controle (Gráfico 8). No entanto, o isolado PM6.3 não apresentou diferença quando comparado com o isolados EL2, o qual causou estresse oxidativo nas plantas de milho. Sendo assim, o isolado PI3 destacou significativamente dos outros isolados por não causar estresse oxidativo nas plantas.

3.3.3 Efeito no metabolismo antioxidante (SOD, CAT e APX) e proteínas totais

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX e o teor de PROT foram significativas pelo teste de Tukey (p<0,05).

A atividade da enzima SOD não apresentou diferenças na interação com os quatro isolados de *Trichoderma* spp. em comparação ao tratamento controle (Gráfico 9). No entanto, o isolado PI3 apresentou maior atividade da enzima SOD quando comparado ao isolado PM6.3 (Gráfico 9).

A atividade da enzima CAT foi reduzida em 56% na interação com o isolado PI3, em comparação ao tratamento controle e os isolados EL2, PM6.3 e PO7 não apresentaram diferença na alteração dos níveis em comparação ao controle (Gráfico 9). No entanto, o isolado PM6.3 diminuiu os níveis de CAT comparado ao isolado EL2.

A atividade da enzima APX foi aumentada pelos isolados PM6.3 e PI3 em 161 e 143%, respectivamente, comparado ao tratamento controle (Gráfico 9) e também apresentaram diferenças em comparação aos isolados EL2 e PO7. Os isolados EL2 e PO7 não apresentaram diferença significativas nos níveis de APX quando comparado com o controle (Gráfico 9).

O teor de proteínas totais nas folhas do milho Airan não apresentaram alterações com a interação dos quatro isolados em comparação ao tratamento controle (Gráfico 9). No entanto, o isolado PI3 diminuiu em 20% o teor de PROT comparado com o isolado PM6.3 (Gráfico 9).

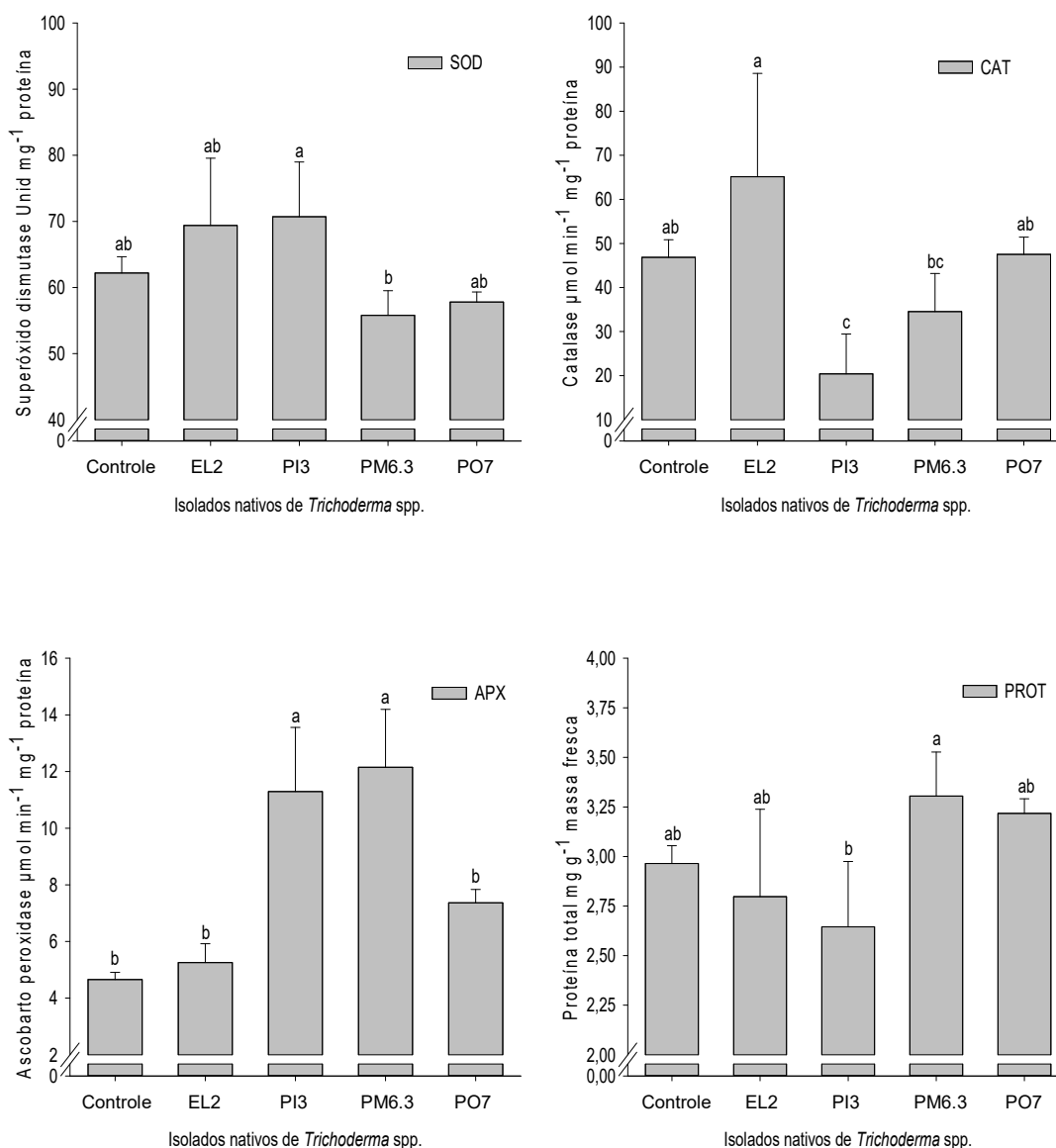


Gráfico 9. Concentração de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascobarto peroxidase (APX) e proteínas totais (PROT) em folhas de milho var. Airan em interação com isolados nativos de *Trichoderma* spp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3.4 Efeitos no metabolismo bioquímico de flavonoides totais, AIA, GA₃ e açúcares solúveis totais

A interação com os isolados nativos apresentou diferenças significativas no teor FLAV, AIA e GA₃ nas folhas e raízes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O isolado EL2 aumentou em 11,5% o teor de FLAV nas folhas em comparação ao tratamento controle. De maneira oposta, os isolados PI3, PO7 e

PM6.3 diminuíram em 19, 26 e 38% a concentração de FLAV nas folhas em comparação ao controle, apresentando também diferenças significativas entre si (Gráfico 10).

Nas raízes os teores de FLAV aumentou com o isolado EL2 e PM6.3 em 51 e 21% respectivamente, em comparação tratamento controle, apresentando também diferenças entre si e os isolados PI3 e PO7 (Gráfico 10). Os isolados PI3 e PO7 não apresentaram diferença em comparação ao tratamento controle, mas PI3 aumentou significativamente o teor de FLAV em comparação com o isolado PO7 (Gráfico 10).

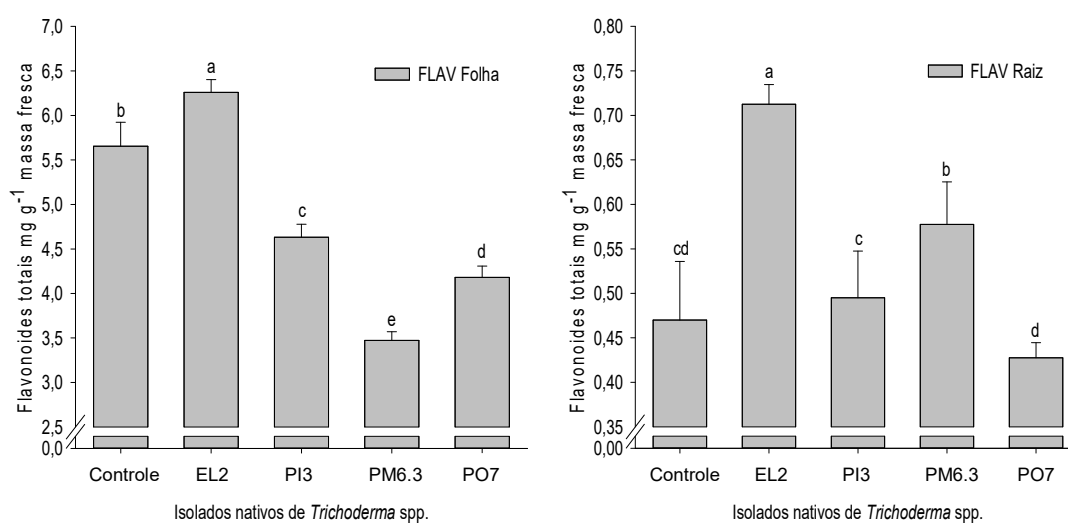


Gráfico 10. Concentração de flavonoides totais em folhas e raízes de milho var. Airan em interação com os isolados nativos de *Trichoderma* spp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A concentração de AIA nas folhas aumentou em 71, 54, 41 e 20% na interação com os isolados PM6.3, PO7, PI3 e EL2, respectivamente, comparado ao tratamento controle, apresentando também diferenças entre si (Gráfico 11).

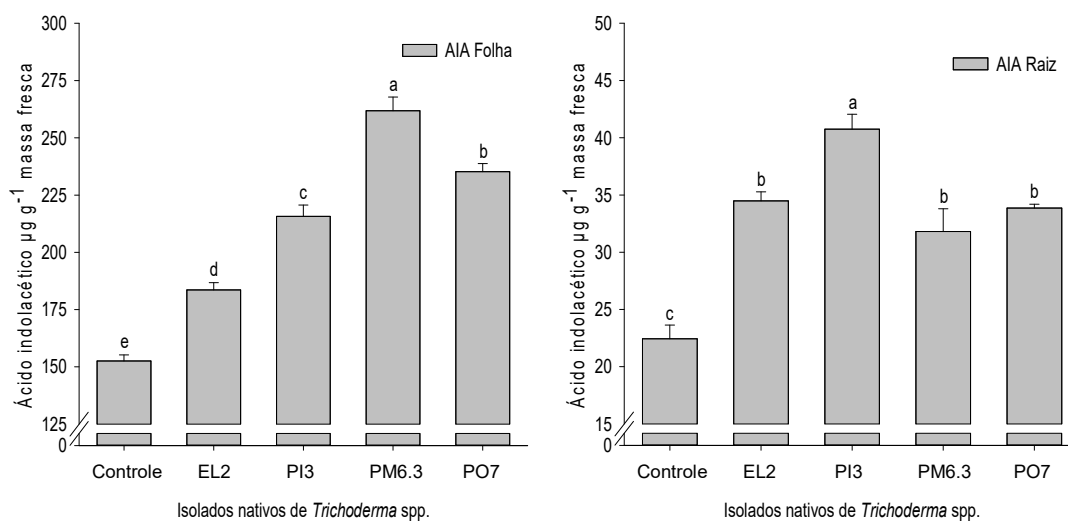


Gráfico 11. Concentração de ácido indolacético (AIA) em folhas e raízes de milho var. Airan em interação com os isolados nativos de *Trichoderma* spp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nas raízes o isolado PI3 aumentou o conteúdo de AIA em 86% em comparação ao tratamento controle e também apresentou diferença entre todos os isolados (Gráfico 7). Os isolados EL2, PO7 e PM6.3 aumentaram em 59, 55 e 46% os níveis de AIA nas raízes em comparação ao controle, porém não houve diferenças entre si (Gráfico 11).

Os níveis de GA₃ na folha aumentou com a interação do isolado PO7 em 24%, comparado ao controle (Gráfico 12). De maneira oposta os isolados EL2, PM6.3 e PI3 reduziram em 3, 12 e 30%, respectivamente, a concentração de GA₃ nas folhas em comparação ao tratamento controle (Gráfico 12).

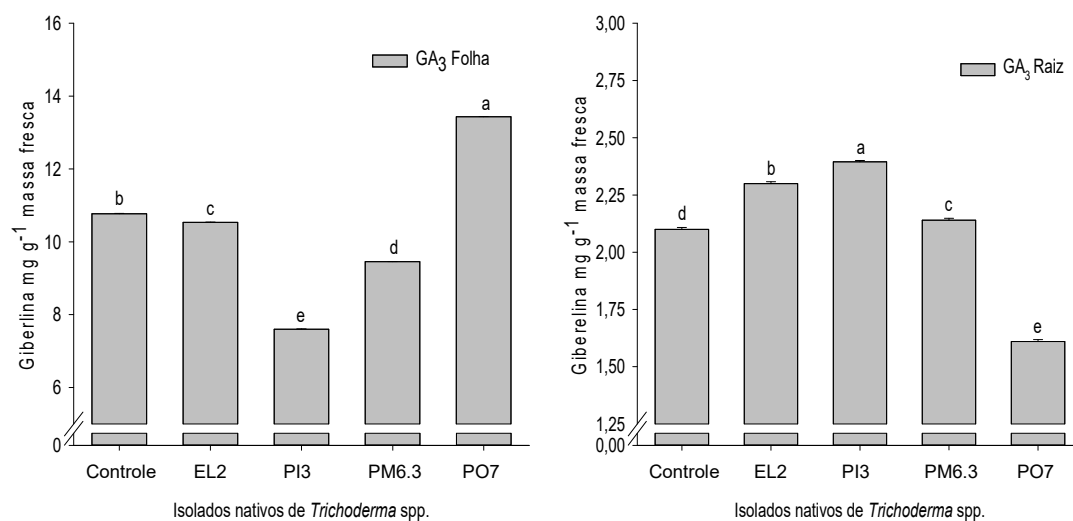


Gráfico 12. Concentração de giberelina (GA₃) em folhas e raízes de milho var. Airina em interação com os isolados nativos de *Trichoderma* spp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nas raízes as alterações na concentração de GA₃ foram inversas aos das folhas. O isolado PO7 reduziu os níveis de GA₃ em 23% em comparação ao controle e os isolados PM6.3, EL2 e PI3 aumentaram em 2, 10 e 14%, respectivamente, a concentração de GA₃ nas raízes comparado ao tratamento controle (Gráfico 12).

A concentração de AST nas folhas não foram alteradas pela interação com os isolados nativos em comparação ao tratamento controle (Gráfico 13). No entanto, houve aumento de 18% pelo isolado EL2 em comparação ao PI3 (Gráfico 13).

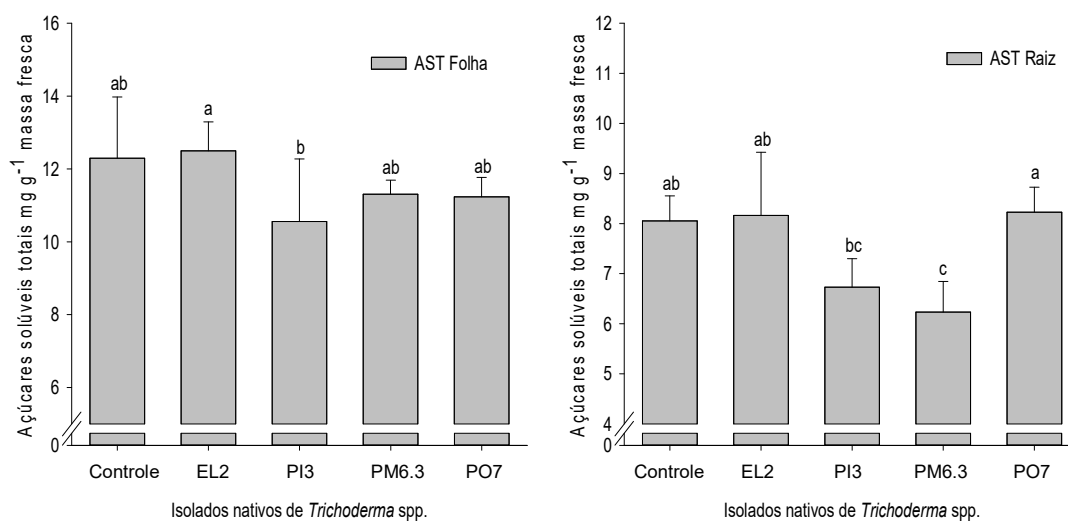


Gráfico 13. Concentração de açúcares totais em folhas e raízes de milho var. Airan em interação com os isolados nativos de *Trichoderma* spp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Nas raízes o teor de AST diminuiu em 23% com a interação com o isolado PM6.3 em comparação ao tratamento controle (Gráfico 13).

Os isolados EL2 e PO7 não apresentaram alterações significativas no teor de AST nas raízes comparado ao controle e também não teve diferenças entre si (Gráfico 13). O isolado PI3 apresentou menor teor de AST quando comparado ao isolado PO7, mas não apresentou diferenças em comparação ao tratamento controle e os isolados EL2 e PM6.3 (Gráfico 13).

3.3.5 Análise de componentes principais (ACP)

Os parâmetros de CPR e razão A/R foram analisados em conjunto com todos os parâmetros bioquímicos.

De acordo com a ACP, os primeiros quatro componentes explicados foram superiores ao autovalor 1, considerando o critério ou teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), indica a proporção da variância dos dados que pode ser considerada comum a todas as variáveis. Esses quatro componentes explicaram 100% da variância total (1,00), enquanto o CP1 representa aproximadamente 44,6% (0,446) e o CP2 25,1% (0,251) da variação, acumulando 69,6% (0,696) da variância total dos dados (Tabela 5).

Tabela 5. Pontuações dos PC para todas as características analisadas do milho var. Airan sob estresse nutricional.

Matrix de correlação da autoanálise																		
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16	CP17	CP18
Autovalores	8,022	4,512	3,931	1,535	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Proporção	0,446	0,251	0,218	0,085	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acumulado	0,446	0,696	0,915	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Variáveis	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12	CP13	CP14	CP15	CP16	CP17	CP18
Prod AIA	0,038	0,273	-0,391	-0,184	-0,417	0,312	0,043	-0,023	-0,009	0,228	-0,079	-0,469	-0,208	0,104	-0,048	0,354	0,058	-0,023
Solub P	0,326	-0,142	-0,007	0,195	-0,126	0,080	0,436	-0,366	0,117	0,364	0,040	0,434	-0,193	0,141	-0,307	0,034	-0,029	0,008
CPR	0,331	0,024	-0,168	-0,071	-0,161	-0,329	-0,491	-0,288	0,111	0,193	0,002	0,140	0,316	-0,147	0,136	0,150	-0,004	-0,408
A/R	0,198	0,218	-0,337	-0,124	0,061	0,044	-0,091	-0,137	-0,402	-0,127	0,116	-0,040	-0,098	0,014	-0,297	-0,664	0,056	-0,127
H₂O₂	-0,174	0,067	-0,430	0,085	0,524	-0,196	0,023	0,228	0,036	0,198	-0,073	0,065	-0,064	0,422	-0,054	0,146	-0,298	-0,248
MDA	0,038	-0,149	-0,467	0,144	-0,171	0,115	0,031	0,224	0,314	-0,575	0,073	0,308	-0,184	-0,171	0,004	0,091	0,132	-0,159
SOD	-0,179	0,399	-0,062	-0,069	0,061	0,295	0,125	0,182	0,226	0,248	0,450	0,228	0,478	-0,061	-0,002	-0,076	0,236	-0,006
CAT	-0,242	-0,213	-0,256	0,210	-0,114	0,261	-0,042	-0,395	-0,080	-0,215	-0,140	-0,035	0,554	0,223	-0,061	-0,003	-0,256	0,219
APX	0,299	0,173	0,136	0,219	0,217	-0,069	0,168	0,105	0,065	-0,213	-0,168	-0,309	0,309	-0,205	-0,578	0,237	0,064	-0,132
PROT	0,175	-0,396	0,003	0,172	0,072	0,287	-0,403	0,313	-0,164	0,216	-0,101	0,043	0,053	0,265	-0,134	0,029	0,503	0,069
AT-FOLHA	-0,305	-0,204	-0,021	0,208	-0,189	-0,204	-0,245	0,026	0,478	0,220	0,225	-0,300	-0,130	-0,078	-0,378	-0,296	-0,099	0,057
AT-RAIZ	-0,353	0,000	-0,001	-0,033	-0,216	-0,186	-0,130	0,105	-0,532	0,025	0,229	0,300	-0,046	-0,196	-0,394	0,367	-0,086	0,048
FLAV-FOLHA	-0,342	0,086	-0,076	-0,057	-0,206	-0,147	0,173	0,108	0,031	0,179	-0,720	0,193	0,110	-0,153	-0,064	-0,236	0,247	-0,128
FLAV-RAIZ	-0,148	0,088	-0,117	0,692	0,161	0,090	0,042	-0,189	-0,234	0,172	0,055	-0,145	-0,139	-0,383	0,299	0,014	0,150	-0,139
AIA-FOLHA	0,325	-0,016	-0,082	0,285	-0,400	-0,195	0,189	0,527	-0,181	0,122	0,051	-0,048	0,226	0,040	0,194	-0,176	-0,327	0,119
AIA-RAIZ	0,157	0,357	-0,231	0,102	0,136	-0,241	-0,226	-0,058	0,124	0,012	-0,140	0,150	-0,084	-0,073	-0,006	0,068	0,098	0,754
GA-FOLHA	-0,027	-0,364	-0,292	-0,199	0,075	-0,453	0,393	-0,107	-0,094	0,016	0,227	-0,240	0,168	-0,001	0,089	0,058	0,436	0,129
GA-RAIZ	-0,117	0,349	0,222	0,308	-0,271	-0,290	-0,014	-0,110	-0,004	-0,259	0,096	0,005	-0,040	0,593	0,027	0,018	0,317	-0,139

Considerando o impacto das características testadas nos principais componentes, o efeito com maiores cargas positiva no CP1 ($>0,299$) foi observado para a capacidade de solubilização de P pelos isolados nativos, CPR, atividade da enzima APX e concentração de AIA na folha e os efeitos com maiores cargas negativa ($> -0,242$) para atividade da enzima CAT, teores de AST na folha e raiz e FLAV na raiz (Tabela 5, Gráfico 14).

No CP2, o efeito com maior carga positiva ($>0,218$) foi observado para a capacidade de produção de AIA pelos isolados nativos, razão A/R, atividade da enzima SOD e concentração de AIA na raiz (Tabela 5, Gráfico 14). Maior carga negativa ($> -0,204$) no CP2 foi observado para atividade da enzima CAT, teor de PROT, teor de AST na folha e concentração de GA3 na folha e raiz (Tabela 5, Gráfico 14). Como essas características afetaram principalmente os dois primeiros componentes, essas também afetaram a distribuição dos isolados (Gráfico 15).

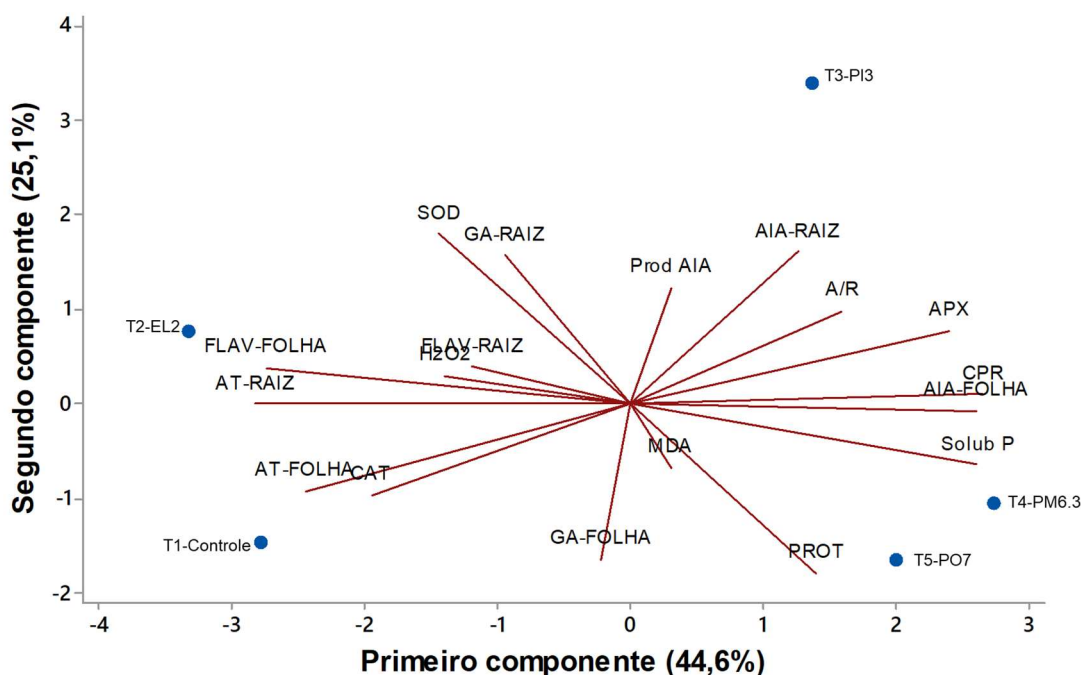


Gráfico 14. Estrutura e carga dos autovetores para todas as características analisadas do milho var. Airan sob estresse nutricional.

Os isolados PM6.3 e PO7 formaram um grupo que compartilham positivamente das mesmas propriedades com maiores efeitos positivos no CP1 e maiores efeitos negativos no CP2 (Gráfico 15). O isolado PI3 foi posicionado isoladamente, apresentando efeitos positivos no CP1 quanto no CP2 (Gráfico 15). O isolado EI2 foi posicionado isoladamente com maior efeito negativo no CP1 e menor efeito positivo no CP2 (Gráfico 15). O tratamento controle posicionou isoladamente apresentando maiores efeitos negativos tanto para o CP1 quanto para o CP2 (Gráfico 15), justificando os menores valores de CPR e razão A/R observados (Gráfico 7).

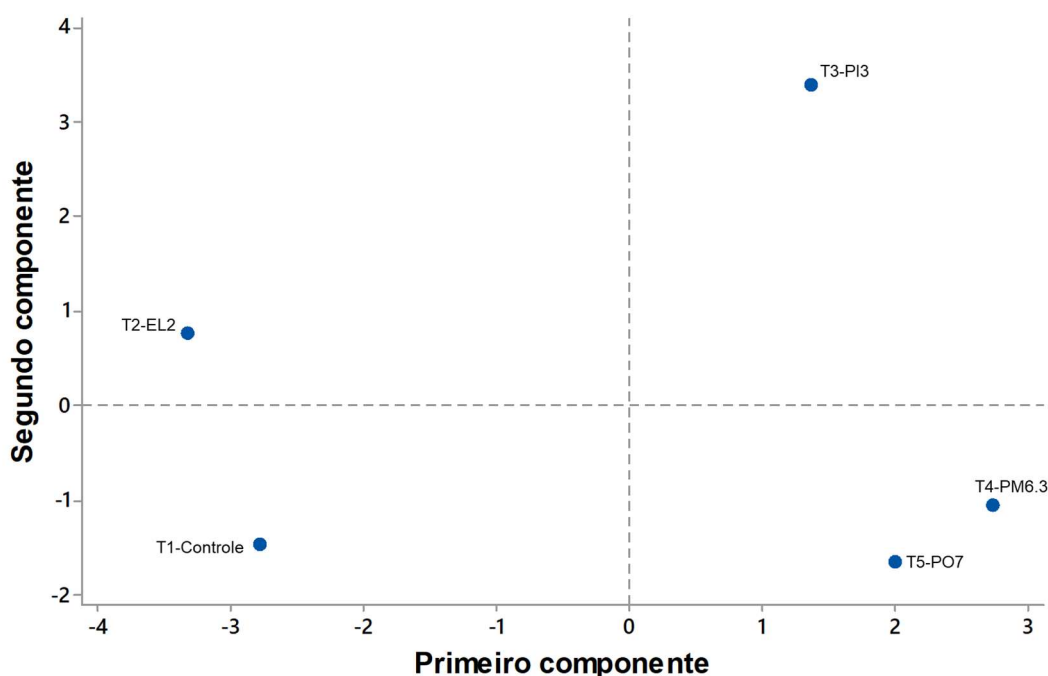


Gráfico 15. Agrupamento dos isolados nativos de *Trichoderma* spp. e efeitos positivos e negativos no CP1 e CP2.

A correlação de Pearson entre as variáveis dos CP1 e CP2 apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para 38 interações, sendo dividida em três grupos: maiores coeficientes de correlação acima de 70% ($> 0,7$), média correlação entre 50 e 69% (0,5 a 0,69) e menor correlação abaixo de 50% ($< 0,5$) (Tabela 6).

Considerando os principais efeitos no CPR, houve correlação positiva significativa para a razão A/R, capacidade de solubilização de P pelos isolados nativos, atividade da enzima APX e concentração de AIA na folha, indicando que essas variáveis tendem a aumentar em conjunto (Tabela 6). No entanto, o CPR com o teor de FLAV e AST na folha apresentaram correlação negativa, indicando que uma variável tende a diminuir enquanto a outra aumenta (Tabela 6). Essas variáveis explicam a influência no aumento do CPR pelos isolados PI3, PM6.3 e PO7 em comparação ao tratamento controle, tendo em vista que os três isolados possuem maior habilidade em solubilizar o P (Tabela 1, Gráfico 7).

Os principais efeitos na razão A/R foram observados pela correlação positiva com a capacidade de produção de AIA pelos isolados nativos e concentração de AIA na raiz, indicando que esses pares tendem a aumentar em conjunto, mostrando que a modulação dos níveis de AIA na raiz pelos isolados PI3 e PO7 influenciaram significativamente para o aumento da razão A/R em comparação ao tratamento controle (Tabela 6 e Gráfico 7).

Tabela 6. Correlações de Pearson entre os componentes principais 1 e 2 no crescimento do milho var. Airan sob estresse nutricional.

	A/R	P. AIA	S. P	H ₂ O ₂	MDA	SOD	CAT	APX	PROT	FLAV F	FLAV R	AIA F	AIA R	GA F	GA R	AT F	AT R
CPR	0,645*	0,399	0,737*	-0,150	0,120	-0,154	-0,368	0,714*	0,175	-0,709*	-0,214	0,797*	0,635*	-0,115	-0,172	-0,524*	-0,431
A/R	-	0,775*	0,143	0,405	0,276	0,167	-0,049	0,171	-0,117	-0,125	-0,086	0,303	0,711*	0,028	-0,088	-0,280	0,001
P. AIA	-	-	-0,112	0,663*	0,451*	0,412	0,015	0,033	-0,355	0,130	0,017	0,122	0,802*	0,048	-0,029	-0,226	0,171
S. P	-	-	-	-0,442	0,160	-0,514*	-0,305	0,703*	0,504	-0,918*	-0,310	0,897*	0,205	0,106	-0,426	-0,460*	-0,513*
H ₂ O ₂	-	-	-	-	0,642*	0,344	0,597*	-0,527*	-0,246	0,616*	0,449*	-0,281	0,288	0,394	-0,066	0,249	0,549*
MDA	-	-	-	-	-	-0,147	0,420	-0,280	0,247	-0,045	0,207	0,313	0,237	0,659**	-0,556*	0,124	0,389
SOD	-	-	-	-	-	-	0,252	-0,016	-0,986*	0,505*	0,207	-0,399	0,347	-0,390	0,528*	-0,050	0,164
CAT	-	-	-	-	-	-	-	-0,553*	-0,222	0,548*	0,306	-0,384	-0,294	0,517*	-0,191	0,253	0,370
APX	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,008	-0,734*	-0,150	0,736*	0,504*	-0,530*	0,198	-0,598*	-0,739*
PROT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,484*	-0,095	0,433	-0,294	0,407	-0,513*	0,085	-0,115
FLAV F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,404	-0,887*	-0,233	0,039	0,356	0,432	0,519*
FLAV R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,065	0,154	-0,245	0,532*	0,413	0,041
AIA F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,494*	-0,037	-0,266	-0,362	-0,479*
AIA R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,380	0,261	-0,335	-0,276
GA F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,899*	0,207	0,583*
GA R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,023	-0,353
AT F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,563*
AT R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Valores de coeficiente de correlação em verde (>0,7); azul (entre 0,5 e 0,7) e vermelho (<0,5). Valores com asterisco* são significativos estatisticamente (p<0,05);

De acordo com os resultados do CP1 e CP2 observamos que uma maior capacidade de solubilização de fósforo pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp. influenciaram no comprimento da raiz e os isolados com alto potencial de produção de AIA na razão A/R, sendo que as combinações das duas habilidades e a modulação da atividade da enzima APX, teor de FLAV e AST na folha e AIA na folha e raiz proporcionaram a promoção e regulação do crescimento inicial das plantas de milho var. Airan sob estresse nutricional (Figura 1).



Figura 1. Modulação das variáveis bioquímicas dos componentes principais (PC1 e PC2) no comprimento da raiz (CPR) e razão parte aérea/raiz (A/R) pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp. em interação com milho var. Airan sob estresse nutricional. Setas de cor vermelha=valor menor significativo; amarelo=valor médio não significativo entre tratamento; azul e verde=valor maior significativo.

Os efeitos dos níveis de H_2O_2 e MDA no estresse oxidativo das plantas de milho e apresentaram correlação de Pearson significativa ($p < 0,05$) e coeficiente de correlação média entre 50 e 60%, para a atividade da enzima CAT, APX, teor de FLAV na folha e AST na raiz e concentração de GA_3 na folha e raiz (Tabela 6).

Correlação positiva com efeitos significativos foi observada nos níveis de H_2O_2 com a concentração de MDA, atividade da CAT, FLAV na folha e AST na raiz, que tendem a aumentar em conjunto (Tabela 6, Gráfico 16). A enzima APX apresentou correlação negativa com H_2O_2 , sendo que o aumento da atividade da APX tende a diminuir os níveis de H_2O_2 (Tabela 6, Gráfico 16).

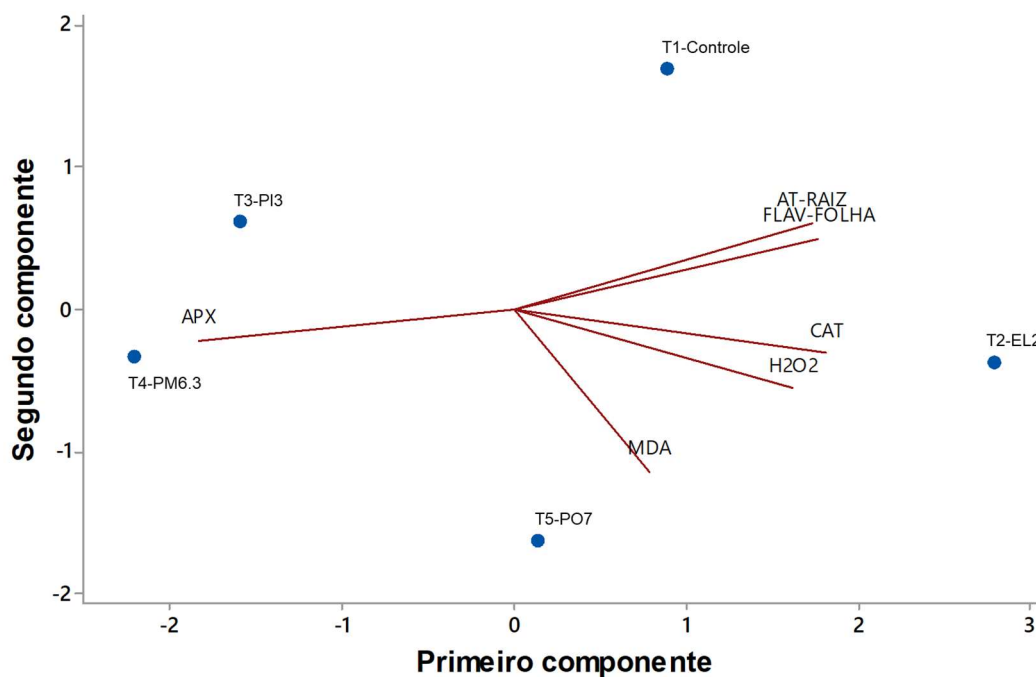


Gráfico 16. Estrutura e carga dos autovetores para as características correlacionadas das variáveis H_2O_2 , MDA, CAT, APX, FLAV na folha e AST na raiz no milho var. Airan sob estresse nutricional.

Os isolados nativos de *Trichoderma* spp. formaram quatro grupos (Gráfico 17): o isolado EL2 e PO7 que compartilharam efeitos positivos e negativos nos níveis de H_2O_2 , tanto no CP1 quanto no CP2. O isolado PI3 foi posicionado isoladamente, apresentando efeitos negativos no CP1 e positivos no CP2. O isolado PM6.3 foi posicionado isoladamente, apresentando efeitos negativos no CP1 e CP2. O tratamento controle posicionou isoladamente apresentando

maiores efeitos positivos tanto para o CP1 quanto para o CP2, justificando o menor efeito nos níveis H_2O_2 e MDA.

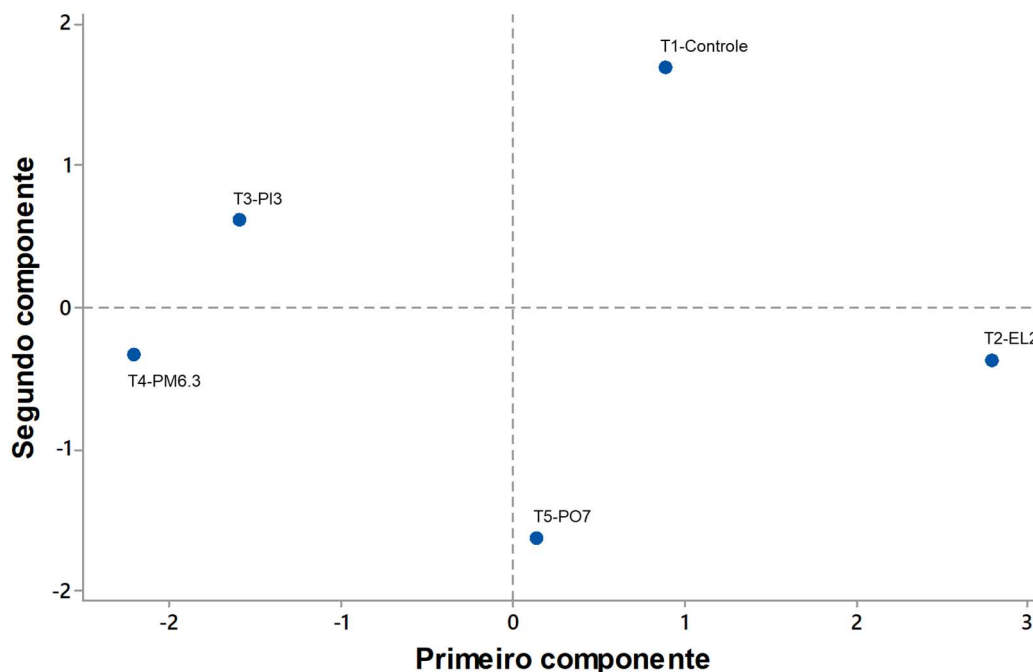


Gráfico 17. Agrupamento dos isolados nativos de *Trichoderma* spp. e efeitos positivos e negativos no CP1 e CP2 das variáveis H_2O_2 , MDA, CAT, APX, FLAV na folha e AST na raiz.

A concentração de MDA apresentou correlação positiva na análise dos fatores H_2O_2 e GA_3 na folha, quem tendem a aumentar em conjunto, e correlação negativa com GA_3 na raiz, no qual o aumento de GA_3 na raiz tende a diminuir os níveis de MDA (Tabela 6, Gráfico 18).

Os isolados nativos formaram três grupos nessas propriedades (Gráfico 19): Os isolados PI3 e PM6.3 compartilharam efeitos negativos no fator 1 (MDA) e positivos no fator 2 (H_2O_2). O isolado EL2 foi posicionado isoladamente, apresentando efeito positivo no fator 1 e negativo no fator 2. O isolado PO7 foi posicionado isoladamente, apresentando maiores efeitos negativos tanto no fator 1 quanto no fator 2. O tratamento controle posicionou isoladamente apresentando efeito positivo no fator 1 quanto para o fator 2.

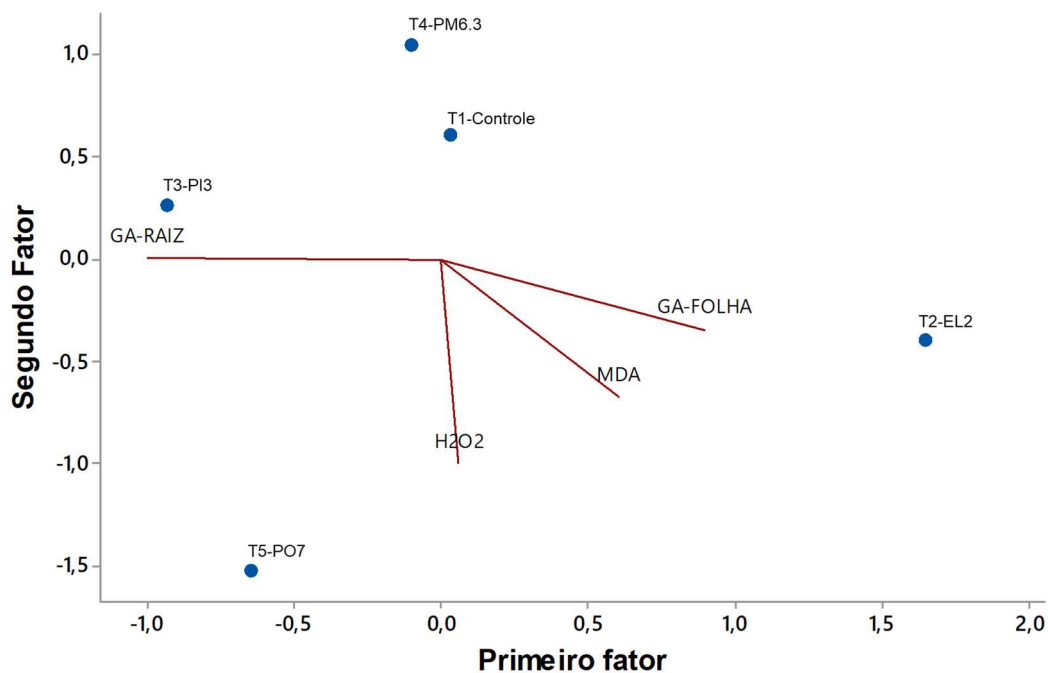


Gráfico 18. Estrutura e carga dos autovetores para as características correlacionadas a MDA, H₂O₂ e GA₃ na folha e raiz no milho var. Airan sob estresse nutricional.

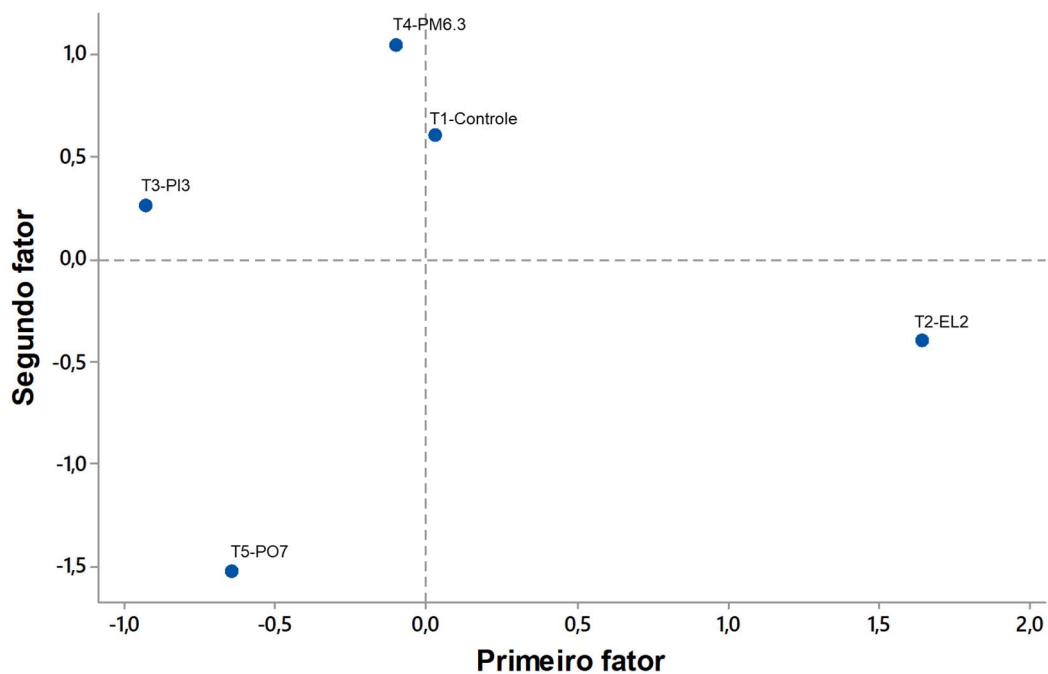


Gráfico 19. Agrupamento dos isolados nativos de *Trichoderma* spp. e efeitos positivos e negativos no CP1 e CP2 das variáveis MDA, H₂O₂, GA₃ na folha e raiz.

Considerando que o estresse oxidativo foi causado pelo alto aumento nos níveis de H_2O_2 e consequentemente aumento dos níveis de MDA, o isolado PI3 foi capaz de modular significativamente os níveis da atividade APX, CAT e GA_3 na folha do milho, em comparação aos isolados EL2, PM6.3 e PO7 (Gráfico 9 e 12; Figura 2).

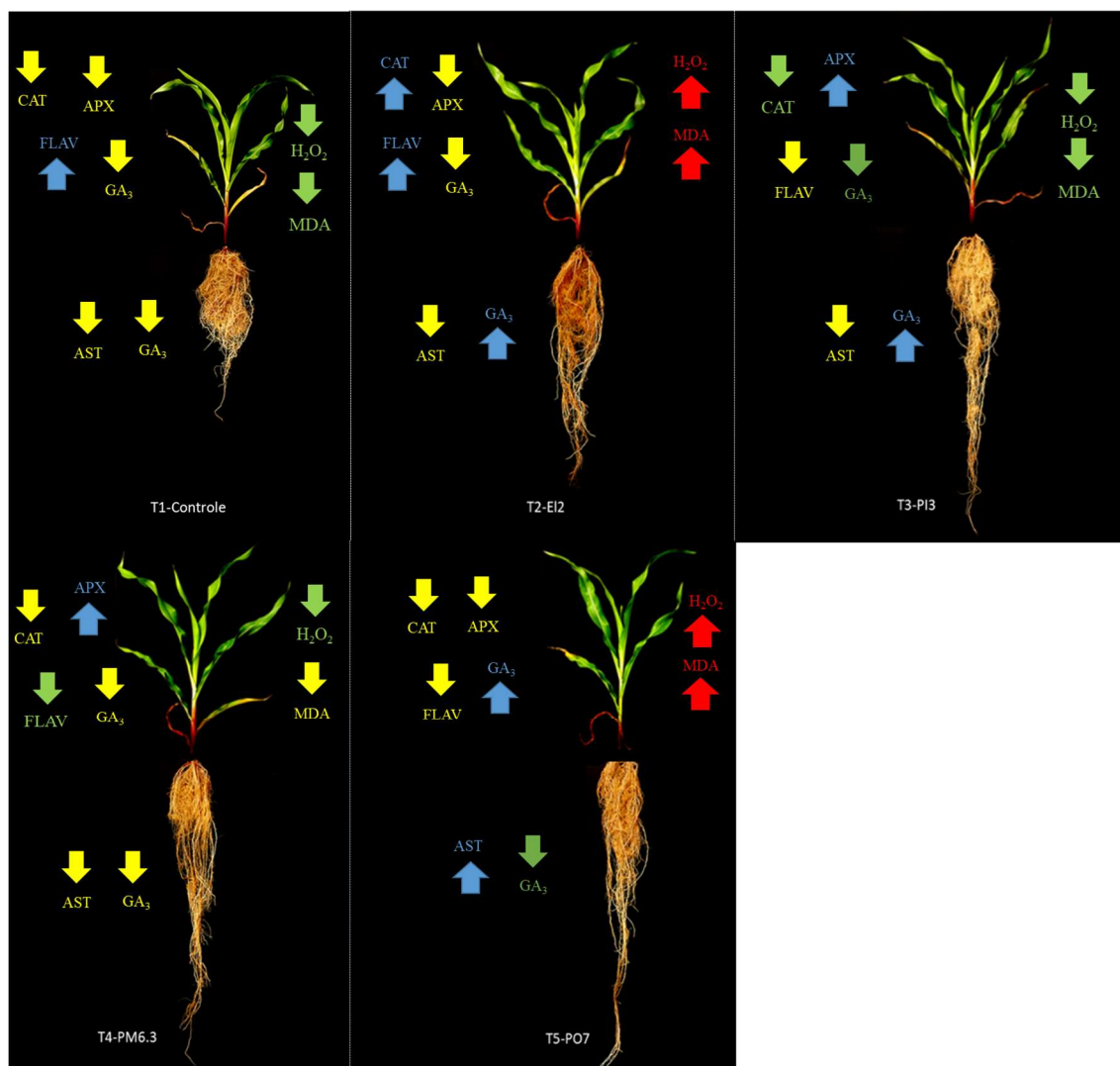


Gráfico 2. Modulação das variáveis bioquímicas dos componentes principais (PC1 e PC2) nos níveis de H_2O_2 e MDA pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp. em interação com milho var. Airan sob estresse nutricional. Setas de cor azul e vermelho=valor maior significativo; amarelo=valor médio não significativo entre tratamento; verde=valor menor significativo.

Se olharmos para os gráficos individuais das variáveis bioquímicas explicadas pelo CP1 e CP2, nota-se que ocorre grandes e pequenas diferenças significativas na modulação dos níveis bioquímicos do metabolismo antioxidante (Gráfico 9) e hormonal entre os isolados (Gráficos 10, 11 e 12), e sugerimos que

a complexidade dessas propriedades podem ter influenciado as respostas no estresse oxidativo das plantas pelos isolados EL2, PM6.3 e PO7, devido ao efeito de diafonia (crosstalk), ou seja, a sinalização de um componente de uma via bioquímica pode influenciar os componentes de outra via, causando um problema de interferência de sinal indesejado em um sinal transmitido.

3.4 Discussão dos resultados

Os resultados obtidos em nosso estudo evidenciam que os isolados nativos de *Trichoderma* spp. alteraram o CPR e razão A/R das plantas de milho e também modularam os níveis de AIA, GA₃, flavonoides e açúcares totais nas folhas e raízes, afetando os níveis de H₂O₂ e enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX, que conseqüentemente alteraram os níveis de malondialdeído (MDA), responsáveis pelo dano oxidativo gerado pelo déficit de nutrientes no solo.

É de conhecimento científico e atual que a interação do *Trichoderma* spp. com plantas em condições de estresses abióticos, como déficit hídrico, salinidade, deficiência de nutrientes, altas e baixas temperaturas, pode melhorar a tolerância ao estresse ambiental, por meio do aumento endógeno de fitohormônios, enzimas antioxidantes e fitoalexinas nas plantas (Pedrero-Méndez et al., 2021; Sood et al., 2020; López-Bucio et al., 2015; Contreras-Cornejo et al., 2014; Mastouri et al., 2012; Harman et al., 2004).

As mudanças na plasticidade da arquitetura do sistema radicular são um fenômeno comum, que espécies de *Trichoderma* podem induzir em suas plantas hospedeiras (Harman et al., 2004; Nieto-Jacobo et al., 2017; Contreras-Cornejo et al., 2024) e os efeitos benéficos são aprimorados dependendo do estágio de interação e a produção de fitohormônios e metabólitos secundários, que desempenham papéis importantes na modulação das respostas fenotípicas da raiz (Contreras-Cornejo et al., 2024).

A ação do AIA aumenta em resposta a diminuição da disponibilidade de água e deficiência de nutrientes minerais dos solos, promovendo o desenvolvimento de um sistema radicular maior e conseqüentemente melhora capacidade de absorção de água e nutrientes minerais em profundidade pelas plantas (Kurepa e Smalle, 2022). As auxinas são reguladas positivamente em

condições onde o crescimento vigoroso da parte aérea é potencialmente letal para a planta, devido as condições do ambiente (Kurepa et al., 2023).

As interações auxina/flavonoide concordam com o papel regulador principal da auxina na formação desenvolvimento das plantas e coordenam a proteção contra o estresse no desenvolvimento da parte aérea e das raízes, permitindo assim que as plantas ocupem as condições desafiadoras e altamente variáveis do ambiente terrestre (Kurepa et al., 2023).

Os flavonoides possui função protetora do estresse abiótico e pode distinguir entre sua função antioxidante e sua função como moduladores da ação hormonal (Kurepa et al., 2023). Através da sua biossíntese regulada ambientalmente e do controle do transporte e ação das auxinas, os flavonoides garantem uma regulação ideal das auxinas para a adaptação ambiental das plantas (Kurepa et al., 2023).

GA₃ desempenha um importante papel regulador neste processo, pois o GA₃ suprime o acúmulo de flavonoides, inibindo a sua via de biossíntese (Tan et al., 2019). Esta ação inibitória do GA₃ envolve a degradação acelerada das proteínas DELLA que são mediadoras-chave de como as plantas inibem seu crescimento em resposta a condições de estresse elevado e isso inclui a promoção da biossíntese de flavonoides (Achard et al., 2006; Hernández-García et al., 2021). Nas raízes, este mecanismo dependente de DELLA e provavelmente ajuda a ajustar o crescimento em resposta aos estresses ambientais, com a indução de flavonóides proporcionando tolerância ao estresse oxidativo e controlando o transporte de auxina (Hetherington et al., 2021).

Quando o suprimento de GA da parte aérea até a raiz é inibido, uma biossíntese mecanismo de regulação é ativado para garantir a quantidade ideal de GA para manter crescimento da raiz (Bidadí et al., 2010). O GA promove o crescimento das raízes, aumentando o conteúdo de AIA, reduzindo a síntese de flavonoides, que inibem transporte polar de auxina (Tan et al., 2019).

No entanto, a relação entre GA e crescimento radicular não é sempre direto e existem muitas espécies nas quais têm efeitos pouco expressivos, neutros e negativos (Ramon et al., 2021; Fonouni-Farde et al., 2019). Contudo, parece claro que o GA afeta a arquitetura e o desenvolvimento radicular, além do comprimento da raiz e que os processos de desenvolvimento radicular são afetados pelo crosstalk entre GA e AIA (Castro-Camba et al., 2022).

Em plantas angiospermas, o mecanismo de sinalização modulado pelo ácido giberélico inclui uma cascata de eventos que se inicia quando as concentrações endógenas atingem o limite fisiológico para ser percebido (Harberd et al., 2009).

A interação com *Trichoderma* leva à modulação do transporte de carboidratos em *Arabidopsis* pela expressão de genes SWEET, que codificam transportadores de carboidratos em raízes colonizadas de *A. thaliana* (Rouina et al., 2021). Análises proteômicas de plantas de milho revelaram que *Trichoderma* pode alterar processos metabólicos relacionados ao metabolismo de carboidratos, e também melhorar a maquinaria fotossintética, que fornece à planta mais energia e carbono para eventos metabólicos subsequentes (Harman et al., 2004; Shoresh e Harman, 2008).

Contreras-Cornejo et al (2024), relatou em recente revisão, que as características moleculares, genéticas e bioquímicas moduladas por *Trichoderma* em suas plantas hospedeiras são responsáveis por uma resposta adaptativa a tolerância e/ou resistência a múltiplas das condições ambientais prejudiciais.

Diferentes pesquisas tem sido desenvolvidas com *Trichoderma* spp. com o objetivo de compreender o modo de ação do fungo em interação com diferentes hospedeiros, sob presença e ausência de estresse abióticos, e resultados similares aos obtidos neste estudo tem sido reportados.

Sofo et al (2011) analisaram os níveis de AIA em porta-enxertos de cereja (*Prunus cerasus* × *P. canescens*) inoculados com *Trichoderma* spp. e verificaram que o crescimento das raízes e de parte aérea aumentou em 76 e 61%, respectivamente, o que se correlacionou com níveis de 49 e 40% mais elevados de AIA tanto nas folhas como nas raízes.

Chowdappa et al (2013) estudando as propriedades fitoestimulantes de *Trichoderma* spp. em tomateiro, relatou que a promoção do crescimento dependia do acúmulo de auxina na planta, sendo que o nível AIA aumentou 45% em raízes de mudas de tomate inoculadas com o isolado de *Trichoderma* spp. OTPB3, quando comparadas as plantas controles não inoculados.

Kumar et al (2016) observaram variações nas respostas de nove espécies de *Trichoderma* spp. solubilizadores de P e produtores de AIA, na promoção de crescimento de milho em condições de estresse salino em casa de vegetação.

Dentre os isolados, *T. harzianum* aumentou significativamente os parâmetros de comprimento da parte aérea e raiz, área foliar, e biomassa das plantas e foi capaz de diminuir o acúmulo de teor de malondialdeído (MDA), aliviando o dano oxidativo do estresse salino no milho.

Zhao e Zhang (2015), investigou o crescimento e as alterações de AIA, GA e ABA nas folhas de pepino sob estresse salino, inoculados com *T. Asperellum* (produtor de AIA e solubilizador de P), e verificaram tanto na ausência quanto na presença de estresse, aumento no comprimento da raiz em 42,1 e 23% e massa fresca em 56,3 e 45,2%, respectivamente, comparado com os grupos não inoculados. Os níveis de AIA e GA também aumentaram nas folhas em 62,7 e 69,6% e 55,6% e 23,%, respectivamente, na ausência e presença do estresse salino.

Zhao et al (2020) avaliaram a capacidade de isolados de *T. Asperellum* produtores de sideróforos e AIA, em promover o crescimento inicial de plantas de *Arabidopsis* sob deficiência de ferro e verificaram o aumento no comprimento da raiz em até 176% comparado ao controle, aliviando significamente os efeitos inibitórios do estresse. Os autores sugeriram que os sideróforos produzidos por *T. asperellum* aumentou o conteúdo de AIA nas raízes, aumentando a conversão de P disponível para as plantas.

As enzimas antioxidantes-superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) em mudas de trigo foram aumentaram 29, 39 e 19%, respectivamente, com a aplicação de *T. longibrachiatum* sob estresse salino e a expressão relativa dos genes SOD, POD e CAT foram reguladas positivamente (Zhang, Gan e Xu, 2016).

Isolados de *Trichoderma* induziram a formação e acúmulo EROs que atuaram como moléculas sinalizadoras, aumentando a germinação de sementes de pimenta e a correlação positiva foi encontrada entre as enzimas antioxidantes peroxidase, SOD e CAT (Tančić-Živanov et al. 2020).

As respostas no crescimento inicial das plantas de milho var. Airan sob déficit de nutrientes no solo em interação com os isolados nativos de *Trichoderma* spp. foram induzidas pela modulação dos níveis de flavonoides e açúcares totais, auxina e giberelina, nas quais alteraram os níveis de peróxido de hidrogênio e enzimas antioxidantes, proporcionando maior adaptação as condições do ambiente.

3.5 Conclusões

A alta capacidade de produção de AIA e solubilização de fósforo pelos isolados nativos de *Trichoderma* spp. influenciaram diretamente o aumento do comprimento das raízes e razão parte aérea das plantas de milho e também afetaram o metabolismo hormonal e antioxidantes das plantas sob estresse.

A modulação dos níveis de flavonoides, açúcares solúveis totais, AIA, GA3 e as enzimas antioxidantes CAT e APX foram as principais variáveis responsáveis pela regulação no crescimento e estresse oxidativo celular causado pela deficiência de nutrientes no solo.

A complexidade no modo de ação de *Trichoderma* spp. na regulação do crescimento das plantas frente as condições adversas do ambiente, reforça a importância do entendimento da interação *Trichoderma*/planta durante o crescimento e desenvolvimento em condições de campo e seus efeitos na produtividade das culturas.

3.6 Referências

Abdenaceur, R.; Farida, B.; Mourad, D.; Rima, H.; Zahia, O.; Fatma, S. Effective biofertilizer *Trichoderma* spp. isolates with enzymatic activity and metabolites enhancing plant growth. **International Microbiology**, pp. 817-829, 2022. Doi: 10.1007/s10123-022-00263-8

Achard, P.; Renou, J.P.; Berthomé, R.; Harberd, N.P.; Genschik, P. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. **Current Biology**, v. 18, pp. 656-660, 2008.

Alexieva, V.; Sergiev, I.; Mapelli, S.; Karanov, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.

Alizadeh, M.; Qaderi, S.; Roshanroo, M.; Karimzadeh, S.; Fazli, M.; Saeedi, M.; Akhtari, A.; Heidarzadeh, A. Contouring Multifaceted Biological Activities and Applications of *Trichoderma* spp. for Managing Plant Health. **Journal of Crop Health**, Spring, mar., 2024. Doi.org/10.1007/s10343-024-00976-y

Azevedo, R. A.; Alas, R. M.; Smith, R. J.; Lea, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

Bader, A.; Salerno, G.; Covacevich, F.; Consolo, V. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3-acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control with disease on tomato (*Solanum Lycopersicum* L.). **Journal of King Saud University - Science**, pp. 867-873, 2020. Doi: 10.1016/j.jksus.2019.04.002

Bidadi, H.; Yamaguchi, S.; Asahina, M.; Satoh, S. Effects of shoot-applied gibberellin/gibberellin-biosynthesis inhibitors on root growth and expression of gibberellin biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Root**, v. 4, pp. 4-11, 2010.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Brown, D. E.; Rashotte, A. M.; Murphy, A. S.; Normanly, J.; Tague, B. W.; Peer, W. A.; et al. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 126, pp. 524–535, 2001. Doi: 10.1104/pp.126.2.524

Brunetti, C.; Fini, A.; Sebastiani, F.; Gori, A.; Tattini, M. Modulation of Phytohormone Signaling: A Primary Function of Flavonoids in Plant-Environment Interactions. **Frontier in Plant Science**, v. 9, 2018. Doi: 10.3389/fpls.2018.01042

Castro-Camba, R.; Sánchez, C.; Vidal, N.; Vielba, J.M. Plant Development and Crop Yield: The Role of Gibberellins. **Plants**, v. 11, 2022. Doi.org/10.3390/plants11192650

Chapman, J.M.; Muday, G.K. Flavonols modulate lateral root emergence by scavenging reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. **Journal Biology Chemistry**, v. 296, 2021.

Chowdappa, P.; Kumar, S. M.; Lakshmi, M. J.; Upreti, K. K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological Control**, v. 65, n. 1, p. 109-117, 2013. Doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.009

Contreras-Cornejo, H.; Macías-Rodríguez, L.; Cortés-Penagos, C.; López-Bucio, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, pp. 1579-1593, 2009. Doi:10.1104/pp.108.130369

Contreras-Cornejo, H. A.; Macías-Rodríguez, L.; Alfaro-Cuevas, R.; López-Bucio, J. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 27, pp. 503-514, 2014. Doi.org/10.1094/mpmi-09-13-0265-r

Contreras-Cornejo, H. A.; Schmoll, M.; Esquivel-Ayala, B. A. E.; Gonzalez-Esquivel, C. E.; Rocha-Ramírez, V.; John Larsen, J. Mechanisms for plant growth promotion activated by *Trichoderma* in natural and managed terrestrial ecosystems. **Microbiological Research**, v. 281, 2024.

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.T.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

Fonouni-Farde, C.; Miassod, A.; Laffont, C.; Morin, H.; Bendahmane, A.; Diet, A.; Frugier, F. Gibberellins negatively regulate the development of *Medicago truncatula* root system. **Science Reporter**. v. 9, 2019.

Giannopolitis, C. N.; Ries, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

Gordon, S.A.; Weber, R.P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**, pp. 192-195, 1951. Doi: 10.1104/pp.26.1.192

Graham, H. D.; Thomas, L. B. Rapid, simple colorimetric method for the determination of micro quantities of gibberellic acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 44-48, 1961.

Guzmán-Guzmán, P.; Porrás-Troncoso, M.D.; Olmedo-Monfil, V.; Herrera-Estrella, A. *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. **Phytopathology**, v. 109, pp. 6-16, 2019. Doi.org/10.1094/phyto-07-18-0218-rvw

Harman, G.; Howell, C.; Viterbo, A.; Chet, I.; Lorito, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Review Microbiology**, pp. 43-56, 2004.

Heath, R. L.; Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

Hernández-García, J.; Sun, R.; Serrano-Mislata, A.; Inoue, K.; Vargas-Chávez, C.; Esteve-Bruna, D.; Arbona, V.; Yamaoka, S.; Nishihama, R.; Kohchi, T.; et al. Coordination between growth and stress responses by DELLA in the liverwort *Marchantia polymorpha*. **Current Biology**, ed. 11, v. 31, pp. 3678-3686, 2021.

Hetherington, F.M.; Kakkar, M.; Topping, J.F.; Lindsey, K. Gibberellin signaling mediates lateral root inhibition in response to K⁺ deprivation. **Plant Physiology**, v. 185, pp. 1198-1215, 2021.

Kumar, K.; Manigundan, K.; Amaesan, N. Influence of salt tolerant *Trichoderma* spp. on growth of maize (*Zea mays*) under different salinity conditions. **Journal Basic Microbiology**, pp. 141-150, 2017. Doi:10.1002/jobm.201600369

Kurepa, J.; Shull, T.E.; Smalle, J.A. Friends in Arms: Flavonoids and the Auxin/Cytokinin Balance in Terrestrialization. **Plants**, v. 12, p. 517, 2023. Doi.org/10.3390/plants12030517

Kurepa, J.; Smalle, J.A. Auxin/Cytokinin antagonistic control of the shoot/root growth ratio and its relevance for adaptation to drought and nutrient deficiency stresses. **International Journal Molecular Science**, v. 23, 2022.

López-Bucio, J. Pelagio-Flores, R. Herrera-Estrella, A. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p.109-123, 2015.

Mastouri, F., Björkman, T. Harman, G. E. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidante defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 25, pp. 1264-1271, 2012.

MOLDES, C. A.; MEDICI, L. O.; ABRAHÃO, O. S.; TSAI, S. M.; AZEVEDO, R. A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 469–479, 2008.

Nieto-Jacobo, M.; Steyaert, J.; Salazar-Badillo, F.; Vi Nguyen, D.; Rostás, M.; Braitwaite, M.; De Souza, J.; Jimenez-Bremont, J.; Ohkura, M.; Stewart, A.; Mendoza-Mendoza, A. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Plant Science**, pp. 1-18, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.00102

Pedrero-Méndez, A. et al. Why is the correct selection of *Trichoderma* strains important: The case of wheat endophytic strains of *T. harzianum* and *T. simmonsii*. **Journal Fungi**, v. 7, p. 1087, 2021.

Peer, W. A., and Murphy, A. S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends Plant Science**, v. 12, pp. 556-563, 2007. Doi: 10.1016/j.tplants.2007.10.003

Peer, W. A.; Cheng, Y.; Murphy, A. S. Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, pp. 2629-2639, 2013. Doi: 10.1093/jxb/ert152

Ramon, U.; Weiss, D.; Illouz-Eliaz, N. Underground gibberellin activity: Differential gibberellin response in tomato shoots and roots. **New Phytologist**, v. 229, pp. 1196-1200, 2021.

Rouina, H.; Tseng, Y.H.; Nataraja, K.N.; Uma-Shaanker, R.; Oelmuller, R. *Arabidopsis* restricts sugar loss to a colonizing *Trichoderma harzianum* strain by downregulating SWEET11 and -12 and upregulation of SUC1 and SWEET2 in the roots. **Microorganisms**, v. 9, p. 1246, 2021.

Rouphael, Y.; Colla, G. Biostimulants in Agriculture. **Frontier Plant Science**, 2020. Doi: 10.3389/fpls.2020.00040

Shoresh, M.; Harman, G.E.; Mastouri, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48 p. 21-43, 2010.

Sofa, A.; Scopa, A.; Manfra, M.; De Nisco, M.; Tenore, G.; Troisi, J.; Di Fiori, R.; Novellino, E. *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* x *P. canescens*). **Plant Growth Regulation**, v. 65, pp. 421-425, 2011.

Sood, M.; Kapoor, D.; Kumar, V.; Sheteiwy, M.; Ramakrishnan, M.; Landi, M.; Araniti, F.; Sharma, A. *Trichoderma*: The "secrets" of multitasking biocontrol agent. **Plants**, pp. 1-25, 2020. Doi: 10.3390/plants9060762

Tan, H.; Man, C.; Xie, Y.; Yan, J.; Chu, J.; Huang, J. A crucial role of GA-regulated flavonol biosynthesis in root growth of *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 12, pp. 521-537, 2019.

Tančić-Živanov, S.; Medić-Pap, S.; Danojević, D.; Prvulović, D. Effect of *Trichoderma* spp. on Growth Promotion and Antioxidative Activity of Pepper Seedlings. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V. 63, 2020. Doi: 10.1590/1678-4324-2020180659

Woo, S. L.; Hermosa, R.; Lorito, M.; Monte, E. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture. **Nature Review Microbiology**, v. 21, pp. 312-326, 2023. Doi.org/10.1038/s41579-022-00819-5

Yao, X.; Zhu, L.; Chen, Y.; Tian, J.; Wang, Y. In vivo and in vitro antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 59-66, 2013.

Zhang, S.; Gan, Y.; Xu, B. Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. **Frontier of Plant Science**, v. 7, p. 1405, 2016. Doi: 10.3389/fpls.2016.0140

Zhao, L. Zhang, Y. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v.14, pp. 1588-1597, 2015.

Zhao, L.; Wang, Y.; Kong, S. Effects of *Trichoderma asperellum* and its siderophores on endogenous auxin in *Arabidopsis thaliana* under iron-deficiency stress. **International Microbiology**, Ed. Springer Nature, 21/Jan, 2020. Doi: 10.1007/s10123-020-00122-4

CAPÍTULO 4 - Respostas no crescimento e metabolismo bioquímico de genótipo de tomate selvagem cv. Micro-tom e mutante dgt na interação com *Trichoderma* sp. PI3 produtor de AIA.

RESUMO – Isolados nativos de *Trichoderma* spp. tem demonstrado grande capacidade de produção de ácido indolacético, o qual tem papel importante no crescimento das plantas e desenvolvimento das plantas. A interação *Trichoderma*-AIA-planta pode trazer grandes mudanças no crescimento e metabolismo das plantas, principalmente no sistema radicular, podendo modificar a arquitetura e o desenvolvimento das raízes. No entanto, a ação de isolados de *Trichoderma* spp. que possui alta habilidade de produção de AIA, pode provocar efeitos positivos, neutros e negativos, dependentes das condições do ambiente, sendo assim seu papel ainda totalmente foi estabelecido. O objetivo desse estudo foi verificar o efeito na promoção ou regulação do crescimento de dois genótipos de micro tomateiro, o cv. micro-tom selvagem e o mutante diageotrópica dgt, que possui sensibilidade a auxina, em interação com o isolado nativo de *Trichoderma* sp. PI3, devido sua alta capacidade de produção de AIA *in vitro* ($623,5 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ AIA). Foram avaliados parâmetros de crescimento e o metabolismo bioquímico hormonal e antioxidante dos dois genótipos após 60 dias de interação. O isolado PI3 promoveu efeito neutro no crescimento dos dois genótipos, porém foi observado notório desenvolvimento de raízes adventícias e pelos radiculares nas plantas inoculadas em comparação aos tratamentos controle. O isolado PI3 alterou o metabolismo bioquímico das plantas, promovendo um balanço nos níveis de AIA, GA₃, flavonoides entre parte aérea e raízes, bem como a concentração de H₂O₂, atividade da enzima SOD, APX e teores de proteínas e açúcares solúveis totais na parte aérea das plantas, atenuando o estresse oxidativo das plantas.

Palavras-chave: micro-tomate, *Hypocrea*, auxina, giberelina, flavonoides.

4.1 Introdução

A auxina é o fitohormônio mais estudado quanto a promoção de crescimento promovida por espécies de *Trichoderma* spp., sendo capaz de estimular o transporte e sinalização de AIA nas plantas, resultando na promoção do crescimento (Contreras-Cornejo et al., 2009). No entanto, o excessivo acúmulo de auxinas induzida por *Trichoderma* pode levar à inibição de crescimento da raiz e o desenvolvimento das plantas (Contreras-Cornejo et al., 2009; Nieto-Jacobo et al., 2017).

Contreras-Cornejo et al (2009) estudando os efeitos de AIA e derivados (ácido indolacético e ácido indoleacético) produzidos por *Trichoderma virens*, no mutante de *Arabidopsis axr1-3* (mutante em genes de transporte e sinalização auxina), apresentaram respostas negativas no crescimento. No entanto, a percepção de AIA e seus derivados, pelas pontas das raízes, induziram alterações no marcador responsivo à auxina DR5:GUS, descobrindo que seus efeitos estavam correlacionados com aumentos na proliferação celular e na formação de raízes laterais (Contreras-Cornejo et al., 2009).

Recentes pesquisas, sem a interação com microrganismos, demonstraram que a auxina pode regular positivamente a biossíntese de flavonoides em baixas concentrações, limitando sua ação negativa na formação do sistema radicular e protegendo a raiz do acúmulo excessivo de EROs, promovendo o surgimento de raízes laterais, (Chapman e Muday, 2021; Kurepa et al., 2023).

Adicionalmente, o fitohormônio ácido giberélico (GAs) promove a regulação de processos-chave em plantas, como germinação de sementes, alongamento de raízes e brotos, floração e formação de frutos (Eriksson et al., 2006). O acúmulo de GA₃ produzido por *T. harzianum* em combinação com AIA aumentou o efeito de promoção do crescimento em planta e a produção de GA pelo isolado foi positivamente correlacionada com a síntese de AIA (Jaroszuk-Scisiel et al., 2019).

Experimentos com microrganismos e plantas mutantes de auxina são necessários para esclarecer, se a extensão dos efeitos que provocam respostas bioquímicas da auxina/giberelina/flavonoides/EROs nas plantas são semelhantes após contato ou colonização com microrganismos benéficos, as quais ainda não são definidas (Sukuman et al., 2013; Wang et al., 2022).

O micro tomateiro mutante diageotrópico (dgt) é caracterizado como uma planta anã, com crescimento em posição horizontal do caule e raízes e são insensíveis à auxina, afetando processos como crescimento e expressão de genes de resposta ao AIA (Christina e Luthen, 2000; Nebenfuhr et al., 2000). O defeito do mutante dgt está associado com eventos primários na ação da auxina, como dominância apical reduzida e ausência de ramificação lateral de raízes primárias e adventícias (Coenen e Lomax, 1998).

O objetivo desse estudo foi verificar a ação do isolado nativo de *Trichoderma* spp. PI3, produtor de alta concentração de AIA, na interação com plantas de tomateiro cv. micro-tom e mutante dgt, quanto as respostas no crescimento e metabolismo hormonal e antioxidante das plantas.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Isolado nativo de *Trichoderma* spp. PI3

O isolado PI3 nativo de *Trichoderma* spp. foi utilizado no ensaio devido à alta capacidade produção de AIA *in vitro* (623,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ AIA).

4.2.2 Plantas de tomate micro-tom e dgt

Foram utilizados genótipos de micro-tomateiro cv. microton (M) que contém a presença do gene Dwarf, que confere o porte anão às plantas (Carvalho et al., 2011) e o genótipo de tomate mutante Diageotropica (dgt) que possui baixa sensibilidade à auxina devido à perda de capacidade de biossíntese da proteína ciclofilina (Kelly e Bradford, 1986).

4.2.3 Ensaio de crescimento inicial em tomate micro-tom e mutante dgt

As sementes dos genótipos de tomate microton e dgt foram semeadas em bandejas contendo substrato e aos 21 dias após o semeio, as plântulas foram transplantadas para vasos de 0,4 L, contendo substrato comercial. Após sete dias do transplante, foi realizado a aplicação via drench da solução de esporos do isolado PI3, na concentração de $2,3 \cdot 10^7$ esporos/ml, em um volume de calda de 5 ml/vaso-planta.

Os vasos foram mantidos por 60 dias em bancada luminosa com fotoperíodo de 12h luz/12h escuro, em condições de laboratório com temperatura média de 24° C e foram a cada 15 dias fertirrigadas com solução de hoagland com micronutrientes.

O experimento foi montado em delineamento experimental inteiramente casualizado, contendo quatro tratamentos e 15 repetições (Tabela 1). Foram utilizadas para avaliação do crescimento das plantas cinco plantas e 10 para as análises bioquímicas.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos do ensaio de promoção de crescimento em tomate microtom e mutante Dgt, pelo isolado de *Trichoderma* sp. PI3 produtor de AIA.

Tratamento	Descrição	[] esporos /ml	Aplicação	Volume p/ vaso-planta(ml)
1	Micro-tom controle	-	-	-
2	Micro-tom + PI3	2,3. 10 ⁷	Drench	5
3	Dgt Controle	-		
4	Dgt + PI3	2,3. 10 ⁷	Drench	5

4.2.4 Análises de crescimento das plantas de tomate micro-tom e dgt

Os parâmetros de crescimento analisados foram comprimento de parte aérea (CPA), comprimento de raízes (CPR), massa seca de parte aérea (MSA), massa de raízes (MSR) e razão parte aérea/raiz (A/R).

A avaliação do CPA e CPR foi realizada com auxílio de régua milimetrada (cm), medindo a altura das plantas a partir do colo até o meristema apical das plantas de tomate e o comprimento das raízes foi avaliado após a retirada do solo dos vasos, seguida de lavagem em água corrente.

A avaliação da MSA e MSR das plantas de tomate, foram realizadas utilizando balança analítica (g), após a secagem em estufa com circulação de ar, a temperatura de 60°C, durante 48 horas. A razão A/R foi obtido pela divisão do valor da MSA pela MSR.

3.2.5 Análises do metabolismo oxidante e antioxidante

3.2.5.1 Teores de H₂O₂ e MDA

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e peroxidação lipídica (MDA - malondialdeído), 1 g de tecido vegetal foi macerado em nitrogênio

líquido e extraído em 10 mL solução TCA (ácido tricloroacético) 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min à 4 °C, e o sobrenadante utilizado para as análises.

Na quantificação de H₂O₂, 200 µL do sobrenadante foi adicionado 200 µL de solução de 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 800 µL de solução 1 M iodeto de potássio. Essa solução foi incubada em gelo por 1 h. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 390 nm e ajustada com a curva padrão de calibração de H₂O₂ (Gráfico 1). A quantidade de H₂O₂ foi expressa em µmol g⁻¹ de massa fresca (Alexieva et al., 2001).

Para a quantificação de MDA, 200 µL do sobrenadante foi adicionado 1 mL de 0,5% TBA (ácido tiobarbitúrico) em 20% TCA. Essa solução foi incubada a 95 °C por 30 min, e a reação foi interrompida com banho de gelo. As absorvâncias foram de 535 nm e 600 nm, o resultado foi expresso em nmol g⁻¹ de massa fresca (Heath; Packer, 1968).

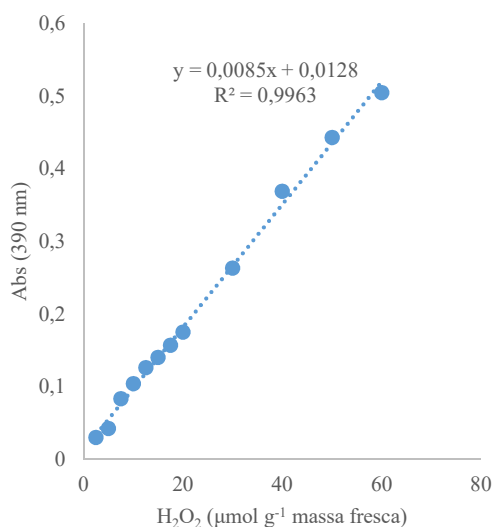


Gráfico 1. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

3.2.5.2 Teores de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX)

A determinação do metabolismo antioxidante foi realizada analisando os componentes: atividade da superóxido dismutase (SOD, EC:1.15.1.1), catalase (CAT, EC:1.11.1.6) e ascorbato peroxidase (APX, EC:1.11.1.11). Para a extração 1 g de material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e adicionado

8 mL de Tampão Fosfato de Potássio 0,1 M pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min à 4 °C, e o sobrenadante utilizado para as análises.

A atividade de SOD foi determinada utilizando a metodologia adaptada de Giannopolitis e Ries (1977). O teste foi exposto à luz por 20 minutos em temperatura ambiente, e as amostras foram lidas em espectrofotômetro com 560 nm. A atividade da CAT foi determinada pela degradação do H₂O₂, sob a referência da leitura em espectrofotômetro 240 nm (absorbância) (Azevedo et al., 1998). A atividade APX foi avaliada pelo teste da avaliação temporal da atividade da enzima, com leitura em espectrômetro a 290 nm (Moldes et al., 2008). Todas as enzimas antioxidantes foram calculadas com base na concentração de proteína.

3.2.6 Teores de proteínas totais

Para extração de proteínas, 1 g de folhas frescas foram moídas com nitrogênio líquido e logo após extraído em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5. Os teores de proteínas totais foram determinados de acordo com Bradford (1976), 10 µL de extrato foi adicionado em 1 mL do reagente Bradford, após 5 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro a 595nm. Para a curva foi utilizado a albumina de soro bovina (Gráfico 2).

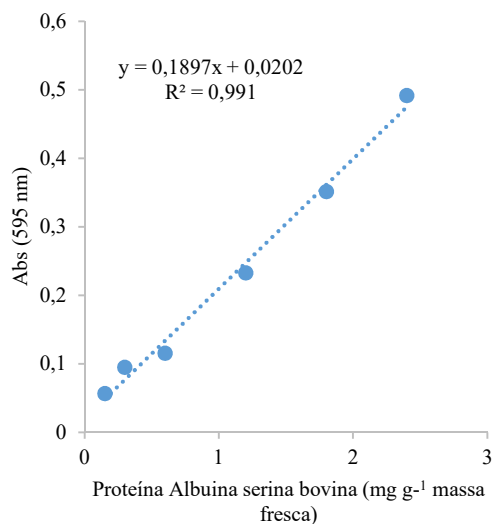


Gráfico 2. Curva de calibração da concentração de proteína albumina de soro bovina.

3.2.7 Açúcares solúveis totais

Para determinar os AST, 1 g de folhas frescas e raízes foram macerados e adicionados a tubos Falcon contendo 10 mL de solução MCA (60% v/v metanol, 25% v/v clorofórmio e 15 % v/v água). Após 48 h, 4 mL do sobrenadante foram coletados e transferidos para outro tubo Falcon e foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água deionizada. Para quantificação de AST foi utilizado o método fenol-sulfúrico de acordo com a metodologia de Dubois et al (1956), utilizado a glicose como padrão (Gráfico 3).

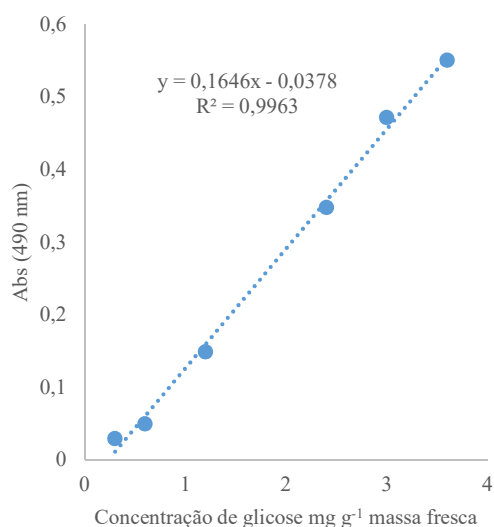


Gráfico 3. Curva padrão de calibração de açúcares totais (6 mg mL⁻¹ glicose).

4.2.8 Análise de flavonoides totais, AIA e GA₃

Foram quantificados os teores de flavonoides totais e fitohormônios (AIA e GA₃) nas folhas e raízes dos genótipos de tomate micro-tom e dgt.

4.2.8.1 Teores de flavonoides totais

Para extração dos flavonoides, 1 g de folhas frescas e 1,5 g de raízes foram extraído em etanol absoluto. As amostras foram incubadas em banho-maria a 60 °C por 2 h. Para a determinação de flavonoides totais utilizou-se NaNO₂ 5%, AlCl₃ 10%, e NaOH (1 M) de acordo com Yao et al (2013), utilizando-se rutina como padrão (Gráficos 4).

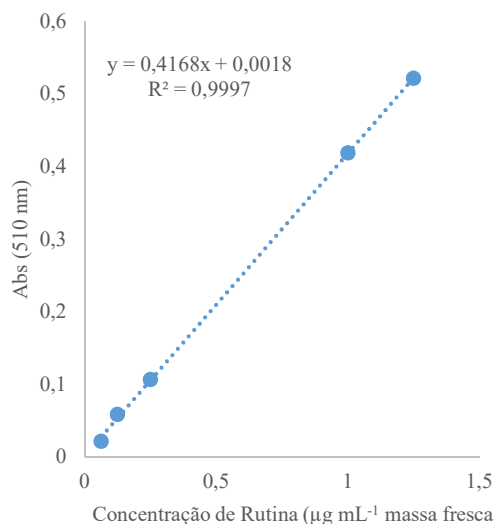
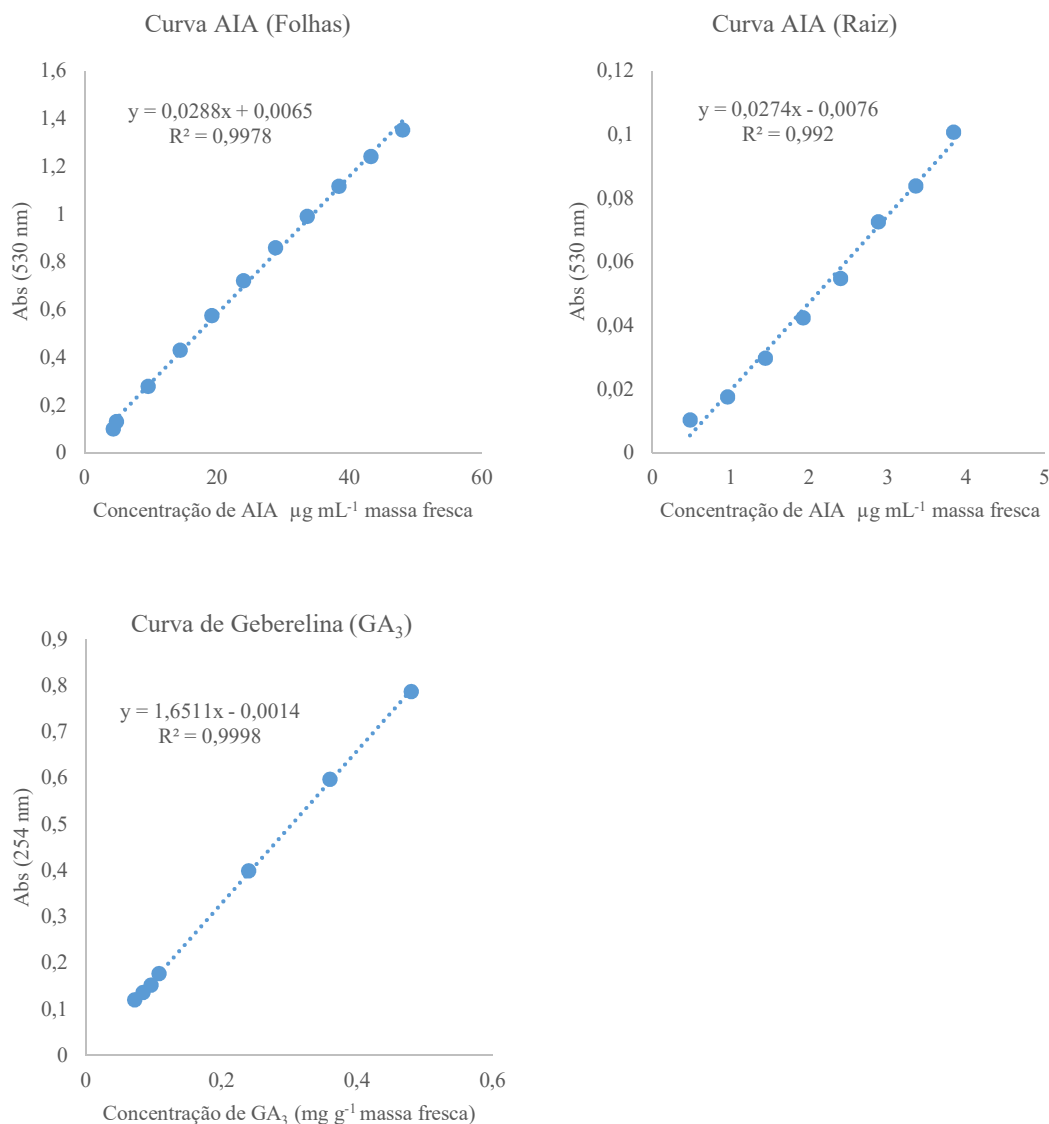


Gráfico 4. Curva padrão de calibração de flavonoide totais utilizando rutina (Folhas e raiz)

4.2.8.2 Quantificação de AIA e GA₃

Para quantificação de ácido indolacético (AIA) e ácido giberélico (GA₃), 1 g de folhas e 1,5 g de raízes foram extraídas usando tampão fosfato 0,06 M (pH 7,4). Os extratos vegetais foram homogeneizados e centrifugados a 10.000 × g por 30 min a 4 °C. A quantificação de AIA foi determinada utilizando a solução Salkowisk de acordo com Gordon e Weber (1971), utilizando AIA como padrão (Gráfico 5). A determinação de GA₃ foi realizada utilizando HCl (3,75 M) de acordo com Graham e Thomas (1961), utilizando GA₃ como padrão (Gráfico 5).



Gráficos 5. Curva padrão de calibração da concentração de AIA $\mu\text{g mL}^{-1}$ massa fresca (folha e raiz) – 0,012 g AIA em 250 mL de água ($48 \mu\text{g mL}^{-1}$) e GA₃ (mg g^{-1} massa fresca) – 0,012 g GA₃ em 10 mL de etanol 98 ($1,2 \text{mg mL}^{-1}$).

4.2.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram processados utilizando software Minitab para verificação de outlier e teste de normalidade Anderson Darling. Os dados de crescimento do genótipo mutante dgt para o parâmetro de razão parte aérea/raiz (A/R) foram transformados utilizando Log x. Foram realizadas as análises de variância das médias (ANOVA) pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para todas as variáveis tanto de crescimento, quanto para as análises bioquímicas, utilizando o software Sisvar. Os valores médios de cada tratamento (controle e isolados)

foram utilizados para análise multivariada de componentes principais (ACP) utilizando software Minitab. Os coeficientes de correlação de Pearson foram determinados para as variáveis dos CP1 e CP2 em conjunto ($p < 0,05$), utilizando o software Sigma Plot.

4.3 Resultados

4.3.1 Efeitos no crescimento inicial de plantas de tomate micro-tom e dgt

Os resultados no crescimento inicial dos tomates micro-tom e dgt pelo isolado nativo de *Trichoderma* sp. PI3 não apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) em todos os parâmetros de crescimento avaliados (CPA, CPR, MAS, MSR e A/R) e o efeitos observados foram neutros quanto a promoção do crescimento (Tabela 2).

Tabela 2. Comprimento da parte aérea (CPA) e de raízes (CPR), massa seca de parte aérea (MAS) e de raízes (MSR) e razão parte aérea/raiz (A/R) de plantas de tomate micro-tom e dgt aos 60 dias após tratamento via drench, com isolado PI3 nativo de *Trichoderma* spp. Letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores não transformados em parantêses.

Tratamento	CPA	CPR	MAS	MSR	A/R
-	(cm)		(g)		
T1-M	11,7 a	47,2 a	0,52 a	0,13 a	4,09a
T2-M+PI3	13,1 a	41,8 a	0,53 a	0,13 a	4,12a
CV%	10,55	11,71	39,69	24,89	25,06
p<0,05	0,166	0,177	0,932	0,852	0,963
-	-----				
T3-dgt	7,4a	8,3a	0,22a	0,026a	(9,63) 0,90a
T4-dgt+PI3	8,2a	7,9a	0,23a	0,028a	(9,75) 0,85a
CV%	11,8	22,75	49,84	21,91	34,85
p<0,05	0,2303	0,735	0,958	0,621	0,809

Contudo, foi possível observar maior desenvolvimento de raízes laterais e adventícias nos dois genótipos inoculados com o isolado PI3 (T2-M+PI3 e T4-dgt+PI3), em comparação ao controle não inoculado (T1-M e T3-dgt) (Figura 1).



Figura 1. Plantas de tomate cv. Microton (T1-M e T2-M-PI3) e mutante diageotrópica dgt (T3-dgt e T4-dgt-PI3) aos 60 dias após aplicação via drench com o isolado nativo de *Trichoderma* spp. PI3.

4.3.2 Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e dano oxidativo (MDA)

O efeito nos teores de H₂O₂ e MDA no tomate cv. micro-tom apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey (p<0,05). O isolado PI3

aumentou a concentração de H_2O_2 em 51% e diminuiu a concentração de MDA em 27% com comparação ao tratamento controle (Gráfico 6).

No genótipo mutante dgt não houve significância estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) na concentração de MDA nas plantas, não apresentando diferenças entre o T3-dgt e T4-dgt+PI3, mas para a concentração de H_2O_2 , houve diferença estatística significativa e a interação com PI3 aumentou em 18% comparado ao tratamento controle T1-dgt (Gráfico 6).

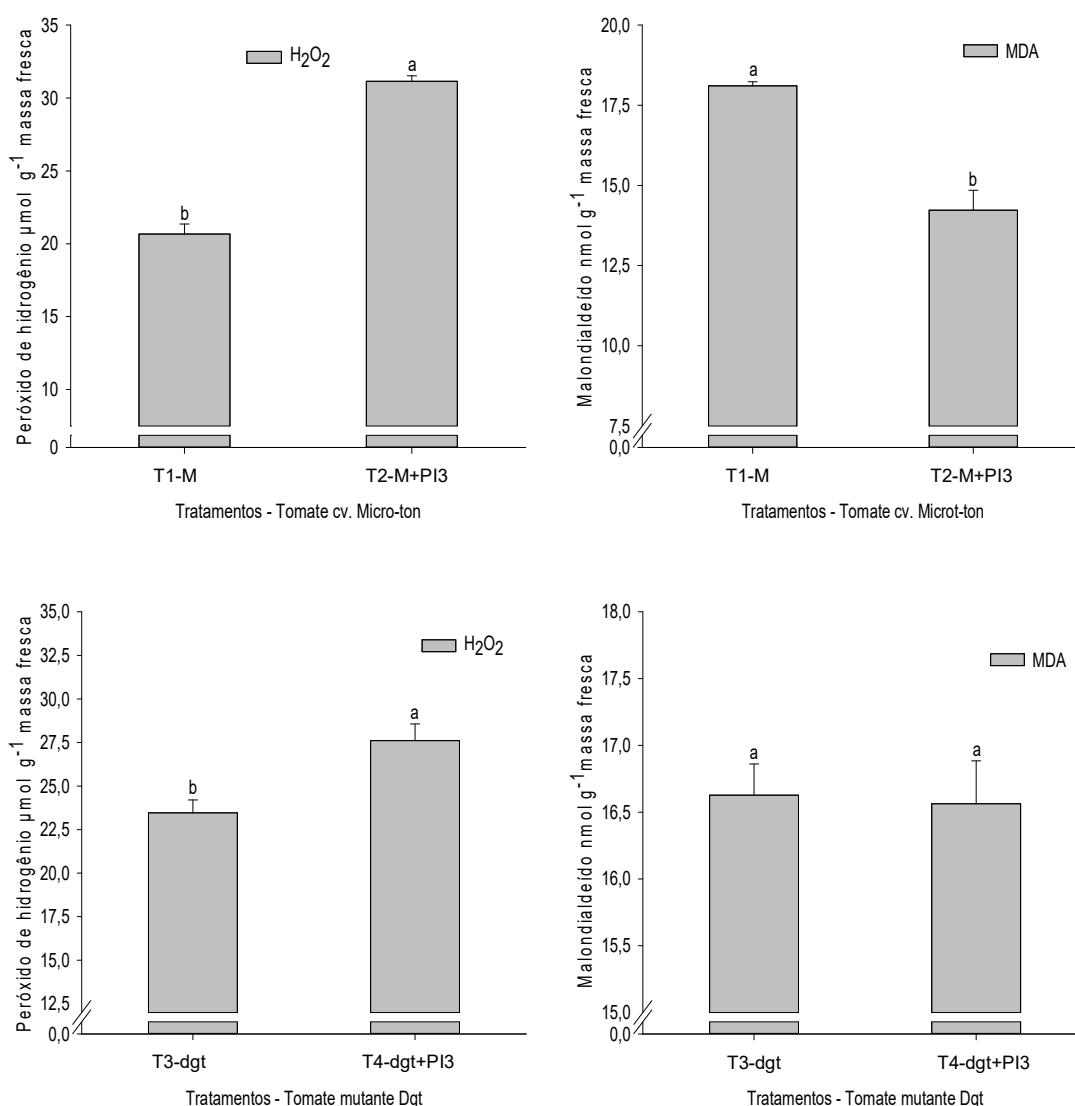


Gráfico 6. Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) em folhas de tomate cv. micro-tom e mutante dgt aos 60 dias de interação com o isolado PI3 nativo de *Trichoderma* sp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Considerando as condições de ambiente em laboratório, o isolado PI3 foi capaz de atenuar o estresse oxidativo, diminuindo os danos causados pela peroxidação lipídica das células no cv. micro-tom.

4.3.3 Efeito no metabolismo antioxidante (SOD, CAT e APX)

A atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX no tomate cv. micro-tom apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A atividade da enzima SOD, CAT e APX diminuíram em 32, 25 e 64% com a interação do PI3 em comparação ao tratamento controle (Gráfico 7).

No tomate mutante dgt a atividade da SOD, CAT apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), exceto para enzima APX que não houve significância estatística. A interação com o PI3 diminuiu em 20% a concentração de SOD e aumentou em 31% a concentração de CAT nas folhas (Gráfico 7).

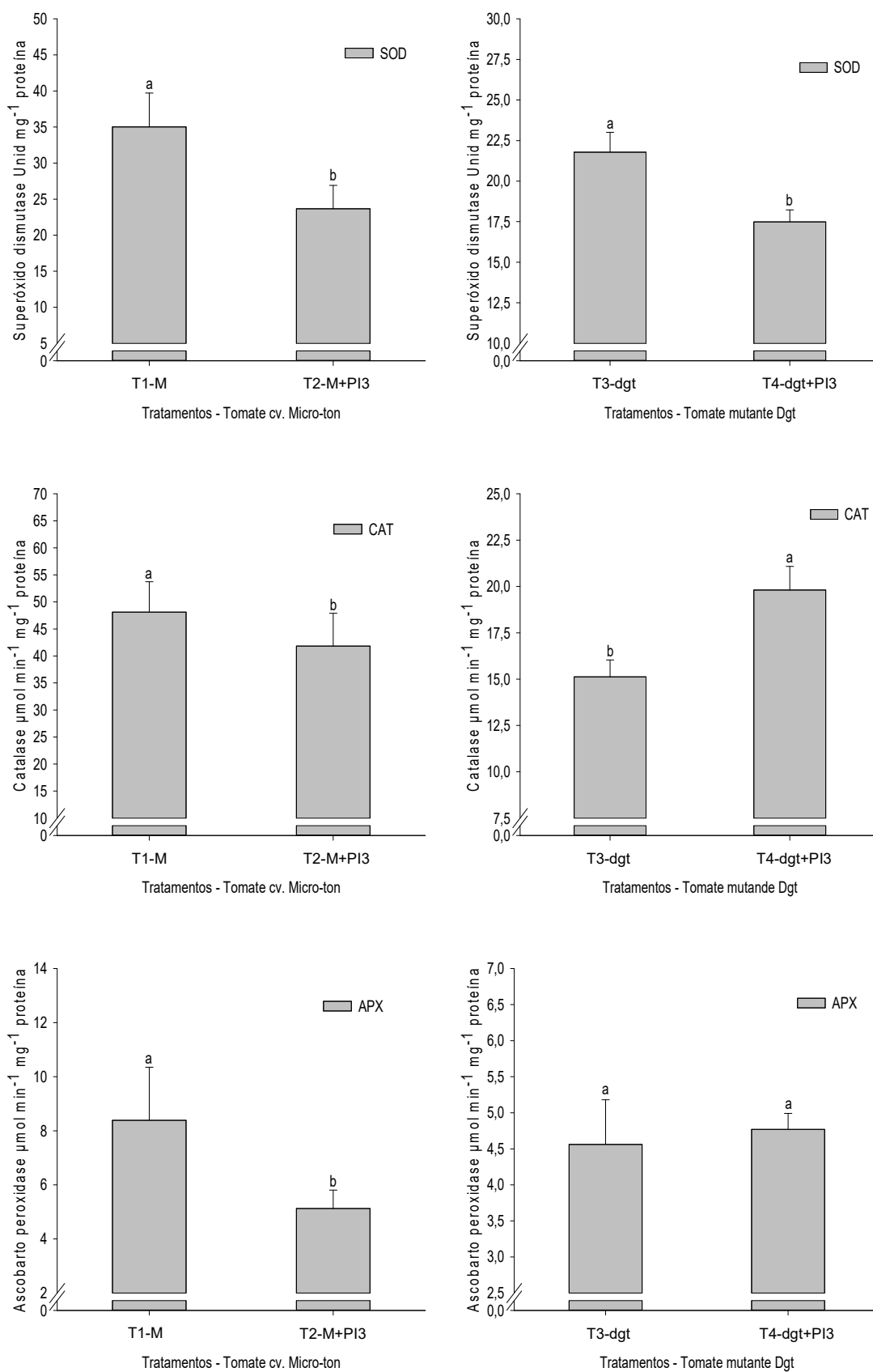


Gráfico 7. Concentração de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascobarto peroxidase (APX) em folhas de tomate cv.

micro-tom e mutante dgt em interação com isolado PI3 nativos de *Trichoderma* sp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.4 Efeito no teor de proteínas e açúcares solúveis totais

O teor de PROT e AST totais nas folhas do tomate cv. micro-tom e mutante dgt apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) entre os tratamentos T1-M e T2-M+PI3 e T3-dgt e T4-dgt+PI3.

A interação com o isolado PI3 aumentou 57 e 7% os teores de PROT e AST nas folhas respectivamente no cv. micro-tom em comparação ao tratamento controle T1-M e no genótipo mutante dgt houve aumento de 26 e 5% nos teores de PROT e AST respectivamente, comparado ao tratamento controle T3-dgt (Gráfico 8).

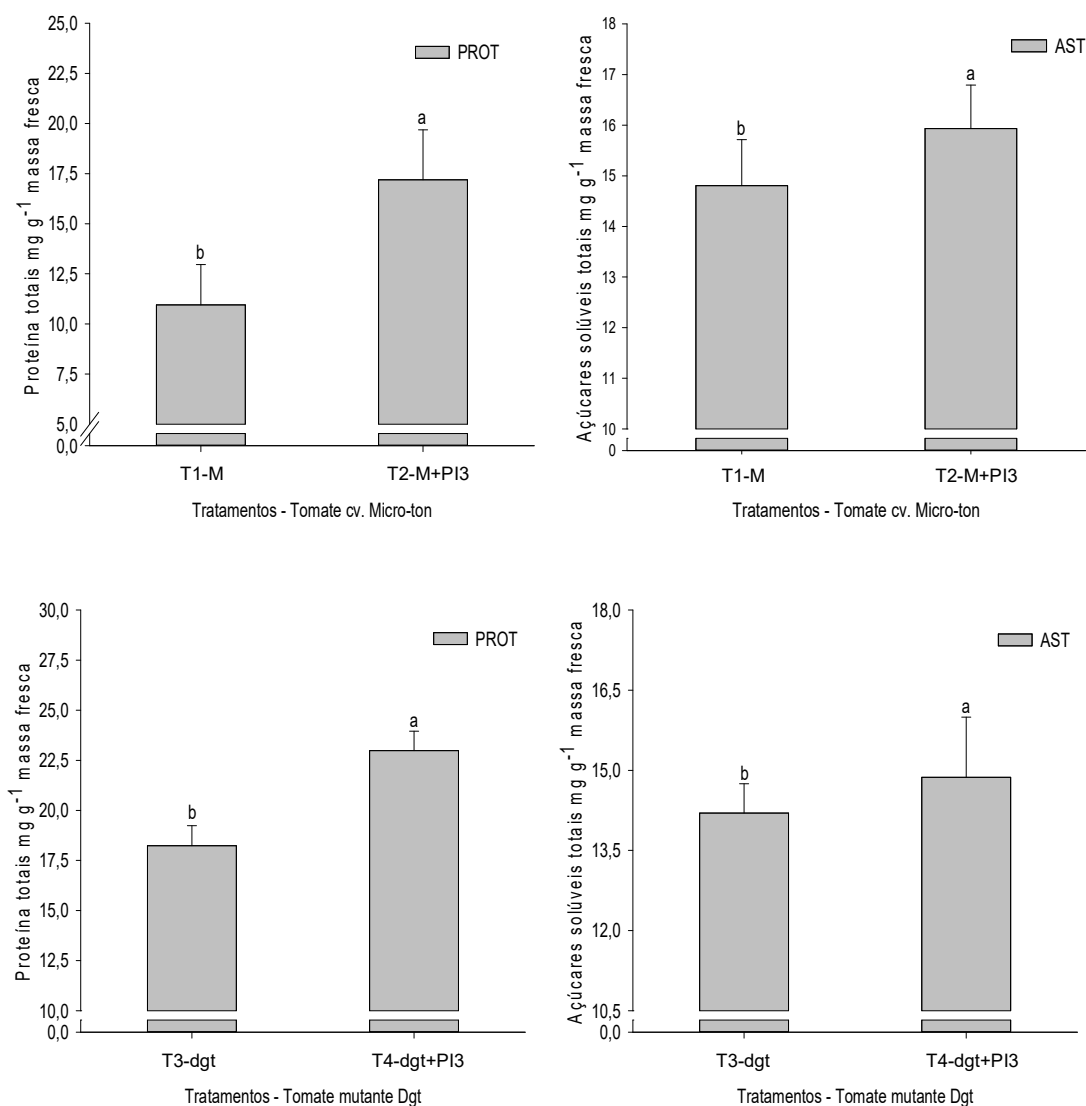


Gráfico 8. Concentração de proteínas totais (PROT) e açúcares solúveis totais (AST) em folhas de tomate cv. micro-tom e mutante dgt em interação com o isolado nativo PI3 de *Trichoderma* sp. Barras com letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.3.5 Efeito no teor de flavonoides totais, AIA e GA₃ em folhas e raízes do tomate micro-tom e dgt

O teor de FLAV nas folhas do genótipo de tomate micro-tom apresentou diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), exceto para o teor de FLAV na raiz. O isolado PI3, diminuiu o teor de FLAV na folha 15% em comparação ao controle T1-M (Gráfico 9). De maneira inversa, no genótipo mutante dgt o teor de FLAV nas folhas não apresentou significância estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), porém nas raízes houve diferença estatística

significativa e o isolado PI3 aumentou em 175% o teor de FLAV em comparação ao tratamento controle T3-dgt (Gráfico 9).

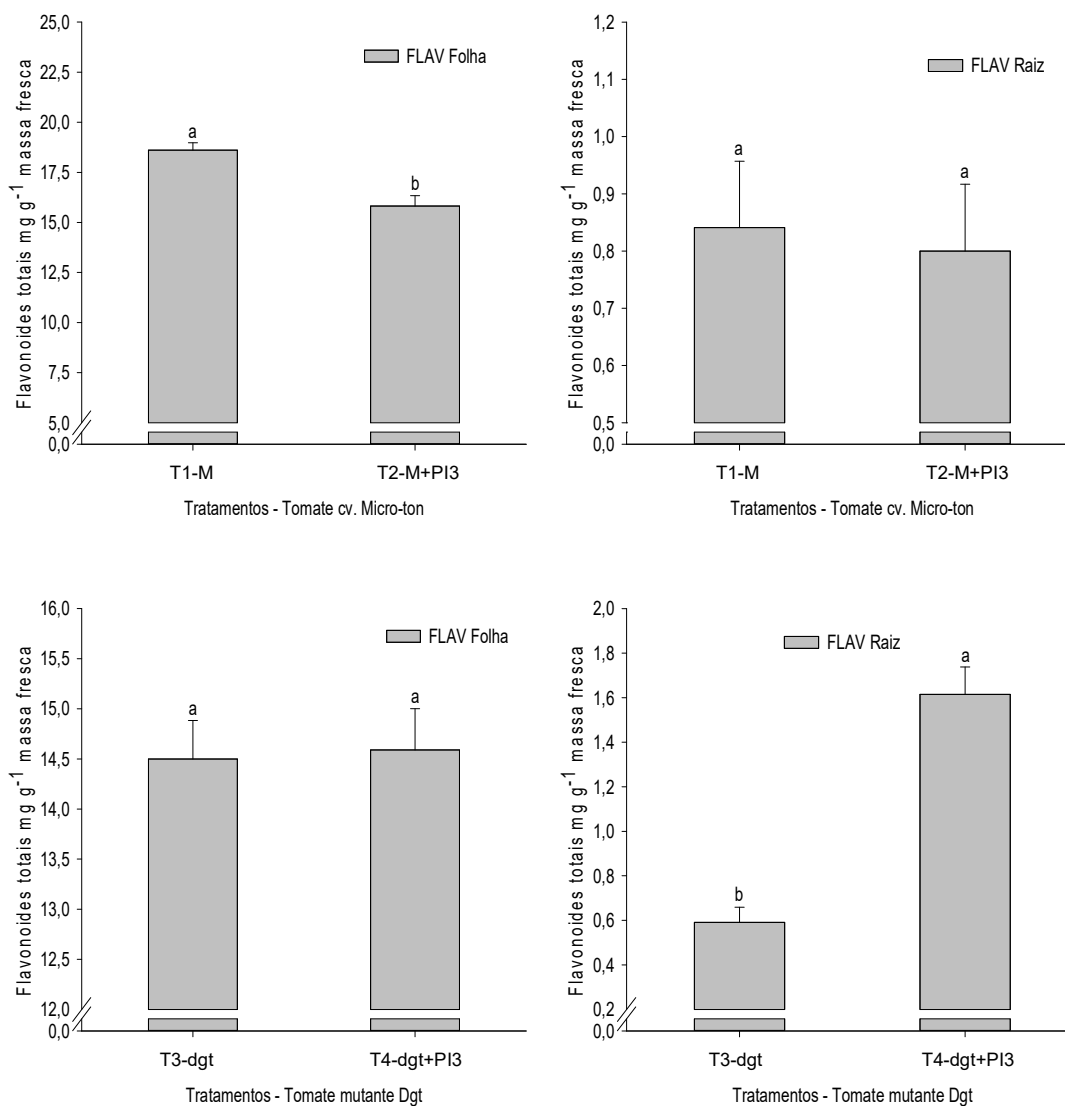


Gráfico 9. Concentração de flavonoides totais (FLAV) em folhas e raízes de genótipos de tomate micro-tom e dgt em interação com o isolado PI3 nativo de *Trichoderma* spp. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A concentração de AIA nas folhas e raízes dos genótipos de tomate micro-tom e mutante dgt apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com a interação do isolado PI3 em comparação aos tratamentos controle M e dgt. Os tratamentos T2-M+PI3 e T4-dgt+PI3 reduziram os níveis de AIA nas folhas em 36% e 9% e aumentaram em 55 e 53%

em comparação aos tratamentos controle T1-M e T3-dgt, respectivamente (Gráfico 10).

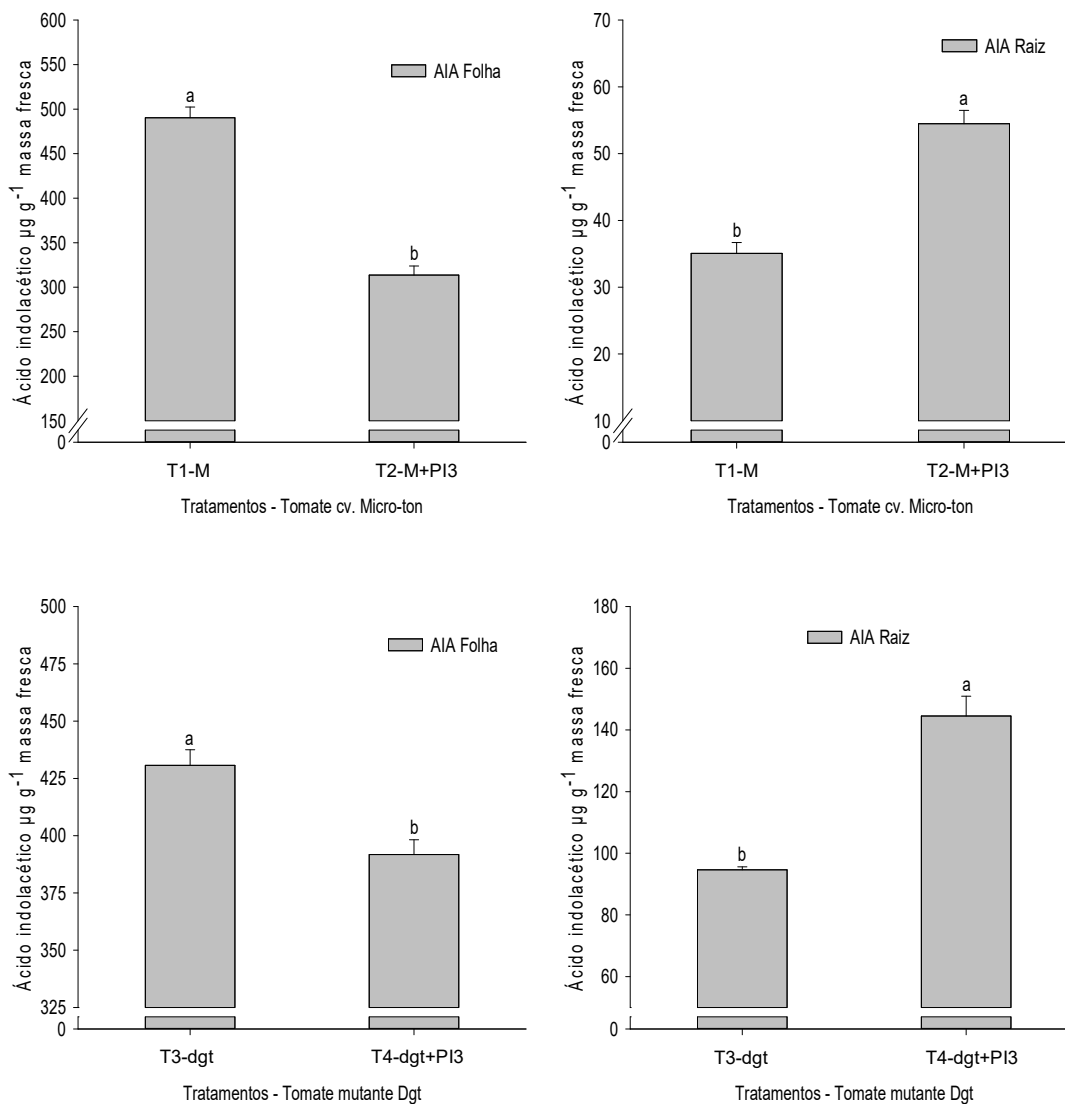


Gráfico 10. Concentração de AIA em folhas e raízes de genótipos de tomate micro-tom e dgt em interação com o isolado PI3 nativo de *Trichoderma* sp. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A concentração de GA_3 nas folhas e raízes dos genótipos de tomate micro-tom e dgt apresentaram diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e o isolado PI3 alterou da mesma maneira que a concentração de AIA em comparação aos tratamentos controle de ambos genótipos.

Os tratamentos T2-M+PI3 e T4-dgt-PI3 reduziram os níveis de GA nas folhas em 24% e 10% e nas raízes aumentaram em 82 e 86% em comparação aos tratamentos controle T1-M e T3-dgt, respectivamente (Gráfico 11).

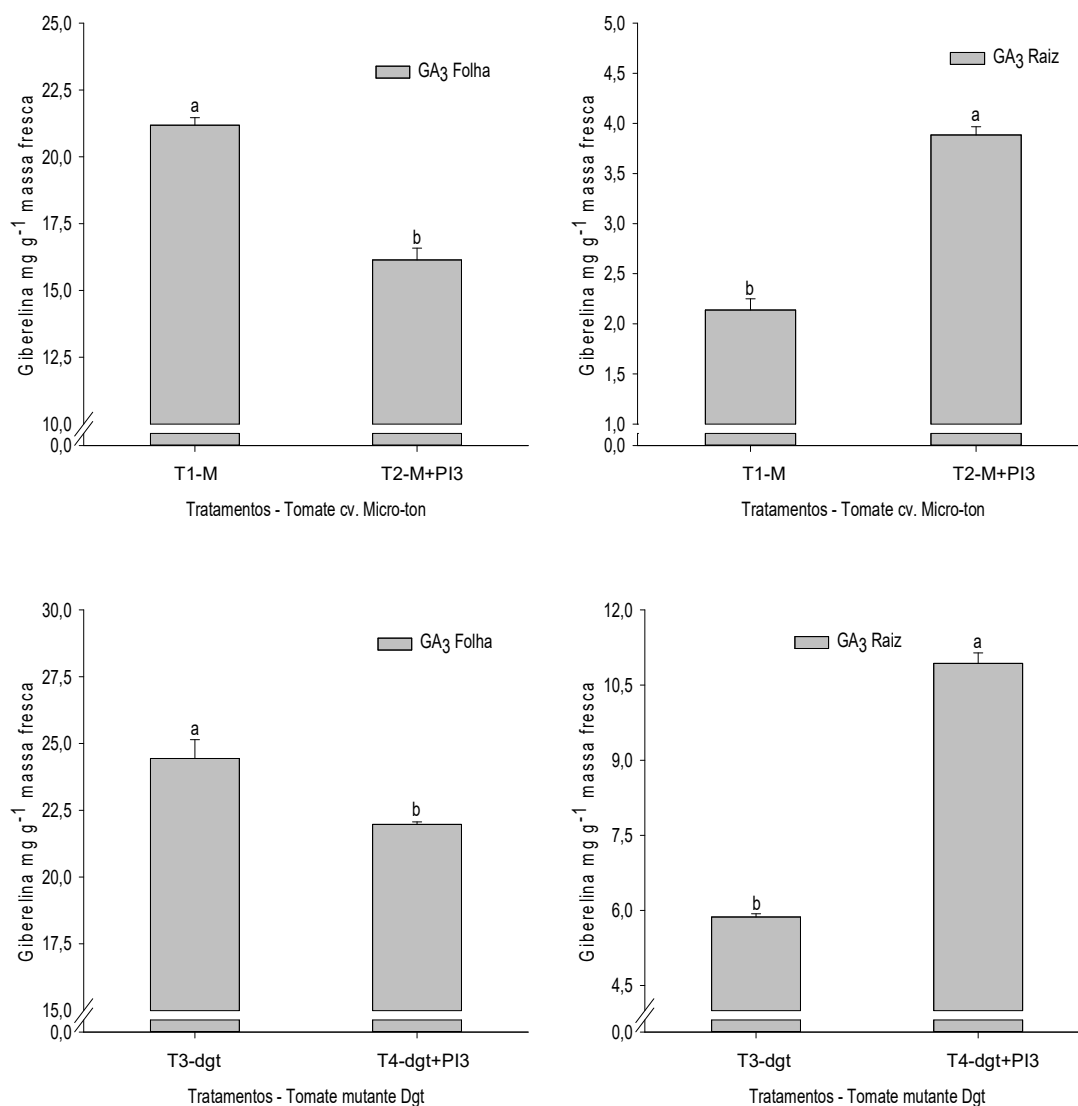


Gráfico 11. Concentração de Giberelina (GA₃) em folhas e raízes de genótipos de tomate micro-tom e dgt em interação com o isolado PI3 nativo de *Trichoderma* sp. Letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em resumo, a interação do isolado PI3 com os genótipos de tomate cv. micro-tom e dgt aumentou os teores de H₂O₂, PROT e AST nas folhas e AIA e GA₃ nas raízes; e diminuiu o teor da enzima SOD, AIA e GA₃ nas folhas, em comparação com os tratamentos controle de ambos genótipos.

A atividade das enzimas antioxidantes CAT e APX e teor de flavonoides totais foi modulada diferencialmente para os dois genótipos de tomate. A atividade da enzima CAT no tomate cv. micro-tom diminuiu e no mutante dgt aumentou na interação com o isolado PI3 e a enzima APX diminuiu no cv. micro-tom e no mutante dgt não houve diferença significativa, comparado ao tratamento controle. O teor de FLAV totais nas folhas diminuiu no cv. micro-tom e no mutante dgt não houve diferença significativa, comparado com o tratamento controle na interação com PI3. Nas raízes a interação com PI3 não houve diferença significativa no teor de FLAV no cv. micro-tom e no mutante dgt aumentou em comparação aos tratamentos controle.

O isolado PI3 reduziu os níveis de MDA no cv. micro-tom e não apresentou diferenças significativas no mutante dgt comparado ao tratamento controle, nas condições de ambiente de crescimento das plantas.

4.4. Análise de componentes principais (ACP)

Os parâmetros bioquímicos das plantas de tomate cv. micro-tom e mutante dgt foram analisados em conjunto com os tratamentos controle (T1-M e T3-dgt) e na interação com o isolado PI3 (T2-M+PI3 e T4-dgt+PI3).

De acordo com a ACP, os primeiros três componentes explicados foram superiores ao autovalor 1, considerando o critério ou teste de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), indica a proporção da variância dos dados que pode ser considerada comum a todas as variáveis. Esses três componentes explicaram 100% da variância total (1,00), enquanto o CP1 representa aproximadamente 55,4% (0,554) e o CP2 33,9% (0,339) da variação, acumulando 89,3% (0,893) da variância total dos dados (Tabela 3).

Tabela 3. Pontuações dos CP para as características bioquímicas analisadas dos genótipos de tomates cv. micro-tom e mutante dgt.

Matrix de correlação da autoanálise													
	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12	CP13
Autovalores	7,201	4,4111	1,388	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Proporção	0,554	0,339	0,107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acumulado	0,554	0,893	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Variáveis	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5	CP6	CP7	CP8	CP9	CP10	CP11	CP12	CP13
MDA	-0,188	0,39	-0,23	0,197	0,327	0,007	-0,407	-0,327	0,476	0,061	0,228	0,215	0,112
H₂O₂	0,242	-0,361	-0,054	-0,119	-0,054	-0,053	0,287	-0,216	0,245	0,641	0,158	0,129	0,383
SOD	-0,372	-0,01	-0,054	-0,495	0,081	0,342	-0,062	-0,439	-0,35	0,005	-0,316	0,167	0,21
CAT	-0,289	-0,269	-0,239	0,082	0,025	-0,006	0,438	-0,22	0,081	-0,528	0,409	-0,21	0,206
APX	-0,347	0,036	-0,304	0,336	-0,424	0,069	0,037	-0,259	-0,123	0,403	-0,025	-0,292	-0,397
PROT	0,369	0,039	-0,098	0,051	-0,025	-0,618	0,002	-0,551	-0,275	-0,177	-0,109	0,167	-0,133
AST	0,007	-0,462	-0,207	-0,017	-0,364	-0,121	-0,648	0,058	0,118	-0,165	-0,138	-0,165	0,291
FLAV F	-0,353	-0,055	-0,257	-0,116	0,429	-0,508	-0,074	0,341	-0,339	0,271	0,117	-0,132	0,096
FLAV R	0,194	0,062	-0,717	0,12	0,082	0,131	0,255	0,24	0,094	-0,086	-0,477	0,189	0,063
AIA F	-0,229	0,374	-0,078	-0,455	-0,556	-0,324	0,144	0,183	0,232	-0,052	0,099	0,243	0,032
AIA R	0,327	0,2	-0,199	-0,507	0,142	0,053	-0,038	-0,119	0,188	0,019	0,036	-0,676	-0,155
GA F	0,036	0,466	0,155	0,295	-0,141	-0,06	0,089	-0,026	-0,173	0,034	-0,182	-0,357	0,669
GA R	0,325	0,16	-0,299	-0,03	-0,173	0,303	-0,182	0,099	-0,487	0,014	0,582	0,17	0,094

Considerando o impacto das características testadas nos principais componentes, o efeito com maiores cargas positiva no CP1 ($>0,194$) foi observado para concentração de H_2O_2 , teor de PROT e FLAV na raiz e concentração de AIA e GA_3 na raiz; e os efeitos com maiores cargas negativa ($> -0,188$) para concentração de MDA, atividade da enzima SOD, CAT e APX, teor de FLAV na folha e concentração de AIA na folha (Tabela 3, Gráfico 12).

No CP2, o efeito com maior carga positiva ($>0,374$) foi observado para a concentração de MDA, AIA e GA_3 na folha (Tabela 3, Gráfico 12). Maior carga negativa ($> -0,269$) no CP2 foi observado para concentração de H_2O_2 , atividade da enzima CAT e teor de AST na folha (Tabela 3, Gráfico 12). Como essas características afetaram principalmente os dois primeiros componentes, essas também afetaram a distribuição dos tratamentos.

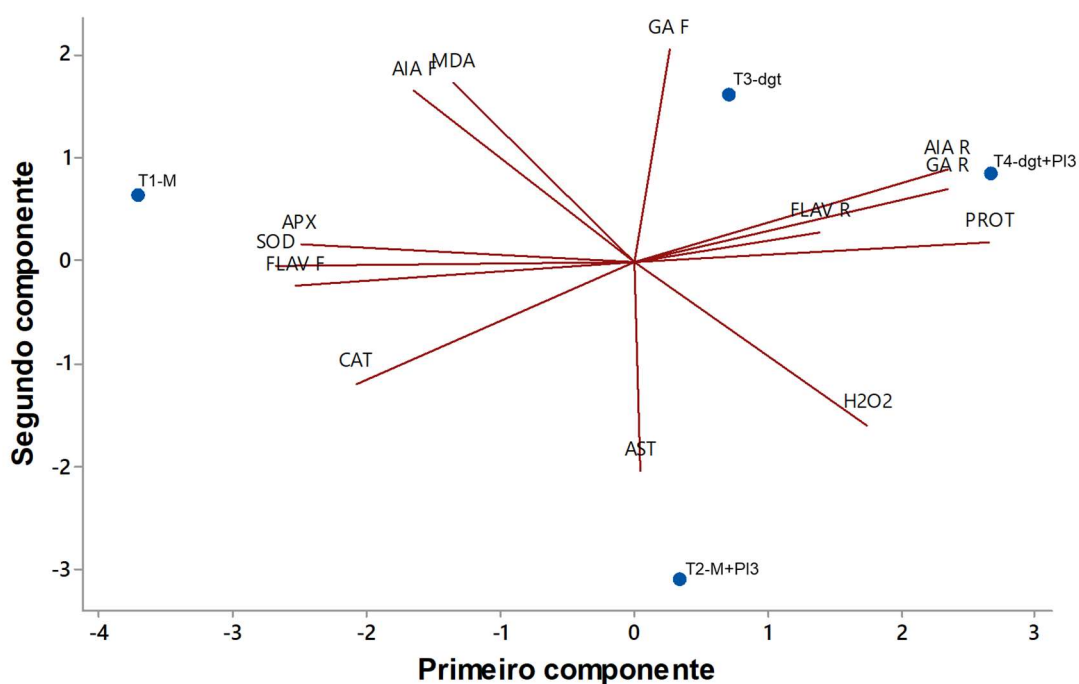


Gráfico 12. Estrutura e carga dos autovetores para todas as características bioquímicas analisadas dos genótipos de tomate cv. micro-tom e mutante dgt.

Os tratamentos T3-dgt e T4-dgt+PI3 formaram um grupo que compartilham positivamente das mesmas propriedades com maiores efeitos positivos no CP1 e CP2 (Gráfico 13). O tratamento T2-M+PI3 foi posicionado isoladamente, apresentando efeitos positivos no CP1 e negativos no CP2

(Gráfico 13). O tratamento T1-M foi posicionado isoladamente com maior efeito negativo no CP1 e menor efeito positivo no CP2 (Gráfico 13).

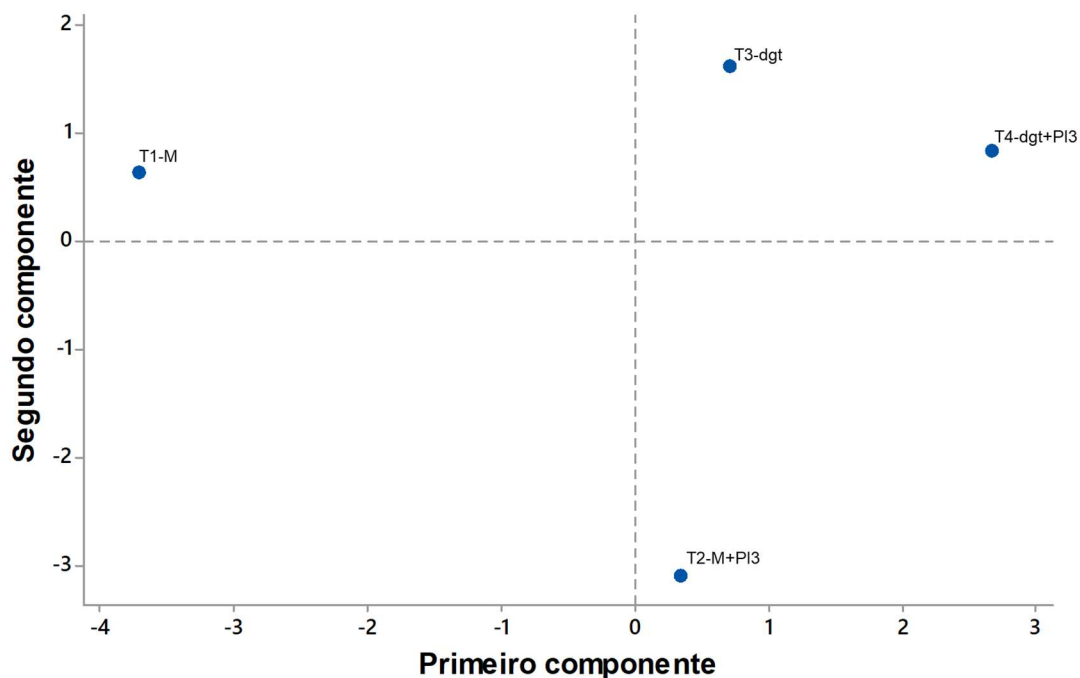


Gráfico 13. Agrupamento dos tratamentos nos genótipos de tomate cv. microtom e mutante dgt e efeitos positivos e negativos no CP1 e CP2.

A correlação de Pearson entre as variáveis bioquímica apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) para 51 interações, sendo dividida em três grupos: maiores coeficientes de correlação acima de 70% ($> 0,7$), média correlação entre 50 e 69% (0,5 a 0,69) e menor correlação abaixo de 50% ($< 0,5$) (Tabela 4).

Tabela 4. Correlações de Pearson entre as variáveis bioquímicas dos tomates cv. micro-tom e mutante dgt.

	H2O2	SOD	CAT	APX	PROT	AST	FLAV F	FLAV R	AIA F	AIA R	GA F	GA R
MDA	-0,8870*	0,4850*	0,0210	0,5230*	-0,4160*	-0,4140*	0,3970*	0,0702	0,9180*	-0,0368	0,6610*	-0,0665
H2O2	-	-0,5850*	-0,0546	-0,5390*	0,5560*	0,4620*	-0,4860*	0,2950	-0,9740*	0,2610	-0,6720*	0,3320*
SOD	-	-	0,8030*	0,8630*	-0,9630*	0,1020	0,8020*	-0,4310*	0,5330*	-0,7940*	-0,1230	-0,7850*
CAT	-	-	-	0,7250*	-0,7750*	0,4190*	0,7960*	-0,2250	0,0455	-0,8150*	-0,6500*	-0,7360*
APX	-	-	-	-	-0,8140*	0,1290	0,7510*	-0,1490	0,5290*	-0,5740*	-0,0664	-0,5520*
PROT	-	-	-	-	-	-0,0796	-0,7680*	0,5800*	-0,4750*	0,8670*	0,1570	0,8700*
AST	-	-	-	-	-	-	0,1040	0,1310	-0,4720*	-0,2240	-0,6000*	-0,1280
FLAV F	-	-	-	-	-	-	-	-0,2180	0,5100*	-0,7800*	-0,2400	-0,7370*
FLAV R	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,1390	0,6830*	0,0240	0,7690*
AIA F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,1820	0,6800*	-0,2370
AIA R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4490	0,9860*
GA F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3440*
GA R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Valores de coeficiente de correlação em verde (>0,7); azul (entre 0,5 e 0,69) e vermelho (<0,5). Valores com asterisco* são significativos estatisticamente ($p < 0,05$);

Considerando os principais efeitos no CP1 (MDA), houve correlação positiva significativa para a atividade da enzima SOD e APX, teor de FLAV na folha e concentração de AIA e GA₃ na folha, indicando que essas variáveis tendem a aumentar em conjunto (Tabela 4). Essas variáveis (SOD, APX, FLAV, AIA e GA₃ na folha) explicam a influência no aumento do MDA no tratamento T1-M em comparação ao T2-M+PI3 (Tabela 4; Gráfico 7, 9, 10, 11; Figura 2).

Por outro lado, os níveis de MDA com a concentração de H₂O₂, teor de PROT e AST na folha apresentaram correlação negativa, indicando que uma variável tende a diminuir enquanto a outra aumenta (Tabela 4). De maneira oposta os principais efeitos no CP2 (H₂O₂) foram observados pela correlação positiva com o teor de PROT e AST nas folhas e GA₃ nas raízes, indicando que esses pares tendem a aumentar em conjunto, mostrando que a modulação dos níveis dessas variáveis pelo isolado PI3 (T2-M+PI3) influenciou significativamente para o aumento da concentração de H₂O₂ e a diminuição da concentração de MDA em comparação ao tratamento controle T1-M (Tabela 4, Gráfico 6, 8, 11; Figura 2).

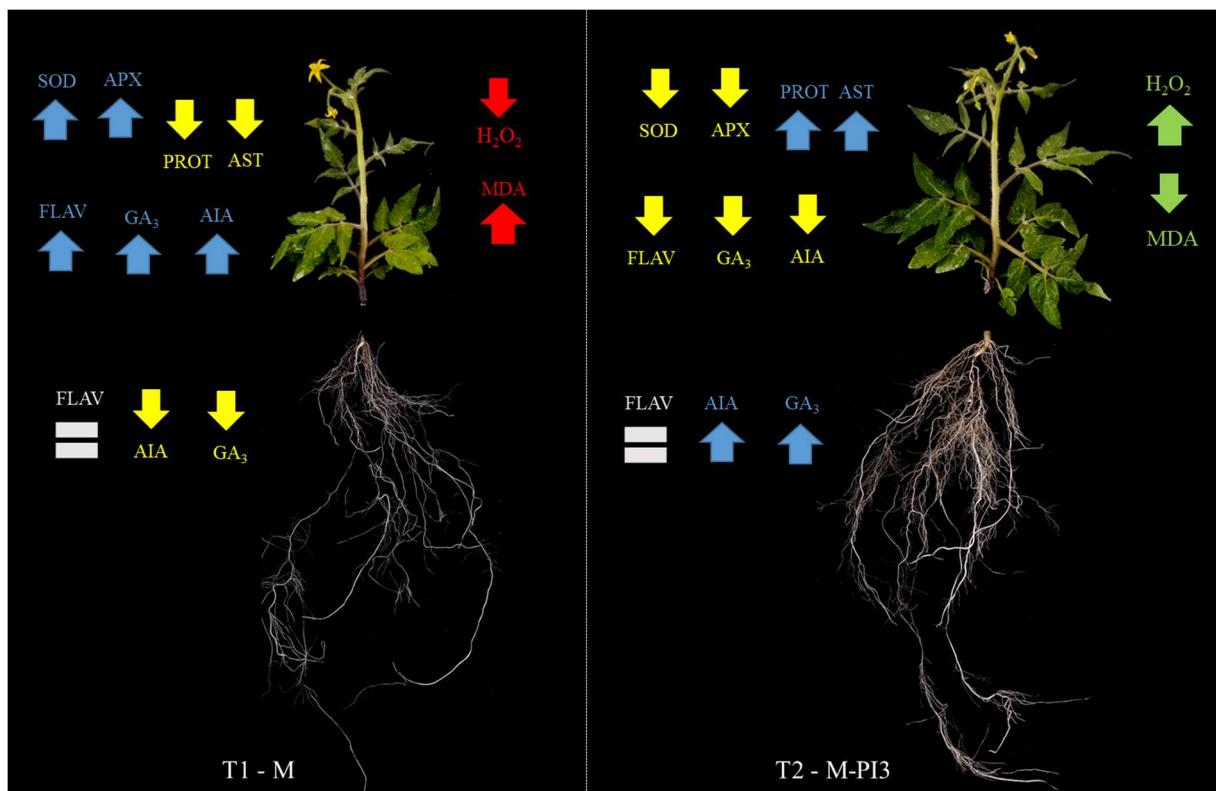


Figura 2. Modulação das variáveis bioquímicas dos componentes principais (PC1 e PC2) na concentração de H₂O₂ e MDA pelo isolado PI3 nativo de *Trichoderma* sp. em

interação tomate cv. micro-tom. Seta de cor vermelha=efeito negativo significativo; verde= efeito positivo significativo; amarelo=valor menor significativo; azul=valor maior significativo; Sinal igual cor cinza=não significativo.

Os mesmos efeitos foram observados no genótipo de tomate mutante dgt, porém não houve diferença na concentração de MDA entre o T3-dgt e T4-dgt+PI3, provavelmente devido a atividade da enzima APX e o teor de FLAV nas folhas, que não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 3).

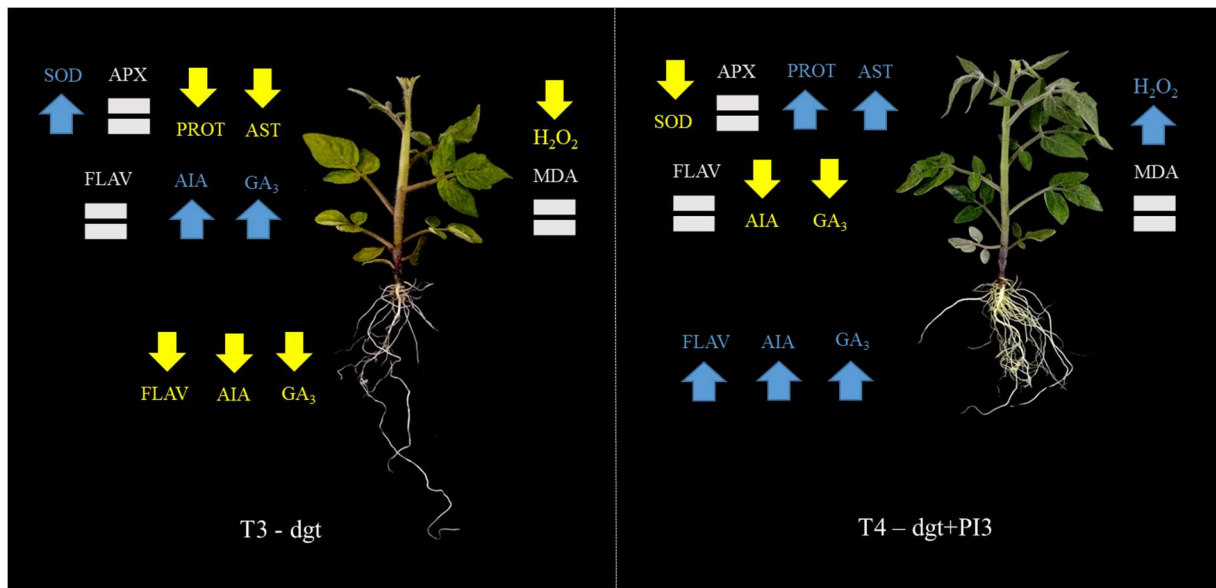


Figura 3. Modulação das variáveis bioquímicas dos componentes principais (PC1 e PC2) na concentração de H_2O_2 e MDA pelo isolado PI3 nativo de *Trichoderma* sp. em interação com tomate mutante dgt. Sinal igual cor cinza=não significativo; seta de cor amarelo=valor menor significativo; azul=valor maior significativo.

Como dito anteriormente, foi observado maior desenvolvimento de raízes adventícias e secundárias nos tratamentos com o isolado PI3 (T2-M+PI3 e T4-dgt+PI3) em comparação com os tratamentos controle T1-M e T2-dgt; e de acordo com ACP houve correlação significativa dos níveis de FLAV, AIA e GA_3 nas raízes do cv. micro-tom e AIA e GA_3 nas raízes do mutante dgt (Figura 2 e 3). Essa relação e modulação principalmente de AIA e GA_3 nas raízes pelo isolado PI3 de ambos genótipos pode ter influenciado no maior desenvolvimento das raízes adventícias e pelos radiculares.

4.5 Discussão dos resultados

Os efeitos na promoção do crescimento dos genótipos de tomate micro-tom e mutante dgt pelo isolado PI3 foram neutros e não apresentaram aumento ou redução nos parâmetros de crescimento. Sandri et al (2024), investigou a promoção de crescimento em tomates cv micro-tom pela inoculação de sete isolados de *Trichoderma* spp. (os autores não avaliaram a capacidade de produção de AIA por esses isolados) via sementes e no solo, revelando resultados muito contrastantes. A inoculação dos isolados de *Trichoderma* via sementes não apresentaram diferenças na taxa de germinação das sementes de tomate micro-tom em comparação ao tratamento controle. No entanto, quando inoculados via solo, três isolados apresentaram efeitos negativos e um isolado apresentou efeitos positivos na massa seca da parte aérea e raízes do tomate micro-tom (Sandri et al., 2024).

Tucci et al (2011), observaram que *T. atroviride* e *T. harzianum* (os autores também não avaliaram a capacidade de produção de AIA por esses isolados) modificou a arquitetura radicular de genótipos de tomateiro de forma diferencial e na maioria dos casos o comprimento da raiz não foi afetado, porém o desenvolvimento das raízes laterais foram estimulados.

Contreras-Cornejo et al (2009), avaliaram os efeitos da inoculação de *T. Virens* (isolado com alta capacidade de produção de AIA) no crescimento de plântulas selvagens de *Arabidopsis* e mutantes DR5:uidA, defeituosos no transporte de auxina (aux1-7, doc1 e eir1) ou resposta de auxina (axr1-3). Todos os quatro mutantes mostraram diminuição ou respostas neutras/nulas na promoção do crescimento por *T. virens*. No entanto, os autores demonstraram que a inoculação de *T. virens* aumentou a expressão do gene GUS regulador de AIA nos mutantes de *Arabidopsis*, que acumularam AIA e derivados nas pontas das raízes, aumentando a proliferação celular e a formação de raízes laterais.

A influência da inoculação com *Trichoderma* spp. na arquitetura radicular foi investigado em meio de cultura por Nieto-Jacobo et al (2017) e observaram que na ausência de *Trichoderma* spp., plântulas de *Arabidopsis* produziram longas raízes primárias com poucas raízes secundárias e, conseqüentemente, exibiam baixa densidade radicular; e quando as placas foram inoculadas com *Trichoderma* spp. o

comprimento da raiz primária diminuiu de 13 a 25% e o número de raízes secundárias aumentou de 64 a 90%.

Em nossos resultados com o isolado PI3, não quantificamos o número de raízes laterais dos genótipos micro-tom e dgt, porém é notório as diferenças fenótípicas na maior quantidade de raízes adventícias e secundárias dos tratamentos T2-M+PI3 e T4-dgt+PI3 em comparação aos tratamentos controle T1-M e T2-dgt (Figura 1, 2 e 3).

Considerando que o genótipo dgt possui características de ausência de ramificação lateral de raízes primárias e adventícias (Coenen e Lomax 1998), o isolado PI3 pode promover o crescimento de raízes laterais, modificando a arquitetura radicular, sem necessariamente promover o crescimento das plantas. As diferenças de crescimento de raízes laterais e secundárias observadas na interação com o isolado PI3, podem ser relacionadas com a modulação dos níveis de FLAV, AIA e GA₃ na regulação do sistema radicular das plantas.

Os flavonoides se acumulam nas regiões de emergência das raízes laterais e ao longo das próprias raízes laterais em padrões semelhantes aos indicados pelos genes repórteres de auxina, incluindo DR5 (Peer e Murph., 2007).

Brown et al (2001) investigou a aplicação de auxina exógena em genótipos de *Arabidopsis* tipo-selvagem e mutante tt4 (2YY6) deficiente na biossíntese flavonoides e observaram que o mutante tt4 apresentou aumento no número de raízes laterais em comparação ao tipo selvagem, e que as alterações nas raízes das plantas seria um efeito indireto do aumento transporte de auxina derivada da parte aérea. Sukumar et al (2013), sugere a existência de múltiplos níveis de regulamentação envolvendo hormônios, metabólitos e outras biomoléculas durante as interações planta-microrganismos.

As auxinas também promovem a síntese de flavonoides nas zonas laterais de formação de raízes, regulando positivamente biossíntese de flavonoides, limitando sua ação na formação do sistema radicular e protegendo a raiz do acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) como H₂O₂, promovendo o surgimento de raízes laterais (Kurepa et al., 2023; Chapman e Muday, 2021; Lewis et al., 2011).

A interação de giberelina com a auxina afeta a biossíntese e a sinalização de GA nas plantas (Weiss e Ori, 2017). Tan et al (2019), sugere que GA promove o crescimento das raízes, relacionado ao aumento do conteúdo de AIA e redução da

síntese de flavonoides, que inibem transporte polar de auxina (Tan et al., 2019). A sinalização de GA nas raízes pela auxina, também afeta a produção de GA na parte aérea da planta, regulando positivamente a expressão de genes biossintéticos de GA (Nemhauser et al., 2006).

Nesse contexto, quando analisamos as alterações nas concentrações de GA e AIA nos tratamentos dos genótipos micro-tom e dgt, em interação *Trichoderma*-PI3, nós observamos que os níveis de AIA e GA nas folhas dos tratamentos M-PI3 e dgt-PI3 diminuíram, em concentrações proporcionais, bem como, também aumentaram os níveis nas raízes dos genótipos de tomate.

Historicamente, foi aceito que os GAs eram promotores do crescimento radicular (Castro-Camba et al., 2022). Portanto, o maior desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares observados nos resultados com a inoculação do isolado *Trichoderma*-PI3, poderíamos sugerir que a regulação do balanço de GA nos tratamentos M-PI3 e dgt-PI3 juntamente com o aumento de AIA nas raízes, indica a participação da giberelina na formação e maior desenvolvimento das raízes laterais.

Entretanto, no caso das raízes laterais, os estudos relacionados a esse processo são um tanto contraditórios (Castro-Camba et al., 2022). Em árvores de Álamo (*Populus* sp.), a adição de GA promoveu a formação de raízes laterais (Pizarro e Díaz-Sala, 2020) e por outro lado, estudos em arroz revelaram que a adição de GA₃ exógeno reduz o número de raízes laterais (Lo et al., 2008). Portanto, o GA parece desempenhar um papel positivo no crescimento radicular e um papel inibitório na desenvolvimento de raízes adventícias, embora o efeito possa ser específico da espécie (Castro-Camba et al., 2022).

Quanto a modulação dos níveis de H₂O₂, os tratamentos T2=M+PI3 e T4-dgt+PI3 aumentaram a concentração em comparação aos tratamentos controle de ambos genótipos. Estudos mostram que a aplicação exógena de auxina aumenta H₂O₂ nas plantas causando danos oxidativos nas plantas (Peer et al., 2013) e por outro lado, a auxina exógena reduziu o acúmulo de H₂O₂ nas raízes de tomate através de alterações expressão e atividade de enzimas CAT, SOD e peroxidases (Tyburski et al., 2009).

A interação do isolado PI3 com o genótipo de tomate cv. Micro-tom modulou significativamente os níveis de CAT, SOD e APX e de maneira oposta aumentou o acúmulo de H₂O₂ as folhas das plantas (Figura 2).

Um mutante de *Arabidopsis* deficiente em catalase (*cat2*) reduziu a atividade da CAT e aumentou os níveis de H₂O₂ com a redução da concentração de auxina nas folhas sob condições fotorrespiratórias (Gao et al., 2013). Esse efeito foi observado no T2-M-PI3 em comparação ao controle T1-M (Gráfico 6, 7 e 10). O Aumento de H₂O₂ também foi correlacionado com transcrição reduzida da catalase-3 no tipo selvagem de *Arabidopsis*, isso pode ser atribuído ao transporte reduzido de auxina e acúmulo nas raízes de *aux1* mutante e sua incapacidade de induzir sinalização de H₂O₂ (Krishnamurthy e Rathinasabapathi, 2013a).

O AIA pode ser o elo de ligação que regula o nível de EROs direcionando seu papel no dano oxidativo ou sinalização nas plantas sob estresse (Krishnamurthy e Rathinasabapathi, 2013b).

A observação de que uma ampla gama de estressores abióticos ativa a biossíntese de flavonóides quando as plantas sofrem excesso de energia radiante, sugerindo que a mudança da homeostase celular nas EROs é um dos principais impulsionadores da biossíntese de flavonóides (Taylor e Grotewold, 2005). Por sua vez, os flavonóides com eficácia potencial antioxidante (ou seja, eles são sequestradores de ROS em níveis muito baixos concentrações), podem atuar como amortecedores dos níveis de EROS e aumentam a resistência ao estresse (Asensi-Fabado e Munné-Bosch, 2010). A capacidade dos flavonóides de modular EROs, bem como a sinalização de fitohormônios, em especial AIA, pode ajudar a explicar seu envolvimento nas respostas morfogênicas induzidas pelo estresse, uma resposta geral das plantas “escaparem” de condições ambientais adversas (Brunetti et al., 2018).

A interação do genótipo cv. micro-tom com o isolado PI3 alterou os níveis de FLAV, AIA e GA₃ nas folhas das plantas e apresentaram correlação com a modulação dos níveis de H₂O₂ (Tabela 4, Figura 2) e de acordo com o ACP, os tratamentos T2-M+PI3 e T4-dgt+PI3 se apresentaram maiores efeitos positivos no CP1 nessas variáveis, nas quais contribuíram com o menor efeito no MDA (CP2), tendendo a

diminuição dos danos causados pelo estresse oxidativo na parte aérea das folhas dos genótipos de tomate cv. micro-tom e dgt (Gráfico 12 e 13).

4.6 Conclusão

O isolado PI3 nativo de *Trichoderma* sp. foi capaz de alterar positivamente o balanço hormonal e antioxidante das plantas de tomate cv. micro-tom e mutante dgt, modulando os níveis de AIA, GA3 e FLAV entre parte aérea e raízes das plantas e também a modulação da atividades de SOD, CAT e APX e aumento dos níveis de H₂O₂, PROT e AST nas folhas melhorando a adaptação dos genótipos de micro-tomateiro no ambiente de crescimento.

4.7 Referências

Alexieva, V.; Sergiev, I.; Mapelli, S.; Karanov, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell & Environment**, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, 2001.

Asensi-Fabado, M. A.; Munné-Bosch, S. Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function. **Trends Plant Science**, v. 15, p. 582–592, 2010. Doi: 10.1016/j.tplants.2010.07.003

Azevedo, R. A.; Alas, R. M.; Smith, R. J.; Lea, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, n. 2, p. 280-292, 1998.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Brown, D. E., Rashotte, A. M., Murphy, A. S., Normanly, J., Tague, B. W., Peer, W. A., et al. Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 126, p. 524–535, 2001. Doi: 10.1104/pp.126.2.524

Brunetti, C.; Fini, A.; Sebastiani, F.; Gori, A.; Tattini, M. Modulation of Phytohormone Signaling: A Primary Function of Flavonoids in Plant-Environment Interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9 p. 1042, 2018. Doi: 10.3389/fpls.2018.01042

Carvalho, R. F.; et al. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. **Plant Methods**, v. 7, p. 18, 2011.

Castro-Camba, R.; Sánchez, C.; Vidal, N.; Vielba, J.M. Plant Development and Crop Yield: The Role of Gibberellins. **Plants**, v. 11, p. 2650, 2022. Doi.org/10.3390/plants11192650

Chapman, J. M.; Muday, G. K. Flavonols modulate lateral root emergence by scavenging reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. **Journal Biology Chemistry**, p. 296, 2021.

Christian, M.; Luthen, H. New methods to analyse auxin-induced growth I: Classical auxinology goes *Arabidopsis*. **Plant Growth Regulation**, v. 32, p. 107-114, 2000.

Coenen, C; Lomax, T.L. The diageotropica gene differentially affects auxin and cytokinin responses throughout development in tomato. **Plant Physiology**, v. 117, p.63-72, 1998.

Contreras-Cornejo, H.; Macías-Rodríguez, L.; Cortés-Penagos, C.; López-Bucio, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, p. 1579-1593, 2009. Doi: 10.1104/pp.108.130369

Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.T.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

Eriksson, S. et al. GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and *Arabidopsis* floral initiation. **Plant Cell**, v. 18, p. 2172-2181, 2006.

Gao, X.; Yuan, H.-M.; Hu, Y.-Q.; Li, J.; Lu, Y.-T. The auxin content changes in cat2. **Plant Cell Environment**, v. 37, p. 175-188, 2014. Doi.org/10.1111/pce.12144

Giannopolitis, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

Gordon, S.A.; Weber, R.P. Colorimetric Estimation of Indoleacetic Acid. **Plant Physiology**, p. 192-195, 1951. Doi: 10.1104/pp.26.1.192

Graham, H. D.; Thomas, L. B. Rapid, simple colorimetric method for the determination of micro quantities of gibberellic acid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 44-48, 1961.

Heath, R. L.; Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

Jaroszuk-Scisel, J. Tyskiewicz, R.; Nowak, A.; Ozimek, E.; Majewska, M.; Hanaka, A.; et al. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with these strain conidia. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, 2019.

Kelly, M.O.; Bradford, K.J. Insensitivity of the diageotropica tomato mutant to auxin. **Plant Physiology**, v.82, p.713-717, 1986.

Krishnamurthy, A.; Rathinasabapathi, B. Auxin and its transport play a role in plant tolerance to arsenite-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, p. 1838–1849, 2013a. Doi.org/10.1111/pce.12093

Krishnamurthy, A.; Rathinasabapathi, B. Oxidative stress tolerance in plants: Novel interplay between auxin and reactive oxygen species signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 8, 2013b. Doi.org/10.4161/psb.25761

Kurepa, J.; Shull, T.E.; Smalle, J.A. Friends in Arms: Flavonoids and the Auxin/Cytokinin Balance in Terrestrialization. **Plants**, v. 12, p. 517, 2023. Doi.org/10.3390/plants12030517

Lewis, D. R.; Ramirez, M. V.; Miller, N. D.; Vallabhaneni, P.; Ray, W. K.; Helm, R. F.; et al. Auxin and ethylene induce flavonol accumulation through distinct transcriptional networks. **Plant Physiology**, v. 156, p. 144-164, 2011. Doi: 10.1104/pp. 111.172502

Lo, S.F.; Yang, S.Y.; Chen, K.T.; Hsing, Y.I.; Zeevaart, J.A.D.; Chen, L.J.; Yu, S.M. A novel class of gibberellin 2-oxidases control semidwarfism, tillering, and root development in rice. **Plant Cell**, v. 20, p. 2603-2618, 2018.

Moldes, C. A.; Medici, L. O.; Abrahão, O. S.; Tsai, S. M.; Azevedo, R. A. Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 469–479, 2008.

Nebenfuhr, A.; White, T.J.; Lomax, T.L. The diageotropica mutation alters auxin inducing of subset of the Aux/IAA gene family in tomato. **Plant Molecular Biology**, v.44, p.73-84, 2000.

Nemhauser, J.L.; Hong, F.X.; Chory, J. Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. **Cell**, v. 126, p. 467-475, 2006.

Nieto-Jacobo, M.; Steyaert, J.; Salazar-Badillo, F.; Vi Nguyen, D.; Rostás, M.; Braitwaite, M; De Souza, J.; Jimenez-Bremont, J.; Ohkura, M.; Stewart, A.; Mendoza-Mendoza, A. Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. **Frontiers in Plant Science**, pp. 1-18, 2017. Doi: 10.3389/fpls.2017.00102

Peer, W. A.; Murphy, A. S. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? **Trends Plant Science**. v. 12, p. 556-563, 2007. Doi: 10.1016/j.tplants.2007.10.003

Pizarro, A.; Díaz-Sala, C. Effect of polar auxin transport and gibberellins on xylem formation in pine cuttings under adventitious rooting conditions. **Plant Science**, 67, 27-39, 2020.

Sandri, M. R.; Cavião, H. C.; Oliveira, C. F.; Andrade, L. B.; Granada, C; Schwambach, J. The plant growth effect and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. inoculation in tomatoes are dependent of the inoculation way. **Bragantia**, v. 83, 2024. Doi.org/10.1590/1678-4499.20230075

Sukumar, P.; Legué, V.; Vayssières, A.; Martin, F.; Tuskan, G.A.; Kalluri, U.C. Involvement of auxin pathways in modulating root architecture during beneficial plant-microorganism interactions. **Plant, Cell and Environment**, v. 36, p. 909-919, 2013.

Tan, H.; Man, C.; Xie, Y.; Yan, J.; Chu, J.; Huang, J. A crucial role of GA-regulated flavonol biosynthesis in root growth of *Arabidopsis*. **Molecular Plant**, v. 12, p. 521-537, 2019.

Taylor, L. P.; Grotewold, E. Flavonoids as developmental regulators. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 317–323, 2005. Doi: 10.1016/j.pbi.2005.03.005

Tucci, M.; Ruocco, M.; De Masi, L.; De Palma, M.; Lorito, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, p. 341-354, 2011.

Tyburski, J.; Dunajska, K.; Mazurek, P.; Piotrowska, B.; Tretyn, A. Exogenous auxin regulates H₂O₂ metabolism in roots of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedlings affecting the expression and activity of CuZn-superoxide dismutase, catalase, and peroxidase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p. 249–260, 2009. Doi.org/10.1007/s11738-008-0225-8

Wang, L.; Chen, M.; Lam, P.-Y.; Dini-Andreote, F.; Dai, L.; Wei, Z. Multifaceted roles of flavonoids mediating plant-microbe interactions. **Microbiome**, v. 10, p. 233, 2022.

Weiss, D.; Ori, N. Mechanisms of Cross Talk between Gibberellin and Other Hormones. **Plant Physiology**, v. 144, pp. 1240-1246, jul, 2007.

Yao, X.; Zhu, L.; Chen, Y.; Tian, J.; Wang, Y. In vivo and in vitro antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1-4, p. 59-66, 2013.