

HELBERT ROCHA REIS

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS PROMOTORES DE  
CRESCIMENTO DA RIZOSFERA DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R375i  
2018 Reis, Helbert Rocha, 1989-  
Isolamento e caracterização de fungos promotores de crescimento da rizosfera de eucalipto / Helbert Rocha Reis. - Viçosa, MG, 2018. viii, 64f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Eucalipto - Crescimento. 2. Micro-organismos do solos. 3. Rizosfera. 4. Fungos. 5. Eucalipto - Mudas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

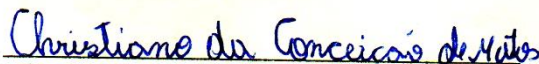
CDD 22. ed. 634.973766

HELBERT ROCHA REIS

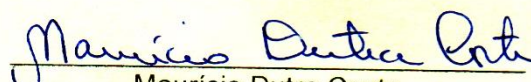
**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS PROMOTORES DE  
CRESCIMENTO DA RIZOSFERA DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de julho de 2018.

  
Christiano da Conceição de Matos

  
Gilberto de Oliveira Mendes

  
Maurício Dutra Costa  
(Orientador)

Dedico aos meus pais, por todo apoio e por sempre oferecerem os meios para que eu alcance meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Microbiologia e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar o mestrado e por oferecer inúmeros meios para meu crescimento acadêmico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Ao professor Maurício, por todo incentivo, pela orientação e por compartilhar generosamente seus conhecimentos.

Aos professores Olinto Liparini Pereira e Ivo Ribeiro Silva, pelas contribuições.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, por todo o auxílio e pelos ensinamentos durante todo o período do mestrado.

Aos membros do Laboratório de Ecologia Microbiana, não apenas pelas contribuições no desenvolvimento desse trabalho, mas por tornarem todo o processo mais leve e divertido.

Aos membros de outros laboratórios, pela amizade e auxílio.

À minha família, pelo incentivo constante e pelo suporte. Em especial, à minha mãe, por sempre me colocar à frente e me apoiar incondicionalmente.

Aos meus amigos de Viçosa, por tornarem todo o período do mestrado muito mais prazeroso e equilibrado. Gratidão também aos velhos amigos, pelos reencontros e pela constante presença, mesmo que a certa distância.

## **BIOGRAFIA**

Helbert Rocha Reis, filho de Vicente Ribeiro dos Reis e Norma Ferreira da Rocha Reis, nasceu no dia 26 de setembro de 1989 na cidade de Congonhas, Minas Gerais. Iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de São João Del Rei em 2010, graduando-se nas modalidades de bacharel e licenciado em 2015. Durante o período da graduação, entre os anos de 2013 e 2014, realizou intercâmbio na University of Wollongong na Austrália.

Em agosto de 2016, iniciou o mestrado em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa.

## RESUMO

REIS, Helbert Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **Isolamento e caracterização de fungos promotores de crescimento da rizosfera de eucalipto.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Ivo Ribeiro Silva e Olinto Liparini Pereira.

O uso excessivo de fertilizantes causa grandes impactos econômicos e ambientais, tornando necessária a elaboração de métodos de cultivo sustentáveis. Para tal, os microrganismos promotores de crescimento e, especial, os fungos revelam-se como promissora ferramenta biotecnológica, por participarem de processos importantes no solo. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar fungos com potencial de promoção de crescimento da rizosfera de eucalipto. As amostras de solo rizosféricos foram coletadas das raízes de *Eucalyptus grandis* no setor de Silvicultura do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil. O isolamento resultou na obtenção de 62 isolados fúngicos de interesse, diferenciados pelas características morfológicas das colônias. Os isolados foram testados quanto seu potencial de promoção de crescimento *in vitro* de *Eucalyptus grandis* e os mais promissores tiveram seus mecanismos de promoção testados. O teste de promoção de crescimento *in vitro* evidenciou o potencial de promoção de crescimento dos isolados testados, apresentando incremento de matéria seca total das plantas de 20 a 620%. Os isolados selecionados produziram ácido indol acético e giberelinas em proporções que variaram de 0,96 a 64,33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Quanto à solubilização de fosfato, apenas um dos isolados foi capaz de solubilizar os diferentes tipos de fosfato utilizados. Todos os isolados produziram sideróforos do tipo hidroxamato, no intervalo entre 15 e 56,67  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . No teste de compostos voláteis, apenas efeitos inibitórios ao desenvolvimento das plantas foram estatisticamente significativos. Portanto, os isolados demonstraram potencial de promoção de crescimento em diferentes níveis e por mecanismos distintos, possibilitando a exploração desses potenciais para o desenvolvimento de tecnologias aplicáveis no cultivo de eucalipto.

## ABSTRACT

REIS, Helbert Rocha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **Isolation and characterization of promoting growth fungi from eucalyptus rhizosphere.** Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: Ivo Ribeiro Silva and Olinto Liparini Pereira.

The excessive use of fertilizers causes great economic and environmental impacts, making sustainable cultivation methods necessary. To this end, growth-promoting microorganisms, and especially fungi, are a promising biotechnological tool, since these microbes participate in important soil processes. The objective of this work was to isolate and characterize rhizosphere fungi with potential to promote the growth of eucalyptus. The rhizosphere soil samples were collected from *Eucalyptus grandis* roots at the Sylviculture sector of the Departamento de Engenharia Florestal of the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil. Isolation allowed obtaining 62 fungal isolates, differentiated by the morphological characteristics of the colonies. The isolates were tested for their potential to promote *in vitro* growth of *E. grandis* and the most promising had their promotion mechanisms tested. The *in vitro* growth promotion test evidenced the potential for growth promotion of the tested isolates, showing a total dry matter increment of the plants of 20 to 620%. The selected isolates produced indole acetic acid and gibberellins in proportions ranging from 0.96 to 64.33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As for phosphate solubilization, only one of the isolates was able to solubilize the different types of phosphate used. All the isolates produced siderophores of the hydroxamate type, ranging from 15 to 56.67  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In the test of volatile compounds, only inhibitory effects to the development of the plants were statistically significant. The isolates demonstrated the potential of promoting growth at different levels by different mechanisms, allowing the exploration of this potential for the development of technologies applicable to eucalyptus cultivation.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1 : REVISÃO DE LITERATURA .....	3
1. Cultivo de eucalipto .....	4
2. Microbiota do solo.....	4
3. Mecanismos de promoção de crescimento .....	5
3.1. Fito-hormônios .....	6
3.1.1. Ácido indol acético .....	6
3.1.2. Giberelinas .....	7
3.1.3. Etileno .....	8
3.2. Solubilização de fosfato.....	9
3.3. Sideróforos .....	12
3.4. Compostos Orgânicos Voláteis .....	14
4. Resistência Sistêmica Induzida associada à PGPF .....	16
5. Efeitos da promoção de crescimento vegetal .....	17
6. Promoção de crescimento em eucalipto .....	20
7. Mecanismos regulatórios da promoção de crescimento vegetal .....	22
8. Assimilação de Nitrogênio .....	24
REFERÊNCIAS .....	26

CAPÍTULO 2: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT GROWTH PROMOTING FUNGI FROM EUCALYPTUS RHIZOSPHERE ..	36
ABSTRACT .....	37
INTRODUCTION .....	38
MATERIALS AND METHODS.....	39
Isolation of PGPF from eucalyptus rhizosphere .....	39

Plant growth promotion activity of rhizospheric fungal isolates.....	41
Plant growth promotion mechanisms expressed by PGPF <i>in vitro</i> .....	42
RESULTS .....	44
Isolation of PGPF from eucalyptus rhizosphere .....	44
Plant growth promotion activity of rhizospheric fungal isolates.....	44
Plant growth promotion mechanisms expressed by PGPF <i>in vitro</i> .....	45
Indole acetic acid production.....	45
Gibberellin production .....	49
Phosphate solubilization .....	49
Siderophore production.....	52
Production of volatile organic compounds.....	52
DISCUSSION .....	56
CONCLUSIONS .....	59
REFERENCES .....	60

## INTRODUÇÃO GERAL

O plantio de árvores no Brasil ultrapassa a marca de 7,84 milhões de hectares, sendo constituído majoritariamente por espécies de eucalipto e pinus. Essas duas culturas florestais são usadas para os mais diversos fins, a exemplo da produção de celulose, papel, carvão, na siderurgia, na fabricação de painéis de madeira, dentre outros. O plantio de eucalipto representa 5,7 milhões de hectares dessa área plantada, e concentra-se, especialmente, em Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul. No ano de 2016, o plantio de árvores rendeu receita bruta de 71,1 bilhões de reais, dos quais 8,9 bilhões foram gerados pela exportação de produtos madeireiros.

Em função da alta capacidade de adaptação, da diversidade de espécies, da alta produtividade e da possibilidade de uso para diversos fins, o eucalipto é amplamente utilizado em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, representando a maior parcela do plantio florestal do país. As perdas econômicas provocadas por doenças nos plantios de eucalipto são consideráveis e a utilização de fertilizantes é crescente no país, considerando que solos extremamente empobrecidos são utilizados para o cultivo de espécies florestais. Adicionalmente, a maioria dos plantios de eucaliptos são monoculturas, desfavorecendo a estabilidade dos ecossistemas, causando desbalanço de nutrientes no solo e favorecendo o estabelecimento de patógenos e pestes.

O contínuo aumento da população mundial impacta diretamente a demanda por produtos de origem vegetal, e, conseqüentemente, os impactos gerados pelas atividades de exploração desses recursos também aumentam, tornando fundamental a elaboração de novas alternativas para maximizar a produção e utilizar de forma mais eficiente os fertilizantes, com redução dos prejuízos ao ambiente. Considerando que substâncias químicas como pesticidas e fertilizantes são amplamente empregadas na agricultura e que causam prejuízos aos ecossistemas, o emprego de microrganismos promotores de crescimento revela-se como alternativa de grande potencial.

A utilização de microrganismos é promissora por ser opção ecologicamente viável e segura para a solução de problemas recorrentes na agricultura. A exploração das capacidades dos microrganismos do solo em promover crescimento das plantas e suprimir fitopatógenos apresenta grande potencial para o aumento da produção agrícola, particularmente com o emprego de dois principais grupos de microrganismos conhecidos como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) e fungos promotores de crescimento de plantas (FPCP).

Os FPCP desempenham diversos papéis fundamentais para a fertilidade e estrutura do solo, destacando-se a ciclagem de nutrientes, a decomposição da matéria orgânica e a supressão de doenças em plantas. Esses fungos são capazes de beneficiar as plantas por diversos mecanismos, caracterizados como mecanismos diretos ou indiretos. Os mecanismos diretos incluem a solubilização de fosfato e potássio, produção de sideróforos e fito-hormônios. Enquanto os mecanismos indiretos são representados especialmente pela produção de antibióticos, exopolissacarídeos, enzimas hidrolíticas e pela indução da resistência sistêmica da planta. Portanto, o emprego de microrganismos promotores de crescimento torna possível o combate a diversos problemas comumente enfrentados nos plantios, revelando-se como poderosa ferramenta para reduzir o uso de fertilizantes e pesticidas, minimizando os prejuízos causados por doenças e pela necessidade de adubação nos cultivos florestais.

O objetivo desse trabalho foi o de isolar FPCP da rizosfera de eucalipto e caracterizar os mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* desses microrganismos.

O primeiro capítulo dessa dissertação consiste em uma revisão de literatura abordando os mais diversos aspectos sobre os fungos promotores de crescimento, especialmente focada nos principais mecanismos de promoção de crescimento já relatados na literatura. O segundo capítulo apresenta os resultados do isolamento e caracterização dos fungos selecionados como promotores de crescimento para o eucalipto.

## **CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA**

## **1. Cultivo de eucalipto**

Alta adaptabilidade, grande variedade de espécies, altas taxas produtivas e versatilidade de uso, posiciona o eucalipto como uma das principais culturas florestais em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, onde representa a maior parcela do plantio florestal (IBA, 2017).

Atualmente, a área de plantio de eucalipto no Brasil ultrapassa a marca de 5,7 milhões de hectares de um total de 7,84 milhões de hectares de culturas florestais. O cultivo de eucalipto está especialmente concentrado nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul. A madeira proveniente desses plantios é utilizada para a fabricação de diversos produtos, tais como celulose, papel, carvão, painéis de madeira, dentre outros (IBA, 2017).

No ano de 2016, as culturas florestais renderam receita bruta para o país de 71,1 bilhões de reais, dos quais 8,9 bilhões foram gerados pela exportação de produtos madeireiros. Apesar de toda rentabilidade, os cultivos florestais sofrem grandes perdas econômicas decorrentes da instauração de doenças e da deficiência nutricional dos solos utilizados nos plantios (IBA, 2017). Conseqüentemente, aumenta-se a necessidade de uso de pesticidas e fertilizantes, que representam não apenas maiores investimentos para o cultivo, mas potenciais agressões à estabilidade dos ecossistemas. A exploração da microbiota do solo, considerando sua constatada importância e influência nos processos do solo, revela-se extremamente promissora para amenizar tais problemas nos cultivos de eucalipto (Wagg et al., 2013).

## **2. Microbiota do solo**

Considerável parcela dos estudos ecológicos é direcionada apenas para consequências da perda de biodiversidade acima do solo, porém, é evidente o efeito dramático que a simplificação das comunidades do solo e a perda da biodiversidade nesses ambientes exercem sobre as funções dos ecossistemas terrestres. Os solos abrigam uma alta biodiversidade de microrganismos que influenciam inúmeros processos ecossistêmicos,

especialmente a ciclagem e retenção de nutrientes, decomposição de matéria orgânica e a diversidade de plantas (Wagg et al., 2013).

As plantas habitam ambientes altamente complexos, sofrendo influência tanto de microrganismos prejudiciais ao desenvolvimento, quanto de microrganismos benéficos, que atuam na promoção de crescimento e supressão de doenças. A maioria desses microrganismos promotores de crescimento está localizada na rizosfera, região sob influência direta da raiz da planta, onde normalmente estabelecem interações mutualísticas baseadas especialmente na troca de nutrientes e na defesa contra potenciais patógenos (Yedidia et al., 2001; Gomes et al., 2003; Nagaraju et al., 2012).

A estrutura da comunidade microbiana do solo é fator crucial para a resistência do ecossistema, tanto para distúrbios naturais, quanto antrópicos. Comunidades mais diversas e estáveis apresentam maior potencial de resposta a essas perturbações (Singh et al., 2006). As comunidades fúngicas presentes no solo influenciam fortemente a saúde e o desenvolvimento das plantas, especialmente ao estabelecer relações de competição com fitopatógenos presentes na rizosfera (Vujanovic, 2007).

### **3. Mecanismos de promoção de crescimento**

Dentre os organismos presentes na rizosfera, os fungos destacam-se por exercerem diversas funções cruciais para a dinâmica dos ecossistemas, especialmente na degradação de matéria orgânica, contribuindo, também, significativamente para a ciclagem dos nutrientes do solo. Tais microrganismos ainda podem estabelecer associações com as plantas, otimizando a captação de nutrientes e atuando no crescimento e supressão de doenças (Shivanna et al., 1996; Bridge & Spooner, 2001; Yedidia et al., 2001; Gomes et al., 2003; Salas-Marina et al., 2011; Nagaraju et al., 2012).

Os mecanismos pelos quais os fungos rizosféricos promovem o crescimento e aumentam a eficiência fisiológica do vegetal incluem a produção de fito-hormônios, a solubilização de fosfatos, a produção de sideróforos, o aumento de resistência a condições estressantes e o aumento da captação de nutrientes do solo (Saba et al., 2012; Chowdappa et al. 2012).

### **3.1. Fito-hormônios**

Os fito-hormônios não apenas atuam no controle do crescimento vegetal, mas também possuem impacto importante na adaptabilidade da planta, especialmente por atuarem ativamente na regulação da resposta imune a microrganismos patogênicos e herbívoros (Kende & Zeevaart 1997; Wang et al., 2007). Muitos fito-hormônios não são exclusivamente produzidos por vegetais, podendo ser sintetizados por microrganismos que habitam a rizosfera ou os tecidos vegetais. Os fungos rizosféricos são reconhecidamente capazes de sintetizar esses compostos, os quais exercem importantes funções na fisiologia dos vegetais (Dobbelaere et al., 1999; Spaepen et al. 2007; Zhang et al., 2013; Martínez-Medina et al., 2014; Abri et al., 2015). O ácido indol acético (AIA), a giberelina (GA) e o etileno são exemplos desses fito-hormônios que comumente influenciam o desenvolvimento e regulação fisiológica das plantas.

#### **3.1.1. Ácido indol acético**

As auxinas atuam no desenvolvimento da raiz e da parte aérea da planta, influenciando a divisão celular, diferenciação tecidual, alongamento, dominância apical e regulação de respostas à gravidade, luz e patógenos. O ácido indol acético (AIA) é uma auxina altamente reconhecida por seu papel de molécula sinalizadora nas interações entre microrganismos e plantas, alterando ainda a expressão gênica em vários microrganismos (Scagel & Linderman, 1998; Aloni et al., 2006; Contreras-Cornejo et al., 2009; Martínez-Medina et al., 2014). A maior parte da produção de AIA na rizosfera origina-se da conversão microbiana do triptofano presente nos exudados liberados pelas raízes das plantas (Kamilova et al., 2006).

O ácido indol acético produzido por fungos rizosféricos pode atuar no crescimento da raiz da planta, estimulando o desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares. Conseqüentemente, com o maior desenvolvimento da raiz, a planta aumenta sua aquisição de nutrientes, o que favorece o desenvolvimento da mesma (Contreras-Cornejo et al., 2009; Mukherjee and Sen, 2014). Em leveduras do solo, AIA possui papel de molécula sinalizadora e ainda atua como o fator principal na competição. AIA

exerce papel estimulante e inibitório, impactando fortemente o crescimento desses microrganismos em função das concentrações desse fito-hormônio no meio. As concentrações ótimas para o crescimento desses fungos são variáveis de acordo com as diferentes estirpes. Quando essas moléculas produzidas pelas leveduras entram em contato com a planta, ocorre promoção de crescimento pela ação do ácido indol acético nas raízes (Fu et al, 2017).

O ácido indol acético ainda está envolvido em sistemas regulatórios mais complexos, assim como outros fito-hormônios relacionados com a imunidade da planta. Patógenos e fungos simbióticos driblam o sistema imunológico das plantas com a produção de enzimas efetoras e outras moléculas que mimetizam os fito-hormônios, interferindo em suas vias regulatórias, conseqüentemente alterando a expressão gênica e as respostas das plantas, conseguindo assim colonizá-las (Patkar & Naqvi, 2017).

Outro estudo destacou a expressiva capacidade de produção de AIA por *Trichoderma viride*, da ordem de  $115 \mu\text{g mL}^{-1}$  em meio suplementado com diferentes concentrações de L-triptofano. A maior produção de AIA foi alcançada com a concentração de 5% de triptofano adicionado ao meio. Ainda foi detectada a produção de sideróforos e enzimas extracelulares, como xilanase e celulase (Kumar et al., 2017).

### **3.1.2. Giberelinas**

As giberelinas são reconhecidas por atuarem especialmente no controle da germinação, crescimento do caule, florescimento, desenvolvimento de frutos, senescência, quebra de dormência e estímulo da síntese de enzimas hidrolíticas (Khan et al., 2009; Bömke & Tudzynski, 2009; Hamayun et al., 2011). Outros estudos demonstram que as giberelinas podem estar envolvidas na patogenicidade de fungos filamentosos e influenciar a regulação de sistemas de defesa das plantas (Bhattacharya et al., 2012; Wiemann et al., 2013). Tais moléculas podem ser classificadas em dois grupos principais, um primeiro caracterizado por moléculas que incluem 20 átomos de carbono e outro grupo que possui uma lactona e 19 átomos de

carbono. Todas as giberelinas bioativas pertencem ao segundo grupo mencionado, com destaque para os tipos GA1, GA3, GA4 e GA7. O ácido giberélico (GA3) se destaca por seu considerável potencial na promoção de crescimento vegetal abordado em diversos estudos (Chowdappa et al., 2013; Salazar-Cerezo et al., 2018).

A biossíntese das giberelinas, quando realizada por fungos, ocorre pela via do ácido mevalônico, a partir do isopentenil difosfato (IPP). Em contrapartida, quando produzida por plantas, a produção de IPP pode ocorrer por duas vias diferentes, uma pelo ácido mevalônico, no citoplasma, e outra pelo fosfato metil eritritol, nos plastídeos (Eisenreich et al., 2001; Kasahara et al., 2002; Bömke & Tudzynski, 2009).

O mecanismo pelo qual as giberelinas promovem respostas nas plantas está relacionado à ação das proteínas da família DELLA. Essas proteínas produzidas pelas plantas causam supressão do crescimento dos vegetais. As giberelinas atuam ao se ligarem a essas proteínas e formarem complexos que são degradados por proteases, ocasionando mudanças da expressão gênica, que culminam no alongamento celular. A ação das giberelinas nas plantas é regulada pelo balanço entre a expressão dos genes de produção de giberelinas, da biossíntese de receptores e enzimas que metabolizam as giberelinas com potencial bioativo. Esse mecanismo é influente nas diversas fases de desenvolvimento das plantas (Salazar-Cerezo et al., 2018).

Muitas espécies de fungos já foram caracterizadas como produtoras de giberelinas. Trata-se de metabólito secundário que não é essencial para o crescimento e desenvolvimento desses microrganismos. Portanto, elas potencialmente conferem vantagens a esses microrganismos ao serem produzidas, especialmente em condições de estresse (Fox & Howlett, 2008).

### **3.1.3. Etileno**

O desenvolvimento da planta é afetado de diversas formas pelo etileno, incluindo a redução do alongamento da raiz e parte aérea, mudança de direção do crescimento, amadurecimento dos frutos, promoção de

senescência e abscisão foliar, além de exercer funções sinalizadoras nas interações entre fungos e plantas (Cristescu et al., 2002; Akhtar et al., 2005).

O etileno possui papel crucial na sinalização dos mecanismos de promoção de crescimento e na indução da resistência sistêmica. Um estudo publicado recentemente evidenciou a capacidade do PGPF *Penicillium viridicatum* em promover crescimento e induzir a resistência sistêmica em *Arabidopsis thaliana*, mas não pela ativação de genes de defesa já conhecidos, como por exemplo, os genes que codificam as proteínas PR. Em contrapartida, o fungo induz as respostas na planta quando infectada pelo patógeno, por meio do aumento na ativação dos genes *Atvsp*, relacionados com proteínas de armazenamento vegetativo. Foi ainda demonstrado que as vias de sinalização dependentes de etileno são muito importantes, tanto para a promoção de crescimento, quanto para as respostas defensivas, uma vez que plantas mutantes na via de sinalização do etileno não demonstraram tais efeitos benéficos (Hossain et al, 2017).

Os efeitos e a origem dos fito-hormônios envolvidos nas interações entre plantas e fungos só podem ser constatados mediante abordagens genéticas, tais como a utilização de fungos com mutações nos genes da via de biossíntese desses fito-hormônios e estudos da expressão gênica envolvida nessas interações (Jaroszuk-Scisel et al., 2014).

### **3.2. Solubilização de fosfato**

A solubilização de fosfato é processo que permite a utilização de fontes insolúveis de fósforo pelas plantas e pode ocorrer por diferentes mecanismos de solubilização, sendo os mais comuns a redução de pH, pela extrusão de prótons, ou a produção de ácidos orgânicos que quelatam cátions acompanhantes do fosfato, levando à liberação do ânion.

As espécies de microrganismos apresentam potenciais de solubilização de fosfato distintos, assim como a natureza da fonte de fosfato também influencia a eficiência da solubilização (Massenssini et al., 2015).

Experimentos conduzidos com microrganismos rizosféricos demonstraram alta capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, não apenas por bactérias, mas também por fungos rizosféricos pertencentes a

diferentes gêneros. Representantes dos gêneros *Mucor*, *Saccharomyces* e *Trichoderma* demonstraram capacidade de solubilizar essas fontes insolúveis de fosfato, além de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que demonstram alta capacidade de solubilização, especialmente quando consideradas fontes de fosfato naturais (Hussein and Joo, 2015). Portanto, testes da capacidade de solubilização de diferentes fontes de fosfato pelos diversos gêneros de fungos presentes nos solos rizosféricos são fundamentais para selecionar os fungos com maior potencial de solubilização e desenvolver possíveis aplicações no cultivo vegetal.

A eficiência de solubilização dos isolados é atribuída à produção de ácidos orgânicos eficientes no processo, como o ácido oxálico e o ácido cítrico. Em contrapartida, o ácido glicônico apresenta menor eficiência no processo de solubilização de fosfatos (Mendes et al, 2014a). Quando se considera o fosfato de cálcio, a simples acidificação do meio é suficiente para a ocorrência do processo de solubilização, porém, quando se trata de outras fontes de fosfato, como o fosfato de ferro e o fosfato de alumínio, a ação dos ácidos cítrico e oxálico é fundamental. O fungo *Aspergillus niger* apresenta grande capacidade de solubilizar diferentes fontes de fosfato. A eficiência do isolado é atribuída à capacidade produção de ácido oxálico em determinadas condições de cultivo (Mendes et al, 2014a).

Elementos químicos mobilizados durante o processo de solubilização do fosfato de rocha de Araxá influenciam o processo de solubilização. Foi descoberto que o fluoreto é o único elemento que reduz significativamente o processo de solubilização, por diminuir o crescimento do *Aspergillus niger* e por reduzir a produção dos ácidos orgânicos e a acidificação do meio, limitando assim o processo de liberação do fósforo (Mendes et al., 2013a). Nesse sentido, novos estudos buscaram contornar tais limitações com o objetivo de ampliar a capacidade de solubilização dos fosfatos, com o emprego do biocarvão, constatando que sua adição aumenta o potencial de solubilização ao remover uma parcela do fluoreto liberado no processo, ao mesmo tempo estimula a produção de ácidos orgânicos pelo *Aspergillus niger* (Mendes et al., 2014b). Adicionalmente, foi obtido um isolado mutante de *Aspergillus niger*, por meio da indução de mutagênese através da luz UV. O mutante apresenta maior tolerância ao fluoreto e uma maior capacidade

de produção de ácido oxálico, conseqüentemente, apresenta eficiência superior no processo de solubilização de fontes de fosfato ricas em fluoreto (Silva et al., 2014). Tais progressos no conhecimento dos processos de solubilização das diferentes fontes de fosfato são altamente promissores para possíveis aplicações na agricultura, e requerem estudos complementares para estabelecer as melhores condições de inoculação e manutenção da ação desses microrganismos no solo.

A utilização do bagaço de cana como fonte de carbono e nitrogênio consitui sistema eficiente e barato de solubilização de fosfatos de rocha, baseados na produção de ácidos do *A. niger* (Mendes et al, 2013b). O bagaço de cana também já foi utilizado como substrato e *A. niger* como microrganismo solubilizador. Foi observado aumento considerável na solubilização de fosfato de rocha após a otimização do processo. Os fatores que demonstraram influenciar a quantidade de P solubilizado foram a concentração de sacarose, a quantidade de biocarvão adicionada e o fosfato de rocha (Mendes et al., 2015). As concentrações de minerais no meio de cultivo também afetam a eficiência de solubilização por *A. niger* (Oliveira et al., 2015). Em geral, em meios mais pobres em nutrientes minerais, a produção de ácidos orgânicos é maior, acarretando maior solubilização de fosfatos de rocha. Novos estudos são requeridos para aperfeiçoar o funcionamento desses sistemas até condições ótimas de liberação de P dos fosfatos de rocha.

Um estudo recente acrescenta outro fator no processo de liberação de fósforo no solo, defendendo a hipótese de que o HCN (cianeto de hidrogênio), substância produzida por rizobactérias e que foi bastante atribuída a efeitos de controle biológico, desempenha papel importante na liberação do fósforo no solo. O cianeto de hidrogênio tem a capacidade de sequestrar metais, liberando assim indiretamente os nutrientes no solo, que por sua vez serão utilizados no crescimento vegetal. No estudo, as plantas tratadas com HCN obtiveram crescimento superior, e tal crescimento não está vinculado à indução de resistência ou ação de controle biológico, pois as plantas cresceram de forma asséptica. Adicionalmente, não houve correlação entre a produção de HCN pela rizobactéria utilizada e ação contra patógenos. Por essa razão, o crescimento foi atribuído a maior liberação de

nutrientes como consequência da ação de HCN sobre o substrato (Rijavec and Lapanje, 2016).

### 3.3. Sideróforos

Os sideróforos são compostos de baixo peso molecular produzidos especialmente por microrganismos crescendo em ambientes onde há limitação por ferro. Tais moléculas apresentam como principal função a disponibilização do ferro em sua forma assimilável para plantas e outros microrganismos, atribuída a sua capacidade de quelatar o ferro férrico presente em ambientes aquáticos e terrestres (Schwyn and Neilands, 1987). Além da principal função de auxiliar na captação do ferro, a importância dos sideróforos estende-se em muitos outros contextos, como na defesa, reprodução, competição, nas interações e na virulência dos fungos que infectam plantas e animais (Haas, 2014).

A grande diversidade química e propriedades fazem com que os sideróforos sejam extremamente promissores para aplicações em biorremediação, especialmente por sua influência nos ciclos biogeoquímicos e no auxílio para o desenvolvimento de plantas (Dahlheimer et al., 2007; Verma et al., 2011).

Existem três categorias de sideróforos, denominadas catecolatos (inclui os fenolatos), hidroxamatos e carboxilatos (Winkelmann, 2007). Tipos diferentes de sideróforos possuem também níveis de afinidades por ferro distintas (Winkelmann, 2007). Existem ainda tipos de sideróforos com papéis bem específicos, encontrados no interior das células, atuando no armazenamento do ferro e no controle da homeostase intracelular dos microrganismos, como as ferricrocinas produzidas por algumas espécies de *Aspergillus* (Winkelmann, 2007). Os sideróforos podem ser produzidos por microrganismos procariotos e eucariotos, e aqueles que não possuem a capacidade de produção do composto, consegue utilizar sideróforos produzidos por outros microrganismos (Gsaller et al., 2012). Nas interações entre plantas e fungos patogênicos, é comum que o fungo tenha plena capacidade de sequestrar o ferro do seu hospedeiro por meio da produção de sideróforos. Contudo, em relações simbióticas os sideróforos podem

desempenhar papel importante no suprimento de ferro para a planta (Fatima et al, 2017).

Os sideróforos do tipo hidroxamato são os mais comumente produzidos por fungos, apesar de algumas espécies já terem sido caracterizadas como produtoras de sideróforos do tipo catecolatos e carboxilatos. A espécie *Emericella nidulans*, fungo isolado de regiões de mangue, demonstrou capacidade de produção de catecolatos e hidroxamatos ao mesmo tempo, fato não reportado anteriormente (Trivedi et al., 2016).

A capacidade de produção de sideróforos pelas espécies *A. niger* e *Aspergillus parasiticus* foi testada e demonstrou que ambos os fungos produziram sideróforos do tipo hidroxamato, e ainda que quanto menores os teores de ferro do meio, maiores eram os teores de sideróforos produzidos (Patel et al., 2017). O pH também influencia a produção de sideróforos, pois altera a solubilidade do ferro no meio, portanto, a maior produtividade ocorreu em pH 7.0, faixa na qual o ferro se encontra insolúvel. Os isolados de *Aspergillus*, quando inoculados em feijão mungo, causaram maior aquisição de ferro, resultando em maiores valores de peso seco, peso fresco, raízes laterais, número de folhas, número de ramos e altura da planta (Patel et al., 2017). Tais resultados evidenciam a importância dos sideróforos para o desenvolvimento dos vegetais e revelam o potencial dos isolados para bioinoculantes.

A biossíntese dos sideróforos pode ainda ser afetada significativamente pela fonte de carbono oferecida no meio de cultura e a temperatura de incubação. Um estudo recente testou não apenas tais fatores como também diferentes fontes de nitrogênio, teores de ferro e pH. Os isolados utilizados foram *A. niger* e *Penicillium oxalicum*, com tratamentos irradiados e não irradiados com raios gamma. Os maiores valores de produção de sideróforos foram observados em valores de pH em torno de 4.5 e 5.5, com sacarose como fonte de carbono, 25 °C e teor de ferro do meio em concentração de 2 mmol. As médias de produção de sideróforos entre os meios com diferentes fontes de nitrogênio foram próximas e o processo de irradiação afetou discretamente os isolados (Aziz et al., 2016).

### 3.4. Compostos Orgânicos Voláteis

Apesar de negligenciados por muitos anos, a ação dos compostos orgânicos voláteis (COVs) nas interações de microrganismos do solo é bastante efetiva, uma vez que tais compostos tem a capacidade de serem emanados pelos organismos produtores e distribuídos no solo, mesmo por longas distâncias, até atingir organismos alvos que os perceba. Tal fenômeno é possível pelas características físico-químicas dos COVs: baixo ponto de ebulição, baixo peso molecular e alta pressão de vapor (Effmert et al., 2012; Siddiquee et al., 2015; Schmidt et al., 2015). Atualmente cerca de 2000 compostos produzidos por 1000 espécies de fungos já foram identificados, apresentando os mais variados efeitos, como promoção e inibição de crescimento vegetal, efeitos antimicrobianos e até papéis nas interações interespecíficas entre organismos separados fisicamente. Tais fatores podem originar alterações na expressão gênica, resultando em implicações ecológicas, como por exemplo, a formação de biofilme, respostas ao estresse e motilidade em bactérias. Embora um número considerável dos compostos voláteis identificados já seja conhecido, a maior parte deles não foi reportada anteriormente, conseqüentemente não há informações sobre seus possíveis efeitos e propriedades (Schmidt et al., 2016; Lemfack et al., 2017; Martínez-Medina et al., 2017).

Compostos orgânicos voláteis liberados por fungos promotores de crescimento atuam como atenuadores de doenças, pois induzem a expressão de genes com ativação dependente de fito-hormônios, como jasmonato e ácido salicílico, que estão diretamente relacionados com diferentes vias de indução de defesa das plantas. Portanto, uma série de compostos voláteis é potencialmente promissora para o uso como agentes para controle biológico, especialmente pela capacidade de induzir a resistência dos vegetais, mesmo quando em baixas concentrações (Naznin et al., 2013; Naznin et al., 2014). Considerando que diferentes espécies de plantas demonstram respostas distintas à ação desses compostos, novos experimentos são necessários para o uso seguro e eficiente desses compostos como agentes de controle biológico.

Ácido metacrílico, acetato isobutil, m-cresol, álcool fenil etílico e 3-octanona são exemplos de compostos voláteis produzidos por fungos que demonstraram capacidade de reduzir a severidade de doenças causadas por microrganismos fitopatogênicos (Naznin et al., 2014). A produção dos compostos voláteis sofre influência da idade da colônia fúngica produtora, tanto nos tipos de compostos, quanto em suas quantidades. Assim como a combinação desses compostos e suas respectivas concentrações resultam em efeitos distintos na planta inoculada com o microrganismo produtor. Portanto, o estabelecimento dos efeitos dessas variações é crucial para que os compostos efetivos na promoção de crescimento vegetal e indução das defesas das plantas atuem de modo eficiente (Naznin et al., 2014).

Com o monitoramento da produção de compostos voláteis, é possível registrar mudanças do perfil de produção ao longo do tempo. Quando comparados compostos produzidos por colônias de 5 dias com os de colônias de 15 dias, foi notada que a produção de muitos compostos inicialmente produzidos era interrompida, ao mesmo tempo que novos compostos eram produzidos pela colônia. Ao todo foram identificados 56 compostos voláteis diferentes, produzidos pelo fungo do gênero *Trichoderma*, que incluíam majoritariamente compostos aromáticos, álcoois, aldeídos, alcenos e cetonas (Lee et al., 2015). O estágio de desenvolvimento da planta também influencia as respostas às diversas propriedades químicas desses compostos, propriedades essas que por sua vez também são influenciadas por fatores da colônia, do meio de cultura e ambientais. Portanto, o acúmulo e balanceamento entre esses compostos é que definirão o efeito do isolado sobre a planta, e justamente por essa razão é desafiador estudar tais efeitos no desenvolvimento vegetal (Lee et al., 2015).

Outro estudo, similar ao descrito anteriormente, utilizou 20 estirpes de 11 espécies diferentes de *Trichoderma*, chegando a conclusão que 9 desses isolados emitem compostos voláteis capazes de induzir o desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*, baseando-se nas medidas de clorofila, biomassa e tamanho das plantas. Entretanto, 10 dos isolados testados demonstraram valores muito próximos ao grupo controle, enquanto um isolado emitiu COVs inibitórios (Lee et al., 2016). Adicionalmente, não foram observadas diferenças nas concentrações de CO<sub>2</sub> no sistema montado com os isolados

em crescimento, quando comparado ao ar ambiente. A retirada de CO<sub>2</sub> do sistema também não resultou em redução no desenvolvimento da planta, contrariando o efeito esperado em que maiores concentrações de CO<sub>2</sub> impactam positivamente o crescimento das plantas (Lee et al., 2016). Também foi demonstrado que o tempo de exposição aos COVs é importante para o efeito de promoção de crescimento, pois as plantas expostas por três semanas aos COVs demonstraram maior velocidade nas fases vegetativas, fato não observado nas expostas por duas semanas apenas (Lee et al., 2016).

A promoção de crescimento mediada por compostos voláteis produzidos por fungos do gênero *Verticillium* está associada com vias de sinalização dependentes de auxina. A inibição do efluxo de auxina interrompe a promoção de crescimento mediada pelos compostos voláteis. Evidências encontradas durante os experimentos de mutação nas vias de auxina demonstraram que a ativação de vias de sinalização dependentes do fito-hormônio foram ativadas anteriormente aos primeiros sinais de ocorrência da promoção de crescimento (Li et al., 2018).

#### **4. Resistência Sistêmica Induzida associada à PGPF**

Os fungos promotores de crescimento também atuam na indução da Resistência Sistêmica Induzida (RSI), que é um estado no qual as defesas da planta são ampliadas diante de estímulos externos, porém não desencadeia respostas defensivas diretas. A planta é conduzida a um estado fisiológico, conhecido como *primed*, no qual desenvolve uma resposta robusta e imediata diante do ataque de insetos ou microrganismos patogênicos. Esse estado fisiológico alcançado pela planta é consequência da ativação de genes de defesa e produção de metabólitos que culminam na transdução de sinais. Os fito-hormônios e os fatores transcricionais relacionados atuam na ativação e regulação desses mecanismos de resposta. Etileno, ácido salicílico, jasmonatos e ácido abscísico são exemplos de fitohormônios frequentemente importantes para tais vias de sinalização das plantas (Pieterse et al., 2007; Segarra et al., 2009; Naznin et al., 2014; Zavala-Gonzalez et al., 2017).

A regulação da RSI em plantas constitui-se de rede complexa de interações nas quais diversos tipos de moléculas possuem a capacidade de mediar a transdução de sinais na planta, influenciando na ativação de genes de defesa e condicionando a planta a um estado fisiológico que possibilitará resposta de defesa efetiva contra patógenos (Segarra et al., 2009). As moléculas mais frequentemente envolvidas nessa regulação são os fitohormônios, que são amplamente produzidos por microrganismos promotores de crescimento, porém alguns outros tipos de moléculas também manifestam a capacidade de influenciar a resistência sistêmica induzida nas plantas. Frequentemente, a supressão de doenças está mais relacionada à indução de alterações na rede de hormônios da planta mediada pelo microrganismo promotor, do que a mecanismos diretos que atuam contra o microrganismo patogênico (Martínez-Medina et al., 2014). Recentemente constatou-se que a produção de compostos voláteis por fungos do gênero *Trichoderma* pode afetar a aquisição de ferro na raiz e influenciar as vias de sinalização do jasmonato, que conseqüentemente impactam a indução da resistência sistêmica da planta (Martínez-Medina et al., 2017).

## **5. Efeitos da promoção de crescimento vegetal**

Fungos do gênero *Trichoderma* são bastante reconhecidos por sua capacidade de promoção de crescimento vegetal. Em experimentos com sete isolados distintos pertencentes ao gênero e inoculados em arroz, demonstrou-se que todos os isolados foram capazes de promover crescimento e aumentar consideravelmente o desempenho fisiológico das plantas, quando comparados com plantas tratadas com NPK e o grupo controle. Os efeitos benéficos desses fungos se manifestaram na altura das plantas, tamanho e peso fresco das raízes, número de brotos e folhas. Quanto ao desempenho fisiológico, observou-se aumento das taxas de fotossíntese, condutância estomática, transpiração, eficiência do uso de água e concentração interna de dióxido de carbono (Doni et al., 2014).

Representantes do gênero *Trichoderma* demonstram também grande potencial na indução de mecanismos de defesa das plantas, além da já mencionada promoção de crescimento. As plantas inoculadas com

*Trichoderma harzianum* demonstraram aumento nas variáveis de crescimento como altura, peso fresco, área foliar e raízes, quando comparadas às plantas inoculadas com a bactéria *Bacillus subtilis* e ao grupo controle, que não foi inoculado com microrganismos (Chowdappa et al., 2013). O maior crescimento estava associado à produção de fitohormônios, especificamente de auxina (IAA) e giberelina (GA3) pelo fungo. Adicionalmente, houve maior atividade de enzimas de defesa, tais como polifenol oxidases, peroxidases e superoxidismutases, caracterizando a indução de resistência sistêmica. Por último, as plantas inoculadas com o fungo apresentaram redução no tamanho das lesões causadas pelos patógenos *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans* (Chowdappa et al., 2013).

A capacidade da indução de defesa por *T. harzianum* já foi demonstrada também nas raízes de girassol, em resposta ao ataque do patógeno *Rhizoctonia solani*. O fungo estimula o acúmulo de compostos fenólicos, que desempenham diversos papéis de defesa na planta, e ocasiona forte atividade antioxidante, devido à elevação nas concentrações de enzimas antioxidantes nas plantas inoculadas (Singh et al., 2011). Outro trabalho evidenciou a capacidade de *T. virens* aumentar a concentração de metais pesados nas raízes de milho quando inoculados com o fungo, além dos efeitos de promoção de crescimento que resulta numa quantidade de biomassa superior ao das plantas não inoculadas, revelando potencial para uso na fitoestabilização de metais pesados e produção de biomassa para emprego na produção de biocombustível (Babu et al., 2014).

Os fungos promotores de crescimento podem aumentar a resistência da planta ao estresse salino, o que viabiliza a utilização de solos com tais características para culturas de interesse econômico. A planta halofílica *Suaeda salsa* foi utilizada para testar a capacidade de promoção de crescimento de fungos da espécie *T. harzianum* com a aplicação de conídios e fertilizante formulados a partir da estirpe T83 (Li-Hua et al., 2016). Comparadas ao grupo controle, as plantas que receberam os conídios apresentaram aumento na matéria fresca de 50,5% e na matéria seca de 67,3%, enquanto as plantas tratadas com o fertilizante apresentaram aumento na matéria fresca de 82,7% e na matéria seca de 119,3%. O

conteúdo de prolina, aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, potássio e cálcio nas plantas tratadas com conídios e o fertilizante também aumentaram. Adicionalmente, também foi observado nas plantas tratadas aumentos consideráveis na atividade enzimática da peroxidase, superóxido dismutase, fenol oxidase e catalase. Os efeitos observados no solo incluíram a diminuição na concentração de sal e na densidade, aumento da porosidade, da capacidade de retenção de água e das populações de fungos e bactérias (Li-Hua et al., 2016). Todos esses efeitos evidenciam a grande influência que fungos promotores de crescimento podem exercer nos vegetais com os quais interagem e o quão promissor é sua aplicação nas mais diversas condições ambientais.

Outro fator já abordado em alguns estudos com FPCP é o efeito resultante da combinação de dois ou mais microrganismos distintos na promoção de crescimento da planta. Nesses casos, o desenvolvimento da planta é superior nos tratamentos combinados, quando comparados aos tratamentos individuais dos isolados e aos controles (El-Katatny, 2010; Al-Taie et al., 2016).

Grande parte dos estudos relacionados à promoção de crescimento em plantas por fungos é direcionada ao gênero *Thichoderma*, que inclusive já são aplicados como agentes para controle biológico e promotores de crescimento vegetal (Harman et al., 2004; Harman et al., 2011; Saba et al., 2012; Singh et al., 2011; Chowdappa et al., 2013; Babu et al., 2014; Doni et al., 2014; Li-Hua et al., 2016; Oskiera et al., 2017). Consequentemente, há grande disparidade entre a quantidade de informações sobre os representantes desse grupo em relação a outros táxons fúngicos. Muitos outros gêneros possuem também grande potencial para beneficiar o crescimento vegetal, tais como isolados do gênero *Aspergillus* promotores de crescimento de *Piper nigrum*. O estudo testou a produção de sideróforos e ácido indol acético, atividade da enzima catalase e o controle biológico de patógenos por antagonismo. A espécie *Aspergillus niger* se destacou dentre os outros cinco isolados, demonstrando maior capacidade de produção de sideróforos e ácido indol acético, e alta atividade de catalase, revelando-se eficiente agente de biocontrole de fungos patogênicos como *Fusarium equiseticus* e *Mucor spp* (Usha and Padmavathi, 2013). Portanto, o

isolamento e caracterização de fungos rizosféricos são passos promissores para identificar novos microrganismos eficientes na promoção de crescimento.

Outros gêneros de fungos, isolados da rizosfera de *Panax ginseng*, demonstram a capacidade de produção de AIA e solubilização de fosfato. Os testes revelaram que dos 17 isolados fúngicos obtidos, 82 % tinha a capacidade de solubilizar fosfato tricálcico, enquanto 64,7 % dos isolados produziram o fito-hormônio AIA. Tais resultados reforçam que os mecanismos comumente envolvidos na promoção de crescimento são frequentemente detectados em fungos rizosféricos dos mais diversos gêneros (Hussain and Joo, 2015).

O fungo *Penicillium chrysogenum* ao colonizar as raízes do milheto-pérola, favoreceu a mobilização de nutrientes do solo e o acesso da planta a esses nutrientes, com conseqüente efeito no crescimento vegetal e na ativação de genes de defesa (Murali et al., 2013). O fungo inoculado conferiu maior resistência ao patógeno *Sclerospora graminicola*. A resistência das plantas correlacionou-se com a ativação de fatores de transcrição relacionados a genes de defesa, porém os mecanismos pelos quais o processo ocorre ainda não estão claramente elucidados. O isolado também foi testado diretamente na semente e demonstrou maior eficiência sobre a germinação quando comparado com sementes não inoculadas (Murali et al., 2013). Em estudo similar, foi demonstrada a capacidade de promoção de crescimento, germinação de sementes e de indução de resistência contra o patógeno *Sclerospora graminicola*, por meio de indutores produzidos a partir de cultura do fungo *Penicillium oxalicum* isolado da rizosfera de milheto-pérola (Murali et al., 2015).

## **6. Promoção de crescimento em eucalipto**

As interações entre fungos e plantas sofrem forte influência de fatores abióticos e bióticos, uma vez que a rizosfera é um ambiente dinâmico com complexa troca de sinalização tanto entre planta e os microrganismos, quanto entre os próprios microrganismos. As características do solo também influenciam fortemente como essas interações são moldadas. Portanto, as

interações devem ser avaliadas entre microrganismos e plantas específicos, e em condições determinadas (Gomes et al., 2003; Venturi and Keel, 2016; Zhang et al, 2017) Há relatos na literatura da promoção de crescimento por fungos endofíticos em mudas híbridas de *Eucalyptus grandis* com *Eucalyptus urophylla* . Os isolados de *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.* e *Papulaspora sp.* foram inoculados nas raízes das mudas de eucalipto e seus efeitos no desenvolvimento das plantas foram medidos e comparados. Todas as plantas inoculadas com qualquer um dos três gêneros de fungos apresentaram efeitos positivos no comprimento do caule, diâmetro do caule, valores de massa seca e fresca, quando comparadas com as mudas não tratadas. As plantas inoculadas com *Trichoderma* apresentaram maior crescimento do caule, enquanto as inoculadas com *Fusarium* apresentaram maior número de folhas e valores superiores de massa fresca e seca (Vitorino et al., 2016).

O efeito antagonista de isolados do gênero *Clonostachys* e *Trichoderma* foi demonstrado ao serem inoculados em plantas de *Eucalyptus globulus* infectadas pelo patógeno *Botrytis cinérea*. Os fungos pertencentes ao gênero *Clonostachys* têm potencial para atuarem como agentes de biocontrole do patógeno, diminuindo a severidade da doença e a taxa de mortalidade, especialmente por demonstrarem resultados similares a aplicação de fungicidas para o controle do patógeno, sem causar prejuízos à cultura. Adicionalmente, os melhores valores de desenvolvimento das raízes foram alcançados com os tratamentos que continham os fungos inoculados, tanto *Clonostachys* quanto para os isolados de *Trichoderma* (Zaldúa and Sanfuentes, 2010).

Como os estudos que abordam as interações entre fungos rizosféricos e espécies de eucalipto são muito escassos, ainda não há muitas informações na literatura que caracterizem as prováveis implicações desses fungos na obtenção de nutrientes do solo e no desenvolvimento dessas plantas. Entretanto, alguns estudos realizados com eucalipto, já demonstram a importância de rizobactérias no desenvolvimento da planta, especialmente nos estágios iniciais (Mafia et al., 2009; Santiago et al., 2015). Foi demonstrado experimentalmente que *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus*, quando inoculados nas plantas, suprimiram a murcha do eucalipto

causada pelo patógeno *Ralstonia solanacearum*, aparentemente pela produção de compostos voláteis e cianeto de hidrogênio por *Bacillus thuringiensis*, e pela produção de siderofóros atribuída ao *Bacillus cereus* (Santiago et al., 2015). Portanto, apesar de não tratar-se propriamente de fungos rizosféricos promotores de crescimento, os estudos disponíveis na literatura, abordando as interações entre rizobactérias e eucalipto, reforçam a influência da microbiota rizosférica no desenvolvimento da planta e na supressão de patógenos, ainda indicando que ocorre por mecanismos comuns já descritos tanto para fungos quanto para bactérias.

## **7. Mecanismos regulatórios da promoção de crescimento vegetal**

Quando se trata de mecanismos mais complexos e sistemas regulatórios, a colonização por fungos promotores de crescimento tem potencial de alterar o perfil metabólico da planta, alterando a biossíntese de aminoácidos, o crescimento, a defesa e o desenvolvimento vegetal. Estudos realizados com *Arabidopsis thaliana* revelaram a influência da colonização das raízes por *Trichoderma* na promoção da resistência sistêmica induzida contra *Pseudomonas syringae* (Brotman et al., 2012). Apesar da colonização pelo fungo não se manifestar em mudanças diretas na expressão gênica nas folhas da planta, foram observadas alterações em diversos outros fatores de transcrição, demonstrando assim o potencial do fungo em alterar o padrão de expressão gênica da planta. Alguns fatores de transcrição aumentaram consideravelmente, como observado para aqueles relacionados a proteínas transportadoras de lipídeos, sinalização por auxina, genes PR, sinalização de jasmonato e etileno. Porém, o fator WRKY40 sofreu redução, o que diminui a susceptibilidade da planta à infecção por *Pseudomonas*. Além disso, o estudo destacou mudanças metabólicas marcantes sofridas pelas plantas inoculadas com o FPCP, com mudanças significativas nos níveis de aminoácidos, intermediários do ciclo do ácido cítrico, poliaminas e açúcares (Brotman et al., 2012).

Análises do transcriptoma do PGPF *Trichoderma longibrachiatum* revelaram novas informações sobre a participação do fungo no desenvolvimento e respostas ao estresse pelo tomate. Os transcritos

indicaram maior expressão de genes do metabolismo primário e células defensivas, contrapondo a menor presença de genes relacionados com o metabolismo secundário e transporte. Os mecanismos que potencialmente desencadeiam esse aumento na capacidade defensiva são atribuídos aos genes relacionados com a sinalização de espécies reativas de oxigênio, reforço da parede celular e aumento de células defensivas. O efeito do fungo sobre a planta também influencia genes do metabolismo energético, síntese protéica e fotossíntese (De Palma et al., 2016).

Diferenças na abundância de proteínas efetoras encontradas em diferentes condições de crescimento dos PGPF já foram relatadas. O fenômeno foi demonstrado pela comparação das proteínas presentes durante o crescimento do fungo *Trichoderma virens* cultivado isoladamente, com as proteínas encontradas quando o fungo estava associado às raízes do milho indiano (Lamdan et al., 2015). A RSI foi superior quando o fungo crescia junto com o milho indiano e foi observada diferença significativa na abundância e tipos das proteínas entre os dois tratamentos. Dentre as proteínas cujas abundâncias demonstraram sofrer influência significativa das raízes, destacam-se os grupos relacionados com a colonização (GH) e com a comunicação e regulação da RSI (SSCPs – Small, Secreted, Cysteine Rich Proteins). Apesar da indicação das diferenças dos padrões protéicos do fungo em diferentes tratamentos, os mecanismos regulatórios e as vias de ação dessas proteínas efetoras ainda não estão claramente descritos (Lamdan et al., 2015).

A atividade indutora de resistência por fungos do gênero *Trichoderma* em pepino foi relacionada com vias de sinalização de jasmonato e etileno, e a redução dos sintomas causados pela infecção por *Pseudomonas* foi creditada à ativação de genes PR (patogenesis-related), codificadores de enzimas atuantes nos mecanismos defensivos das plantas, como quitinases,  $\beta$ -1,3-glucanases e peroxidases (Shoresh et al., 2005). Na conferência de resistência contra patógenos há ativação de genes de defesa dependentes de ácido salicílico, jasmonato e etileno concomitantemente, além da produção de compostos com ação antimicrobiana, como fitoalexinas e camalexina (Salas-Marina et al., 2011). Contudo, os efeitos promovidos por fungos do gênero *Trichoderma*, tanto na promoção de crescimento quanto

na indução de resistência, são altamente influenciados pelo genótipo da planta (Tucci et al., 2011).

Além da promoção de crescimento e ação contra nematóides, a inoculação de *Pochonia chlamydosporia* em *Arabidopsis thaliana* revelou que pode ocorrer indução na floração da planta em decorrência de alterações na expressão gênica dos reguladores de tempo de floração. Adicionalmente, *Pochonia chlamydosporia* demonstrou influência na homeostase de jasmonato, hormônio que possui influência no desenvolvimento, imunidade e defesa da planta, além de papel importante nas interações entre plantas e microrganismos. Os mecanismos relacionados com a modulação de jasmonato e seus impactos ainda precisam ser mais profundamente investigados (Zavala-Gonzalez et al., 2017).

## **8. Assimilação de Nitrogênio**

Quanto ao papel dos fungos rizosféricos promotores de crescimento na assimilação de nitrogênio, não foram encontradas informações na literatura. Os fungos micorrízicos arbusculares possuem papel importante na aquisição de nitrogênio. Nesse caso, o processo ocorre por meio de duas vias de assimilação, uma, realizada diretamente pela planta, e outra, realizada pelo fungo micorrízico arbuscular, que capta o nitrogênio do solo por meio das hifas e entrega o nutriente à planta. Adicionalmente, a atividade de enzimas relacionadas com o processo de aquisição e assimilação de nitrogênio tende a ser superior nas raízes e nas partes aéreas em plantas com associações micorrízicas (Bücking & Kafle, 2015).

O processo de assimilação de nitrogênio pela planta inclui a ação de enzimas que captam o nitrogênio na forma de nitrato ou amônio do solo e convertem tais formas inorgânicas de nitrogênio a glutamato, que por sua vez será utilizado pelas células vegetais (Krapp, 2015).

As principais enzimas atuantes nesse processo são a glutamina sintetase, que converte amônio em glutamina; a glutamato sintase, que gera glutamato a partir de glutamina e 2-oxoglutarato; a glutamato desidrogenase, que atua tanto no sentido assimilatório quanto dissimilatório, dependendo da quantidade de nitrogênio disponível; a nitrato redutase, que reduz nitrato a

nitrito; e a nitrito redutase, que atua na redução de nitrito a amônio (Krapp, 2015).

Haja vista as informações acima, a seleção de PGPF constitui o primeiro passo para o estudo das interações entre esses microrganismos e a planta hospedeira. Em seguida, uma vez comprovada a capacidade de promoção de crescimento, torna-se necessário avaliar os possíveis mecanismos bioquímicos que levam ao maior crescimento da planta. A seleção de PGPF eficientes pode levar ao uso desses microrganismos em sistemas de produção agrícolas e florestais, com ganhos significativos na redução do uso de fertilizantes químicos.

## REFERÊNCIAS

- ABRI, KUSWINANTI, T., SENGIN, E.L. & SJAHRIR, R. Production of Indole Acetic Acid (IAA) Hormone from Fungal Isolates Collected from Rhizosphere of Aromatic Rice in Tana Toraja. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, v. 2, p. 198-201, 2015.
- AKHTAR, M.J., ARSHAD, M., KHALID, A. & MAHMOOD, M.H. 2005. Substrate-dependent biosynthesis of ethylene by rhizosphere soil fungi and its influence on etiolated pea seedlings. *Pedobiologia*, v. 49, p. 211-219, 2005.
- ALONI, R., ALONI, E., LANGHANS, M. & ULLRICH, C. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Annals of Botany*, v. 93, p. 883-893, 2006.
- AL-TAIE, A.H., MATROOD, A.A.A. & AL-ASADYI, M. The influence of some fungi bio-genic on promoting growth and yield of wheat-var. Ibaa99. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 5, p. 757-764, 2016.
- AZIZ, O.A.A., HELAL, G.A., GALAL, Y.G.M. & ROFAIADA, A.K.S. Fungal siderophores production in Vitro as affected by some abiotic factors. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 5, p. 210-222, 2016.
- BABU, A.G., SHIM, J., BANG, K.-S., SHEA, P.J. & OH, B. *Trichoderma virens* PDR-28: a heavy metal-tolerant and plant growth-promoting fungus for remediation and bioenergy crop production on mine tailing soil. *Journal of Environmental Management*, v. 132, p. 129-134, 2014.
- BHATTACHARYA, A., KOURMPETLI, S., WARD, D.A., THOMAS, S.G., GONG, F., POWERS, S.J., CARRERA, E., TAYLOR, B., GONZALEZ, F.N.C., TUDZYNSKI, B., PHILLIPS, A.L., DAVEY, M.R. & HEDDEN, P. Characterization of the fungal gibberellin desaturase as a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and its utilization for enhancing plant growth. *Plant Physiology*, v. 160, p. 837-845, 2012.
- BÖMKE, C. & TUDZYNSKI, B. Diversity, regulation, and evolution of the gibberellin biosynthetic pathway in fungi compared to plants and bacteria. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1876-1893, 2009.

- BRIDGE, P. & SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. *Plant Soil*, v. 232, p. 147–154, 2001.
- BROTMAN, Y., LISEC, J., MÉRET, M., CHET, I., WILLMITZER, L. & VITERBO, A. Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology*, v. 158, p. 139-146, 2012.
- BÜCKING, H. & KAFLE, A. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Nitrogen Uptake of Plants: Current Knowledge and Research Gaps. *Agronomy*, v. 5, p. 587-612, 2015.
- CHOWDAPPA P., MOHAN KUMAR, S.P., JYOTHI LAKSHMI, M. & 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, p. 109–117, 2013.
- CRISTESCU, S.M., MARTINIS, D., HEKKERT, S.L., PARKER, D.H. & HARREN, F.J.M. Ethylene Production by *Botrytis cinerea* In Vitro and in Tomatoes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 5342-5350, 2002.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C. & LÓPEZ-BÚCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 149, p. 1579-1592, 2009.
- DAHLHEIMER, S., NEAL, C. & FEIN, J. 2007. Potential mobilization of platinum-group elements by siderophores in surface environments. *Environmental Science & Technology*, v. 41, p. 870-875, 2007.
- DE PALMA, M., D'AGOSTINO, N., PROIETTI, S., BERTINI, L., LORITO, M., RUOCCO, M., CARUSO, C., CHIUSANO, M.L. & TUCCI, M. Suppression Subtractive Hybridization analysis provides new insights into the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) response to the plant probiotic microorganism *Trichoderma longibrachiatum* MK1. *Journal of Plant Physiology*, v. 190, p. 79-94, 2016.
- DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A., THYS, A., BROEK, A.V. & VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, v. 212, p. 155–164, 1999.
- DONI, F., ISAHAK, A., ZAIN, C.R.C.M. & YUSOFF, W.M.W. Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. Inoculants. *AMB Express*, v. 4, p. 1-7, 2014.

- EFFMERT, U., KALDERÁS, J., WARNKE, R. & PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the Soil. *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, p. 665-703, 2012.
- EISENREICH, W., ROHDICH, F. & BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, v. 6, p. 78-84, 2001.
- EL-KATATNY, M.H. Enzyme production and nitrogen fixation by free, immobilized and coimmobilized inoculants of *Trichoderma harzianum* and *Azospirillum brasilense* and their possible role in growth promotion of tomato. *Food Technology and Biotechnology*, v. 48, p. 161-174, 2010.
- FATIMA, N., JAVAID, K., LAHMO, K., BANDAY, S., SHARMA, P. & MASOODI, L. Siderophore in fungal physiology and virulence. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 6, p. 1073-1080, 2017.
- FOX, E.M. & HOWLETT, B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, p. 481-487, 2008.
- FU, S-F., CHEN, H-W., WEI, J-Y., LEE, Y-I. & CHOU, J-Y. Yeast-produced IAA is not only involved in the competition among yeasts but also promotes plant growth and development. *Nova Hedwigia*, v. 105, p. 135-150, 2017.
- GOMES, N.C.M., FAGBOLA, O., COSTA, R., RUMJANEK, N.G., BUCHNER, A., MENDONA-HAGLER, L. AND SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3758–3766, 2003.
- GSALLER, F., EISENDLE, M., LECHNER, B.E., SCHRETTL, M., LINDNER, H., MÜLLER, D., GELEY, S. & HAAS, H. The interplay between vacuolar and siderophore-mediated iron storage in *Aspergillus fumigatus*. *Metallomics*, v. 4, p. 1262-1270, 2012.
- HAAS, H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. *Natural Products Reports*, v. 31, p. 1233-1490, 2014.
- HAMAYUN, M., KHANB, S.A., KHAN. A.L., AHMADE, N., NAWAZF, Y., SHERG, H. & LEE, I.J. Gibberellin producing *Neosartorya* sp. CC8 reprograms Chinese cabbage to higher growth. *Scientia Horticulturae*, v. 129, p. 347-352, 2011.
- HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I. & LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 43-56, 2004.
- HARMAN, G.E. *Trichoderma* - not just for biocontrol anymore. *Phytoparasitica*, v. 39, p. 103-108, 2011.

- HOSSAIN, M.M., SULTANA, F. & HYAKUMACHI, M. Role of ethylene signalling in growth and systemic resistance induction by the plant growth-promoting fungus *Penicillium viridicatum* in *Arabidopsis*. *Journal of Phytopathology*, v. 165, p. 432-441, 2017.
- HUSSEIN, K.A. & JOO, J.H. Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, v. 58, p. 847-855, 2015.
- JAROSZUK-SCISEL, J., KUREK, E. & TRYTEK, M. Efficiency of indoleacetic acid, gibberellic acid and ethylene synthesized in vitro by *Fusarium culmorum* strains with different effects on cereal growth. *Section Cellular and Molecular Biology*, v. 69, p. 281-292, 2014.
- KAMILOVA, F., KRAVCHENKO, L.V., SHAPOSHNIKOV, A.I., AZAROVA, T., MAKAROVA, N. & LUGTENBERG, B. Organic Acids, Sugars, and L-Tryptophane in Exudates of Vegetables Growing on Stonewool and Their Effects on Activities of Rhizosphere Bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 19, p. 250-256, 2006.
- KASAHARA, H., HANADA, A., KUZUYAMA, T., TAKAGI, M., KAMIYA, Y. & YAMAGUCHI, S. Contribution of the Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways to the Biosynthesis of Gibberellins in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 45188-45194, 2002.
- KHAN, S.A., HAMAYUN, M., KIM, H.Y., YOON, H.J., LEE, Y.J. & KIM, J.G. Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated strain of *Gliomastix murorum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, p. 829-833, 2009.
- KENDE, H. & ZEEVAART, J.A.D. The Five "Classical" Plant Hormones. *The Plant Cell*, v. 9, p. 197-121, 1997.
- KRAPP, A. Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 25, p. 115-122, 2015.
- KUMAR, N.V., RAJAM, K.S. & RANI, M.E. Plant Growth Promotion Efficacy of Indole Acetic Acid (IAA) Produced by a Mangrove Associated Fungi-*Trichoderma viride* VKF3. *V. 6*, p. 2692-2701, 2017.
- LAMDAN, N.L., SHALABY, S., ZIV, T., KENERLEY, C.M. & HORWITZ, B.A. Secretome of *Trichoderma* interacting with maize roots: role in Induced Systemic Resistance. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 14, p. 1054-1063, 2015.

- LEE, S., HUNG, R., YAP, M. & BENNETT, J.W. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. *Archives of Microbiology*, v. 197, p. 723-727, 2015.
- LEE, S., YAP, M., BEHRINGER, G., HUNG, R. & BENNETT, W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. *Fungal Biology and Biotechnology*, v. 3, p. 1-14, 2016.
- LEMFACK, M.C., GOHLKE, B-O., TOGUEM, S.M.T., PREISSNER, S., PIECHULLA, B. & PREISSNER, R. mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, v. 46, p. 261-265, 2017.
- LI, N., WANG, W., BITAS, V., SUBBARAO, K., LIU, X. & KANG, S. Volatile Compounds Emitted by Diverse *Verticillium* Species Enhance Plant Growth by Manipulating Auxin Signaling. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 31, p. 1021-1031, 2018.
- LI-HUA, C., JIN-HAIA, Z., XIAO-HOUA, S., SHAN-SHANA, S., ZHI-HENGA, Y., XIN-YUA, M. & TING-TING, C. Effects of *Trichoderma harzianum* T83 on *Suaeda salsa* L. in coastal saline soil. *Ecological Engineering*, v. 91, p. 58-64, 2016.
- MAFIA, R.G., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., FERREIRA, E.M., BINOTI, D.H.B. & MAFIA, G.M.V. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, p. 10-17, 2009.
- MASSENSINI, A.M, TÓTOLA, M.R, BORGES, A.C. & COSTA, M.D. Solubilização potencial de fosfatos mediada pela microbiota rizosférica de Eucalipto cultivado em topossequência típica da Zona da Mata Mineira. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 39, p. 692-700, 2015.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A., WEES, S.C.M.V. & PIETERSE, C.M.J. Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. *Plant, Cell and Environment*, v. 40, p. 2691-2705, 2017.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A., ALGUACIL, M.D.M, PASCUAL, J.A. & VAN WEES, S.C.M. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *Journal of Chemical Ecology*, v. 40, p. 804–815, 2014.
- MENDES, G.O., SILVA, N.M.R.M., ANASTÁCIO, T.C., VASSILEV, N.B., JÚNIOR, J.I.R., SILVA, I.R. & COSTA, M.D. Optimization of *Aspergillus niger* rock phosphate solubilization in solid-state fermentation and use of

- the resulting product as a P fertilizer. *Microbial Biotechnology*, v. 8, p. 930-939, 2015.
- MENDES, G.O., FREITAS, A.L.M., PEREIRA, O.L., SILVA, I.R., VASSILEV, N.B. & COSTA, M.D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. *Annals of Microbiology*, v. 64, p. 239-249, 2014a.
- MENDES, G.O., ZAFRA, D.L., VASSILEV, N.B., SILVA, I.R., JÚNIOR, J.I.R. & COSTA, M.D. Biochar Enhances *Aspergillus niger* Rock Phosphate Solubilization by Increasing Organic Acid Production and Alleviating Fluoride Toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, p. 3081-3085, 2014b.
- MENDES, G.O., VASSILEV, N.B., BONDUKI, V.H.A., SILVA, I.R., JÚNIOR, J.I.R. & COSTA, M.D. Inhibition of *Aspergillus niger* Phosphate Solubilization by Fluoride Released from Rock Phosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, p. 4906-4913, 2013a.
- MENDES, G.O., DIAS, C.S., SILVA, I.R., JÚNIOR, J.I.R., PEREIRA, O.L. & COSTA, M.D. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, p. 43-50, 2013b.
- MUKHERJEE, S. & SEN, S.K. Exploration of novel rhizospheric yeast isolate as fertilizing soil inoculant for improvement of maize cultivation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, p. 1491-1499, 2015.
- MURALI, M. & AMRUTHESH, K.N. Plant Growth-Promoting Fungus *Penicillium oxalicum* enhances Plant Growth and induces resistance in Pearl Millet against downy mildew disease. *Journal of Phytopathology*, v. 163, p. 743-754, 2015.
- MURALI, M., SUDISHA, J., AMRUTHESH, K.N., ITO, S.I. & SHETTY, H.S. Rhizosphere fungus *Penicillium chrysogenum* promotes growth and induces defence-related genes and downy mildew disease resistance in pearl millet. *Plant Biology*, v. 15, p. 111-118, 2013.
- NAGARAJU, A., MURALI, M., SUDISHA, J., AMRUTHESH, K.N. & MURTHY, S.M. Beneficial microbes promote plant growth and induce systemic resistance in sunflower against downy mildew disease caused by *Plasmopara halstedii*. *Current Botany*, v. 3, p. 12-18, 2012.
- NAZNIN, H.A., KIMURA, M., MIYAZAWA, M. & HYAKUMACHI, M. Analysis of Volatile Organic Compounds emitted by Plant Growth-Promoting Fungus *Phoma* sp. GS8-3 for growth promotion effects on Tobacco. *Microbes and Environments*, v. 28, p. 1-49, 2013.

- NAZNIN, H.A., KIYOHARA, D., KIMURA, M., MIYAZAWA, M., SHIMIZU, M. & HYAKUMACHI, M. Systemic Resistance Induced by Volatile Organic Compounds emitted by Plant Growth-Promoting Fungi in *Arabidopsis thaliana*. Plos One, v. 9, p. 1-10, 2014.
- OLIVEIRA, S.C., MENDES, G.O., SILVA, U.C., SILVA, I.R., JÚNIOR, J.I.R. & COSTA, M.D. Decreased mineral availability enhances rock phosphate solubilization efficiency in *Aspergillus niger*. Annals of Microbiology, v. 62, p. 745-751, 2015.
- OSKIERA, M., SZCZECH, M., STĘPOWSKA, A., SMOLIŃSKA, U. & BARTOSZEWSKI, G. Monitoring of Trichoderma species in agricultural soil in response to application of biopreparations. Biological Control, v. 113, p. 65-72, 2017.
- PATEL, D., PATEL, S., THAKAR, P. & SARAF, M. Siderophore Producing *Aspergillus* spp as bioinoculant for enhanced growth of mung bean. International Journal of Advanced Agricultural Sciences and Technology, v. 6, p. 111-120, 2017.
- PATKAR, R.N. & NAQVI, N.I. Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. PLoS Pathogens, v. 13, p. 1-5, 2017.
- PIETERSE, C.M.J. & DICKE, M. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. Trends in Plant Science, v. 12, p. 564-569, 2007.
- RIJAVEC, T. & LAPANJE, A. Hydrogen Cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1-14, 2016.
- SABA, H., VIBHASH, D., MANISHA, M., PRASHANT, K.S., FARHAN, H. & TAUSEEF, A. Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. Mycosphere, v. 3, p. 524-531, 2012.
- SALAZAR-CEREZO, S., MARTÍNEZ-MONTIEL, N., GARCÍA-SÁNCHEZ, J., PÉREZ-Y-TERRÓN, R. & MARTÍNEZ-CONTRERAS, R.D. Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. Microbiological Research, v. 208, p. 85-98, 2018.
- SALAS-MARINA, M.A., SILVA-FLORES, M.A., URESTI-RIVERA, E.E., CASTRO-LONGORIA, E., HERRERA-ESTRELLA, A. & CASAS-FLORES, S. Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. European Journal of Plant Pathology, v. 131, p. 15-26, 2011.

- SANTIAGO , T.R., GRABOWSKI, C., ROSSATO, M., ROMEIRO, R.S. & MIZUBUTI, E.S.G. Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. *Biological Control*, v. 80, p. 14-22, 2015.
- SCAGEL, C.F. & LINDERMAN, R.G. Relationship between differential in vitro indole-acetic acid or ethylene. *Symbiosis*, v. 24, p. 13–34, 1998.
- SCHMIDT, R., CORDOVEZ, V., BOER, W., RAAIJMAKERS, J. & GARBEVA, P. Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME Journal*, v. 9, p. 2329-2335, 2015.
- SCHMIDT, R., ETALO, D.W., JAGER, V., GERARDS, S., ZWEERS, H., BOER, W. & GARBEVA, P. Microbial Small Talk: Volatiles in Fungal–Bacterial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-12, 2016.
- SCHWYN, B. & NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, v. 160, p. 47-56, 1997.
- SEGARRA, G., ENT, S.V., TRILLAS, I. & PIETERSE, C.M.J. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biology*, v. 11, p. 90-96, 2009.
- SHIVANNA, M.B., MEERA, M.S. & HYAKUMACHI, M. Role of root colonization ability of plant growth promoting fungi in the suppression of take-all and common root rot of wheat. *Crop Protection*, v. 15, p. 497-504, 1996.
- SHORESH, M., YEDIDIA, I. & CHET, I. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene signaling pathway in the Systemic Resistance Induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, v. 95, p. 76-84, 2005.
- SIDDIQUEE, S., AZAD, S.A., BAKAR, F.A., NAHER, L. & KUMAR, S.V. Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultures of *Aspergillus niger* by GC–MS using two different capillary columns and solvents.
- SILVA, U.C., MENDES, G.O., SILVA, N.M.R.M., DUARTE, J.L., SILVA, I.R., TÓTOLA, M.R. & COSTA, M.D. Fluoride-Tolerant Mutants of *Aspergillus niger* Show Enhanced Phosphate Solubilization Capacity. *PLOS ONE*, v. 9, p. 1-9, 2014.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. Mycorrhizal symbiosis. Academic press, 2010.
- SINGH, B.N., SINGH, A., SINGH, S.P. & SINGH, H.B. *Trichoderma harzianum*- mediated reprogramming of oxidative stress response in root

- apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Pathology, v. 131, p. 121- 134, 2011.
- SINGH, B.K., MUNRO, S. REID, E., ORD, B., POTTS, J.M., PATERSON, E. & MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. European Journal of Soil Science, v. 57, p. 72-82, 2006.
- SPAEPEN S., VANDERLEYDEN J. & REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiology Reviews, v. 31, p. 425–448, 2007.
- TUCCI, M., RUOCCO, M., MASI, L., PALMA, M. & LORITO, M. The beneficial effect of *Trichoderma* spp. on tomato is modulated by the plant genotype. Molecular Plant Pathology, v. 12, p. 341-354, 2011.
- TRIVEDI, H.B., VALA, A.K. & DAVE, B.P. Production of Catecholate Siderophores by a Manglicolous fungus *Emericella nidulans*: A Novel Observation. Studies in Fungi, v. 1, p. 146-149, 2016.
- USHA,S. & PADMAVATHI, T. Effect of plant growth promoting microorganisms from rhizosphere of *Piper nigrum* L. International Journal of Pharma and Bio Sciences, v. 4, p. 835-846, 2013.
- VENTURI, V. & KEEL, C. Signaling in the Rhizosphere. Trends in Plant Science, v. 21, p. 187-198, 2016.
- VERMA, V.C., SINGH, S.K. & PRAKASH, S. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. Journal of Basic Microbiology, v. 51, p. 550-556, 2011.
- VITORINO L.C., BESSA L.A., CARVALHO L.G. AND SILVA F.G. Growth promotion mediated by endophytic fungi in cloned seedlings of *Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla* hybrids. African Journal of Biotechnology, v. 15, p. 2729-2738, 2016.
- VUJANOVIC, V., HAMELIN, R.C., BERNIER, L., VUJANOVIC, G & ST-ARNAUD, M. Fungal Diversity, Dominance, and Community Structure in the Rhizosphere of Clonal *Picea mariana* Plants Throughout Nursery Production Chronosequences. Microbial Ecology, v. 54, p. 672-684, 2007.
- YEDIDIA, I., SRIVASTVA, A.K., KAPULNIK, Y. & CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil, v. 235, p. 235–242, 2001.
- WAGG, C., BENDER, S.F., WIDMER, F. & VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem

- multifunctionality. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 111, p. 5266-5270, 2013.
- WANG, D., PAJEROWSKA-MUKHTAR, K., CULLER, A.H. & DONG, X. Salicylic Acid Inhibits Pathogen Growth in Plants through Repression of the Auxin Signaling Pathway. *Current Biology*, v.17, p. 1784–1790, 2007.
- WIEMANN, P., SIEBER, C.M.K., VON BARGEN, K.W., STUDDT, L., NIEHAUS, E-M., ESPINO, J.J., HUß, K., MICHELSE, C.B., ALBERMANN, S., WAGNER, D., BERGNER, S.V., CONOLLY, L.R., FISCHER, A., REUTER, G., KLEIGREWE, K., BALD, T., WINGFIELD, B.D., OPHIR, R., FREEMAN, S., HIPPLER, M., SMITH, K.M., BROWN, D.W., PROCTOR, R.H., MÜNSTERKÖTTER, M., FREITAG, M., HUMPF, H-U., GÜLDENER, U. & TUDZYNSKI, B. Deciphering the Cryptic Genome: Genome-wide Analyses of the Rice Pathogen *Fusarium fujikuroi* Reveal Complex Regulation of Secondary Metabolism and Novel Metabolites. *Pathogens*, v. 9, p. 1-35, 2013.
- WINKELMANN, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals*, v. 20, p. 379-392, 2007.
- ZÁLDUA, S. & SANFUENTES, E. Control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus globulus* mini-cuttings using *Clonostachys* and *Trichoderma* strains. *Chilian Journal of Agricultural Research*, v. 70, p. 576-582, 2010.
- ZAVALA-GONZALEZ, E.A., RODRÍGUEZ-CAZORLA, E., ESCUDERO, N., ARANDA-MARTINEZ, A., MARTÍNEZ-LABORDA, A., RAMÍREZ-LEPE, M., VERA, A. & LOPEZ-LLORCA, L.V. *Arabidopsis thaliana* root colonization by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* is modulated by jasmonate signaling and leads to accelerated flowering and improved yield. *New Phytologist*, v. 213, p. 351-364, 2017.
- ZHANG, F., YUAN, J., YANG, X., CUI, Y., CHEN, L., RAN, W. & SHEN, Q. Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. *Plant Soil*, v. 368, p. 433–444, 2013.
- ZHANG, R., VIVANCO, J.M. & SHEN, Q. The unseen rhizosphere root–soil–microbe interactions for crop production. *Current Opinion in Microbiology*, v. 37, p. 8-14, 2017.

**CAPÍTULO 2: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PLANT  
GROWTH PROMOTING FUNGI FROM THE EUCALYPTUS  
RHIZOSPHERE**

## ABSTRACT

Eucalyptus cultivation is an important economic activity in Brazil and is the basis for the production of several goods. The plantations, as any other agricultural activity, have challenges due to diseases occurrence and nutrient depleted soils. As a result, the productivity is negatively affected and the necessity of pesticides and fertilizers increases, resulting in high costs and environmental damages. Plant Growth Promoting Fungi are powerful tools that can increase the productivity through several growth promoting mechanisms, avoiding the excessive use of defensive chemicals and fertilizers. The aim of this study was to isolate PGPF from *Eucalyptus grandis* rhizosphere and to characterize their mechanisms of plant growth promotion. The rhizospheric soil samples were collected from *Eucalyptus grandis* roots cultivated at Sylviculture Sector of the Departamento de Engenharia Florestal, Federal University of Viçosa. The process of isolation resulted in 62 different isolates based on their colonies morphological characteristics. The isolates had their potential of growth promotion for *Eucalyptus grandis* tested *in vitro*. The most promising isolates had their promotion mechanisms evaluated. The results from the potential of promotion experiment evidenced the capacity of promotion by the isolates, presenting increment of total dry mass from 20 to 620 %. All isolates produced indole acetic acid, presenting amounts from 0.96 to 64.33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Gibberellins production was also detected for all isolates, which produced amounts from 10.67 to 30.89  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Considering the solubilization capacity, only one of the isolates selected was able to considerably solubilize phosphate sources, achieving values from 2 %, for iron phosphate, to 68 %, for calcium phosphate. All four isolated demonstrated hydroxamate-type siderophore production with values between 15 and 56.67  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In the volatile organic compounds (VOCs) experiment, only inhibitory effects on plant development were statistically significant. Therefore, the isolates have distinct potentialities to promote growth in eucalyptus, employing different mechanisms of promotion. The exploration of their potentials might result in new technologies applicable to enhance productivity in eucalyptus cultivations.

## INTRODUCTION

Eucalyptus cultivation is an important economic activity in Brazil, since this genus is the basis for the production of several goods, including products for exportation, such as paper, cellulose, wood panels, charcoal, among others. The planted area with eucalyptus occupies 5.7 million hectares and is concentrated especially in Minas Gerais, São Paulo, and Mato Grosso do Sul (IBA, 2017).

As any other agricultural activity, the occurrence of diseases and the use of soils depleted in nutrients cause economic losses and increase the demand for the application of fertilizers and pesticides. Consequently, besides the economic losses, the excessive use of pesticides and fertilizers can result in serious damages for the environment. Therefore, it becomes paramount the development of new technologies capable of increasing plant productivity, with less environmental damages and production costs (Harman et al., 2004; Saba et al., 2012).

The use of soil microorganisms to deal with these recurrent problems issues is a promising tool, once it allows higher productivity with lesser financial investments and lower levels of environmental disturbance. Two distinct groups of microorganisms are already recognized as plant growth promoters: plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and plant growth promoting fungi (PGPF) (Gupta et al., 2015).

Fungi are especially important because of the roles they play in soil ecosystems, including nutrient cycling, organic matter decomposition and plant diseases suppression. They can benefit the plants through different mechanisms, such as the production of phytohormones and enzymes, solubilization of phosphate and potassium minerals, induction of systemic resistance (ISR), production of siderophores and emission of volatile compounds (Gupta et al., 2015).

Soil fungi strongly influence terrestrial ecosystems dynamics, playing important roles to soil structure and fertility. The plants are constantly impacted by harmful organisms, such as insects and pathogenic microorganisms, and beneficial organisms, such as fungi and bacteria, which can promote growth through direct mechanisms or acting as biocontrol

agents. The majority of plant growth promoter fungi are in the rhizosphere, region where soil is directly influenced by plant roots. The interaction between plants and beneficial fungi is mostly based on nutrients exchange and defense against pathogenic microorganisms (Yedidia et al., 2001; Singh et al., 2006; Vujanovic, 2007).

Beyond the biotic influences, abiotic factors are also considerably important to fungi and plant interactions. The soil characteristics also influence the dynamic and complex net of signaling in the rhizosphere, which mediates interactions not only between plants and fungi, but also between all soil microorganisms (Gomes et al., 2003; Venturi and Keel, 2016; Zhang et al, 2017).

The aim of this study was to isolate and characterize Plant Growth Promoting Fungi from *E. grandis* rhizosphere, focusing on the main mechanisms which these fungi use to benefit plants.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Isolation of PGPF from eucalyptus rhizosphere**

The rhizosphere soil samples were collected from *E. grandis* at the Sylviculture Sector of the Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais (Geographic coordinates: S 20°46'11.704" W 42°52'34.677"). The plantation soil was chemically and physically characterized (Table 1). The eucalyptus roots were harvested and the soil particles strongly attached to them were collected in a sterilized Petri dish. A composite sample was made with rhizosphere soil from seven different trees. In the laboratory, the composite samples were mechanically homogenized with a spatula and suspended in NaCl 0.85% at 1:10 (soil:saline solution) to prepare serial dilutions till  $10^{-5}$ . Aliquots of 0.1 mL from each dilution were plated onto two different media, Corn Meal Agar (Sigma) and Czapek-Dox (Sigma), both supplemented with streptomycin at  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The Petri dishes were incubated at 30 °C. The colonies with distinct morphological features were selected and transferred to new Petri dishes with Potato Dextrose Agar (Sigma). The colonies were replicated to

**Table 1.** Textural and chemical soil composition from eucalyptus forest located at Sylviculture Sector of the Departamento de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

<b>Eucalyptus forest</b>										
<b>Mineral Fraction (%)</b>										
<b>Fine sand</b>		<b>Coarse sand</b>		<b>Silt</b>		<b>Clay</b>		<b>Texture</b>		
11		30		6		53		Clayey		
<b>Chemical Analysis</b>										
<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>K<sup>+</sup></b>	<b>H+Al</b>	<b>Al<sup>3+</sup></b>	<b>Ca<sup>2+</sup></b>	<b>Mg<sup>2+</sup></b>	<b>CTC total</b>	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>MO</b>
H <sub>2</sub> O	mg dm <sup>-3</sup>		cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>				%		dag Kg <sup>-1</sup>	
4.47	1.4	3	8.2	1.69	0.33	0.23	8.77	6.5	74.8	4.00

fresh media at least three times to ensure the isolate's purity. The colonies recognized as phytopathogens were discarded.

### **Plant growth promotion activity of rhizospheric fungal isolates**

Eucalyptus seedlings were obtained by the germination of superficially disinfected seeds in filter paper. For disinfection, *E. grandis* seeds were immersed for 1 minute in 70% ethanol for 3 min and rinsed with sterilized distilled water, followed by immersion in 20% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 7 minutes. After disinfection, the seeds were washed five times with sterilized distilled water and disposed in Petri dishes lined with moistened sterilized filter paper with 2.5 mL of sterilized distilled water. The plates were incubated at 30 °C, with 12 hours of photoperiod, until the appearance of the first pair of leaves. The eucalyptus seedlings were transferred to glass recipients with 350 g of acid-washed sand previously sterilized and moistened with 20 mL of Clark solution (Clark, 1975).

Colonies from 62 fungal isolates were cultivated for 10 days, in potato dextrose agar (PDA) at 30 °C and three agar discs of 6 mm with fungal mycelium were extracted from these colonies and inoculated on the seedlings roots during transplanting to recipients with sand. A control group, without fungal inoculation, was also kept in the experiment. The experimental plot consisted of one glass recipient with one *E. grandis* plant. The flasks were maintained 60 days at 28 °C, with 12 hours photoperiod. The loss of water was checked every 3 days and Clark solution was added considering the limit of 60 % of of the water holding capacity of the sand as established previously. After 60 days of growth, the plants were collected and morphological features were measured: shoot and root dry matter, plant height and foliar area.

The experiment was set up in a completely randomized design, with 62 different isolates with three repetitions for each one. A control group with no fungal inoculation was kept. The data obtained were submitted to ANOVA and the means grouped by Scott-Knot test.

## **Plant growth promotion mechanisms expressed by PGPF *in vitro***

Based on the results of the growth promotion experiment described above, three fungal isolates (FUNG15, FUNG17 and FUNG19) were selected as the most promising plant promoters, considering their higher performance in plant total dry matter (shoot and root dry matter) *in vitro*. Additionally, an isolate characterized as non-promoter fungus (F9) was selected to contrast its performance with the promoter fungi during the promotion mechanisms experiments.

The evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production consisted in the extraction of three discs containing the fungal mycelium from colonies growing in PDA for 7 days at 30 °C, and inoculation in flasks with 50 mL of Czapek-Dox enriched with L-tryptophan at 5 mmol L<sup>-1</sup>. The flasks were kept under agitation at 180 rpm and 28 °C for 7 days. The supernatant was collected, centrifuged for 15 minutes at 7,000 *g*. The detection of IAA followed the method of Salkowski reagent (Bric et al., 1991). The tubes received 1 mL of the supernatant and 1 mL of Salkowski reagent. After 30 minutes of reaction the samples were read in a spectrophotometer at 540 nm, based on a calibration curve of IAA with concentrations ranging from 0 to 100 µg mL<sup>-1</sup>.

For gibberellin quantification, three discs containing the fungal mycelium from colonies growing in PDA for 7 days at 30 °C were extracted and inoculated in flasks containing 25 mL of Simmon and Tessman medium (Simon & Tessman, 1963). The flasks were incubated for 10 days under 130 rpm and 28 °C. The supernatant was collected and centrifuged for 5 minutes at 3,360 *g*. Aliquots of 1 mL were added to 3 mL of Folling-Wu reagent (Graham & Henderson, 1961). The reaction was kept in a water bath at 100° C for one hour and cooled in an ice bath until room temperature. The color obtained was read by spectrophotometry at 780 nm, using as reference a calibration curve of gibberellic acid (Sigma) with concentrations ranging from 0 to 100 µg mL<sup>-1</sup>.

The isolates also had their capabilities of phosphate solubilization tested for four different phosphorous (P) sources: tricalcium phosphate, iron phosphate, aluminum phosphate and Patos de Minas phosphate. Similarly to

the experiments described above, three discs from the colonies were inoculated in 50 mL of NBRIP medium (Nautiyal, 1999) with the respective phosphate at 3 g L<sup>-1</sup>. The flasks were incubated for 7 days at 28 °C under agitation of 150 rpm. The supernatant was collected and filtered in filter paper with 8-µm pores. The determination of soluble phosphorus was made by colorimetric method (Braga & Defelipo, 1974). The fungal biomass was determined through mycelium drying at 105 °C until constant weight, followed by incineration for 6 hours at 500 °C in a muffle, so that phosphate particles that remained attached to the mycelium could be calculated and discounted.

Siderophore production was also determined using three discs of 6 mm from the colonies and inoculated into 25 mL of CAA liquid medium enriched with succinic acid (Cabellero-Mellado et al., 2007). The flasks were incubated during 5 days at 28 °C under agitation at 130 rpm. After this period, three discs of 3 mm were extracted from the mycelium and transferred to CAA-CAS solid medium. The plates were incubated for 7 days at 28 °C, and after this period, the appearance of yellow halos around the colonies was used as an indication of hydroxamate-type siderophore production. Three discs from the colonies which responded positively to the CAS test were inoculated in 25 mL of Simoon and Tessman medium (Simon & Tessman, 1963) and incubated for 10 days at 28 °C under agitation of 130 rpm. The samples were centrifuged at 13,000 g and the supernatant collected to quantify siderophore production by the tetrazolium method (Snow, 1954). The calibration curve used as reference was made with hydroxylammonium chloride with concentrations ranging from 0 to 100 mg L<sup>-1</sup>. The reaction occurred combining 1 mL of the supernatant with 1 mL of the reagent. After the period of reaction, the mixture was read in spectrophotometry at 420 nm.

For volatile organic compound production, one plastic plate with two separated sectors received in one of them solid Clark solution with one eucalyptus seedling and the other sector received potato dextrose agar and a 6-mm diameter disc from the fungal isolates. Therefore, each plate contained one plant and one fungal isolate. A control group, with no fungal inoculation, was kept and used as a reference for the analyses. The plants were obtained from seeds, using the same procedures of disinfection and germination as

described before. The plates were sealed with several layers of plastic film to ensure that the volatile compounds produced by the fungal isolates remained in contact with the plant. The plates were incubated for 45 days at 30 °C with 12 hours of photoperiod. At the end of the experiment, the plant morphological features were measured, including plant height, number of leaves, total dry matter and number of lateral roots.

The experiments were conducted in completely randomized design with three replications. Data from the experiments on the mechanisms plant growth promotion were submitted to analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). For the phosphate experiment, data were submitted to Factorial ANOVA followed by the Tukey test ( $p < 0.05$ ) and correlation analysis by T test ( $p < 0.05$ ). For the experiment on the production of volatile organic compounds, the statistical tests applied were Kruskal-Wallis test followed by Wilcoxon rank sum test due to data did not follow the normal distribution.

## **RESULTS**

### **Isolation of PGPF from eucalyptus rhizosphere**

The isolation process resulted in the selection of 62 different fungal isolates for the plant growth promotion experiment *in vitro*. The isolates were successively replicated to ensure purity and were distinguished based on colony morphological characteristics.

### **Plant growth promotion activity of rhizospheric fungal isolates**

After 60 days of growth, the morphological features of eucalyptus plants from 56 different treatments (55 fungal isolates and control group) were measured and the values were submitted to statistical analyses. Plants from the other 7 treatments died during the experiment and could not be included.

The results evidenced consistent increase in dry matter, varying from 20 to 620 %, compared to the control (Table 2; Figure 1). The isolates that

achieved higher values were FUNG15, FUNG17 and FUNG19, presenting increases of 620 %, 480 % and 440 %, respectively.

Considering plant height, there were increases caused by the isolates from 3 to 91.09 %. FUNG19, FUNG20 and FUNG25 led to the higher values of growth, achieving 91.09 %, 86.61 % and 85.85 %, respectively (Table 2).

For leaf area, FUNG15, FUNG17 and FUNG19 were also responsible for highest values observed, achieving increases of 909.74 %, 630.60 % and 577.88 %, respectively. The rest of the isolates presented increases in leaf area from 3 to 528.94 % compared to control group (Table 2).

Increases in shoot dry matter varied from 33.33 to 666.67 %. Higher values were achieved by FUNG15, FUNG17 and FUNG19, and corresponded to 666.67 %, 600 % and 600 %, respectively (Table 2). However, considering root dry matter, increases varied from 50 to 550 %, and the best isolates were FUNG15, with 550 %, followed by FUNG9 and FUNG17, both presenting increases of 350 % (Table 2).

Total dry matter was used as the main criteria for selecting the fungi with higher potential for plant growth promotion, even though the majority of the isolates that presented higher values for one of the variables also presented the highest values for the others. The three best isolates, FUNG15, FUNG17, and FUNG19, were considered as growth promoters (Table 2; Figure 1) and were selected for the investigation on the growth promotion mechanisms expressed *in vitro*. Additionally, the isolate F9, considered as a non-promoter fungus, was also selected.

## **Plant growth promotion mechanisms expressed by PGPF *in vitro***

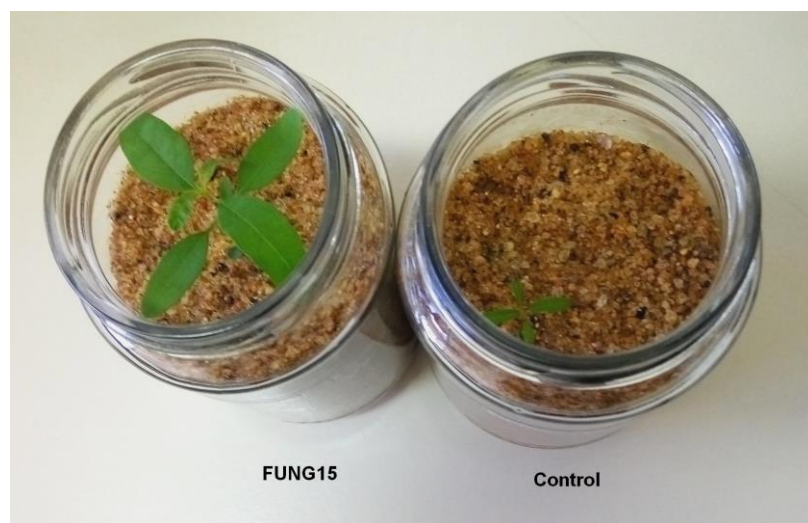
### **Indole acetic acid production**

Indole acetic acid production varied from 0.96 to 64.33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . FUNG17 showed the highest IAA production, followed by FUNG19, FUNG15, and F9 (Figure 2).

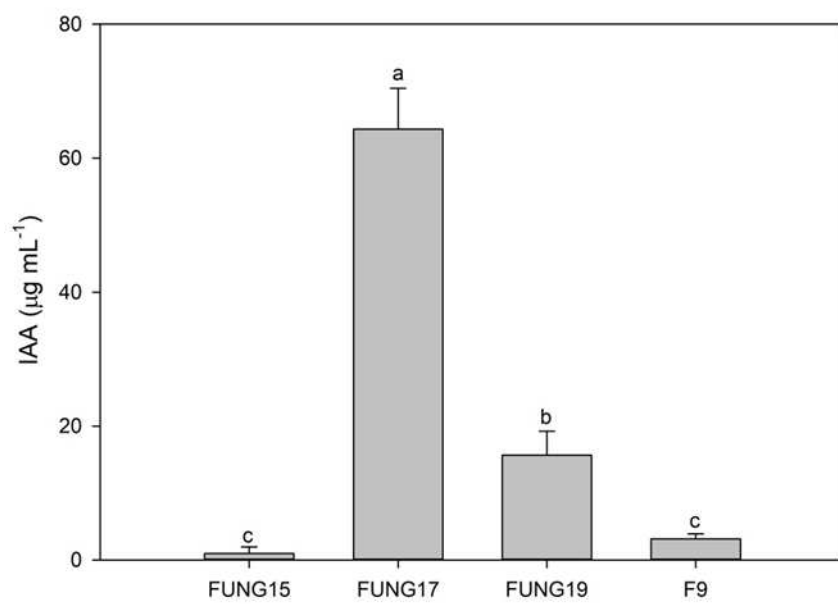
**Table 2.** Total dry matter (TDM), plant height (H), leaf area (LA), shoot dry matter (SDM), and root dry matter (RDM) of *Eucalyptus grandis* inoculated with different rhizospheric isolates and grown for 60 day at 28 °C and 12 h of photoperiod. The table indicates the percentages of increase (%) to each variable in relation to control group.

Treatments	TDM (mg)	%	H (cm)*	%	LA (cm <sup>2</sup> )	%	SDM (mg)	%	RDM (mg)	%					
CONTROL	5.00	b	0	2.23	b	0	1.51	b	0	3.00	b	0	2.00	c	0
FUNG15	36.00	a	620	3.67	a	64	15.25	a	910	23.00	a	667	13.00	a	550
FUNG17	29.00	a	480	3.87	a	73	11.03	a	631	21.00	a	600	9.00	b	350
FUNG19	27.00	a	440	4.27	a	91	10.24	a	578	21.00	a	600	7.00	b	250
FUNG9	27.00	a	440	3.83	a	72	7.93	a	425	18.00	a	500	9.00	b	350
FUNG20	26.00	a	420	4.17	a	87	8.34	a	452	17.00	a	467	8.00	b	300
FUNG25	24.00	a	380	4.15	a	86	7.39	a	389	17.00	a	467	7.00	b	250
FUNG22	23.00	a	360	3.93	a	76	7.41	a	391	16.00	a	433	8.00	b	300
AP3.1	23.00	a	360	3.43	a	54	7.50	a	397	18.00	a	500	5.00	c	150
AP1.7	23.00	a	360	3.63	a	63	7.73	a	412	18.00	a	500	5.00	c	150
AP2.1	22.00	a	340	3.40	a	52	7.40	a	390	17.00	a	467	6.00	b	200
FUNG3	22.00	a	340	4.10	a	84	8.40	a	457	17.00	a	467	5.00	c	150
AP4.1	20.00	a	300	3.40	a	52	6.67	a	342	14.00	a	367	7.00	b	250
AP1.1	19.00	a	280	3.17	a	42	6.08	a	303	13.00	a	333	6.00	b	200
ESP4	17.00	a	240	3.13	a	40	5.85	a	287	12.00	a	300	5.00	c	150
FUNG2	17.00	b	240	2.90	b	30	9.50	a	529	13.00	a	333	3.00	c	50
AP9	16.00	b	220	2.90	b	30	5.23	b	247	11.00	b	267	5.00	c	150
AP2.3	15.00	b	200	2.63	b	18	4.44	b	194	10.00	b	233	5.00	c	150
AP1.6	15.00	b	200	2.60	b	16	5.42	b	259	11.00	b	267	3.00	c	50
ESP10	14.00	b	180	3.80	a	70	5.74	a	280	10.00	b	233	5.00	c	150
FUNG1	14.00	b	180	3.40	a	52	5.88	a	289	11.00	b	267	3.00	c	50
F11	14.00	b	180	3.93	a	76	6.37	a	322	11.00	b	267	3.00	c	50
AP11	14.00	b	180	3.10	a	39	4.91	b	225	11.00	b	267	3.00	c	50
F21	14.00	b	180	3.27	a	46	6.95	a	360	10.00	b	233	4.00	c	100
CLAD4	13.00	b	160	3.40	a	52	3.31	b	119	9.00	b	200	4.00	c	100
AP12	13.00	b	160	3.20	a	43	5.14	b	240	9.00	b	200	4.00	c	100
AP6	12.00	b	140	2.90	b	30	4.44	b	194	9.00	b	200	3.00	c	50
CLAD2	11.00	b	120	2.50	b	12	3.66	b	143	7.00	b	133	4.00	c	100
ESP8	11.00	b	120	3.60	a	61	4.35	b	188	8.00	b	167	3.00	c	50
FUNG16	11.00	b	120	2.55	b	14	3.49	b	131	7.00	b	133	4.00	c	100
ZYGO	11.00	b	120	2.73	b	22	3.28	b	117	7.00	b	133	3.00	c	50
AP2.2	10.00	b	100	2.23	b	0	3.16	b	109	6.00	b	100	4.00	c	100
FUNG8	10.00	b	100	2.95	b	32	3.57	b	137	7.00	b	133	3.00	c	50
ESP20	10.00	b	100	2.87	b	28	3.71	b	145	7.00	b	133	3.00	c	50
ESP11	10.00	b	100	2.53	b	13	3.63	b	141	6.00	b	100	4.00	c	100
F15	10.00	b	100	2.87	b	28	5.71	a	278	8.00	b	167	2.00	c	0
ESP7	10.00	b	100	3.03	b	36	5.11	b	239	7.00	b	133	2.00	c	0
ESP6	9.00	b	80	2.70	b	21	2.97	b	97	6.00	b	100	4.00	c	100
FUNG21	9.00	b	80	2.40	b	7	3.44	b	128	5.00	b	67	4.00	c	100
FUNG5	9.00	b	80	2.75	b	23	3.62	b	140	7.00	b	133	2.00	c	0
ESP3	8.00	b	60	2.13	b	-4	3.16	b	110	5.00	b	67	3.00	c	50
F14	8.00	b	60	2.17	b	-3	2.83	b	87	5.00	b	67	4.00	c	100
ESP1	8.00	b	60	2.43	b	9	2.69	b	78	6.00	b	100	2.00	c	0
F19	8.00	b	60	2.50	b	12	3.27	b	117	6.00	b	100	2.00	c	0
ESP9	8.00	b	60	2.77	b	24	2.64	b	75	5.00	b	67	3.00	c	50
AP1.3	8.00	b	60	2.17	b	-3	2.28	b	51	6.00	b	100	2.00	c	0
F16	8.00	b	60	3.10	a	39	3.22	b	113	6.00	b	100	2.00	c	0
AP1.9	7.00	b	40	2.37	b	6	2.50	b	66	5.00	b	67	2.00	c	0
F5	7.00	b	40	2.45	b	10	3.25	b	115	4.00	b	33	2.00	c	0
CLAD1	6.00	b	20	2.60	b	16	1.76	b	17	4.00	b	33	2.00	c	0
FUS3	6.00	b	20	2.60	b	16	2.91	b	93	4.00	b	33	2.00	c	0
CLAD3	5.00	b	0	1.97	b	-12	1.57	b	4	3.00	b	0	3.00	c	50
F9	5.00	b	0	2.33	b	4	1.95	b	29	3.00	b	0	2.00	c	0
FUS2	5.00	b	0	2.53	b	13	2.57	b	70	4.00	b	33	2.00	c	0
F3	4.00	b	-20	1.90	b	-15	1.74	b	15	2.00	b	-33	2.00	c	0
FUS1	4.00	b	-20	2.30	b	3	1.80	b	19	3.00	b	0	1.00	c	-50

The lowercase letters indicate the grouping by Scott-Knott test ( $p < 0.01$ ), except for height ( $p < 0.1$ ), according to the effects of each isolate caused to plants.



**Figure 1.** *Eucalyptus grandis* plantlet inoculated with the rhizospheric fungal isolate FUNG15 (left) and uninoculated control plant (right) after 45 days of growth at 28 °C and 12 h of photoperiod.



**Figure 2.** Means of indole acetic acid (IAA) production by *Eucalyptus grandis* rhizospheric fungal isolates grown in Czapek Dox medium at 28 °C for 7 days. Columns with the same lowercase letter are not significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The bars represent standard deviation.

## **Gibberellin production**

The evaluation of gibberellin production revealed that all four fungal isolates tested produced this phytohormone, with final gibberellin concentrations in the medium that varied from 10.67 to 30.89  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figure 3). Isolates F9, FUNG15, and FUNG17 were the most efficient at gibberellin production (Figure 3).

## **Phosphate solubilization**

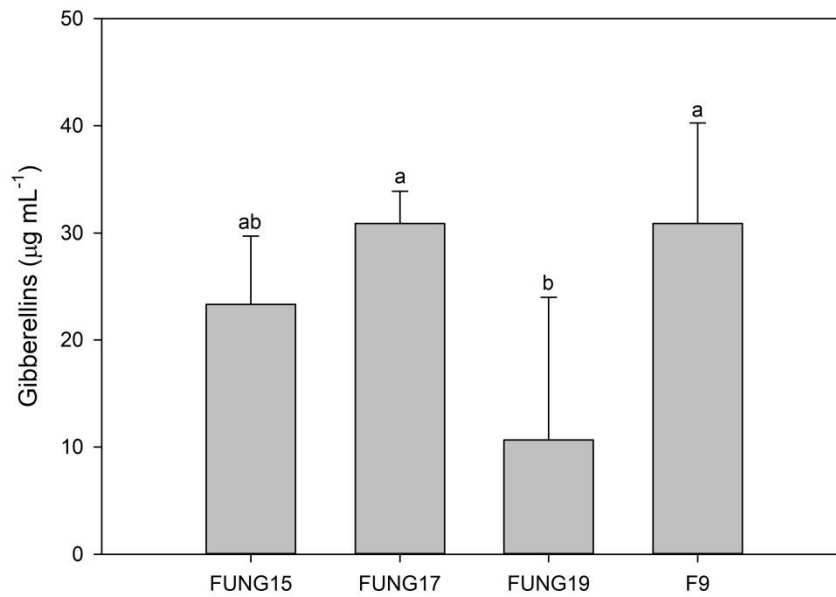
All the fungal isolates were capable of solubilizing the phosphates tested (Table 3). The amount of P released in the medium was influenced by the fungal isolate and phosphate type (Table 3).

The lower values of P solubilization were measured for Fe phosphate and the highest for Ca phosphate (Table 3). F9 and FUNG17 presented low values of P solubilization for all phosphates tested. The isolate FUNG15 presented low capacity of solubilization and immobilized P when the source was iron phosphate (Table 3).

It was possible to notice that pH varied significantly not only with the phosphate types, but especially according to the fungal isolate (Table 3). The isolate FUNG19 was capable of decreasing significantly the pH of the medium to about 2.0 for all the four phosphates tested. However, FUNG15 expressed the capacity to acidify the medium, but in a lower level, demonstrating significant differences between phosphates types. FUNG17 and F9 reduced slightly the medium pH (Table 3).

The different types of phosphate had no effect on titratable acidity produced by FUNG15 and F9, and only Al phosphate influenced the acidity produced by FUNG17 (Table 3). In contrast, acidity produced by the isolate FUNG19 was strongly influenced by the type of phosphate and achieved levels considerably higher than the other isolates (Table 3).

Fungal biomass was discretely impacted by the phosphate type for two isolates (FUNG17 and FUNG19). FUNG15 represented the highest values of biomass and did not vary with different phosphates sources, while



**Figure 3.** Means of gibberellin production by *Eucalyptus grandis* rhizospheric fungal isolates grown in Simmon and Tessman medium at 28 °C for 10 days. Columns with the same lowercase letters are not significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The bars represent standard deviation.

**Table 3.** Solubilized P, percentage of solubilization, medium pH, titratable acidity and biomass measured in NBRIP medium supplemented with different phosphate sources after the cultivation of rhizospheric fungal isolates for 7 days at 28° C and 150 rpm.

Phosphate	Fungal Isolate			
	Fung15	Fung17	Fung19	F9
	<b>Solubilized P (mg L<sup>-1</sup>)</b>			
Iron (FePO <sub>4</sub> )	-2.68 Cb	9.93 Aab	14.87 Da	-2.11 Ab
Alluminium (AlPO <sub>4</sub> )	11.94 Bb	0.92 Ab	89.30 Ca	4.36 Ab
Calcium (Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	84.07 Ab	5.94 Ac	408.54 Aa	-0.13 Ac
Patos Natural Phosphate	21.21 Bb	4.69 Ac	149.44 Ba	4.79 Ac
Mean	28.64	5.37	165.54	1.73
CV (%)	11.64			
	<b>Solubilization (%)</b>			
Iron (FePO <sub>4</sub> )	-0.54 Cb	2.00 Aab	2.99 Da	-0.42 Ab
Alluminium (AlPO <sub>4</sub> )	1.57 Cb	0.12 Ab	11.72 Ca	0.57 Ab
Calcium (Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	14.03 Ab	0.99 Ac	68.18 Aa	-0.02 Ac
Patos Natural Phosphate	4.91 Bb	1.09 Ac	34.59 Ba	1.11 Ac
Mean	4.99	1.05	29.37	0.31
CV (%)	13.11			
	<b>pH</b>			
Iron (FePO <sub>4</sub> )	2.50 Dc	2.67 Db	2.10 Ad	3.31 Da
Alluminium (AlPO <sub>4</sub> )	2.84 Cc	3.13 Cb	2.25 Ad	4.19 Ca
Calcium (Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	3.93 Ac	5.27 Ab	2.62 Ad	5.90 Aa
Patos Natural Phosphate	3.71 Bb	4.42 Ba	2.72 Ac	4.47 Ba
Mean	3.25	3.87	3.19	4.47
CV (%)	2.02			
	<b>Titratable Acidity (mmol H<sup>+</sup> L<sup>-1</sup>)</b>			
Iron (FePO <sub>4</sub> )	9.9 Ab	4.9 Bc	29.8 Ca	4.9 Ac
Alluminium (AlPO <sub>4</sub> )	9.9 Ab	9.9 Ab	34.8 Ba	4.9 Ac
Calcium (Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	9.9 Ab	4.9 Bc	69.7 Aa	4.9 Ac
Patos Natural Phosphate	9.9 Ab	4.9 Bc	34.8 Ba	4.9 Ac
Mean	9.9	6.2	42.3	4.9
CV (%)	0			
	<b>Biomass (mg)</b>			
Iron (FePO <sub>4</sub> )	140 Aa	70 ABb	120 Aa	20 Ac
Alluminium (AlPO <sub>4</sub> )	160 Aa	80 Ab	60 Bb	10 Ac
Calcium (Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	150 Aa	40 Bb	60 Bb	10 Ac
Patos Natural Phosphate	170 Aa	50 ABb	40 Bbc	10 Ac
Mean	160	60	70	10
CV (%)	20.42			

Means followed by the same capital letter in the columns and small letter in the lines are not significantly different by Tukey test ( $p < 0.05$ ).

isolate F9 presented a very low value of biomass with no variation between the treatments (Table 3).

There was negative correlation between pH and titratable acidity (-0.5322), while titratable acidity positively correlated with solubilized P (0.9137) and solubilization (0.6643). Additionally, solubilized P correlated positively with solubilization (0.6648).

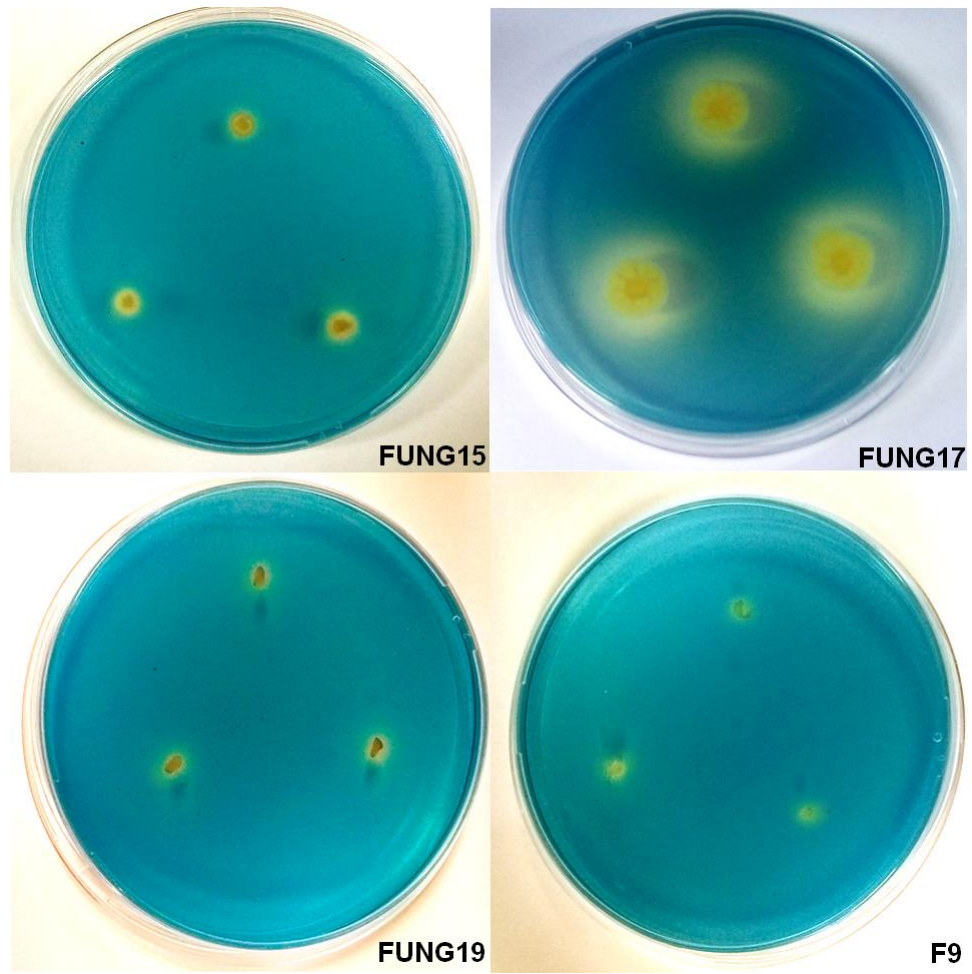
### **Siderophore production**

The qualitative CAS solution method revealed that all isolates tested produced siderophores. The yellow halo formed around the colonies indicated the production of hydroxamate-type siderophores (Figure 4).

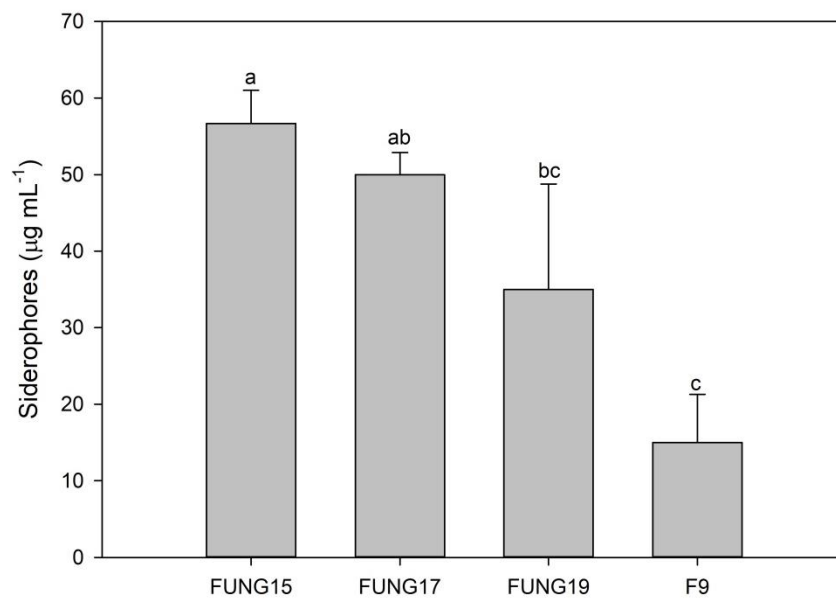
As all the isolates demonstrated the capacity of hydroxamate-type siderophores synthesis, the quantitative experiment was carried out, revealing different levels of production of siderophores by the fungi (Figure 5). FUNG15 presented the highest level of siderophore production, with a final concentration in the medium of  $56.67 \mu\text{g mL}^{-1}$ , while FUNG17 led to  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . The isolates FUNG19 and F9 were able to produce  $35 \mu\text{g mL}^{-1}$  and  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively (Figure 5).

### **Production of volatile organic compounds**

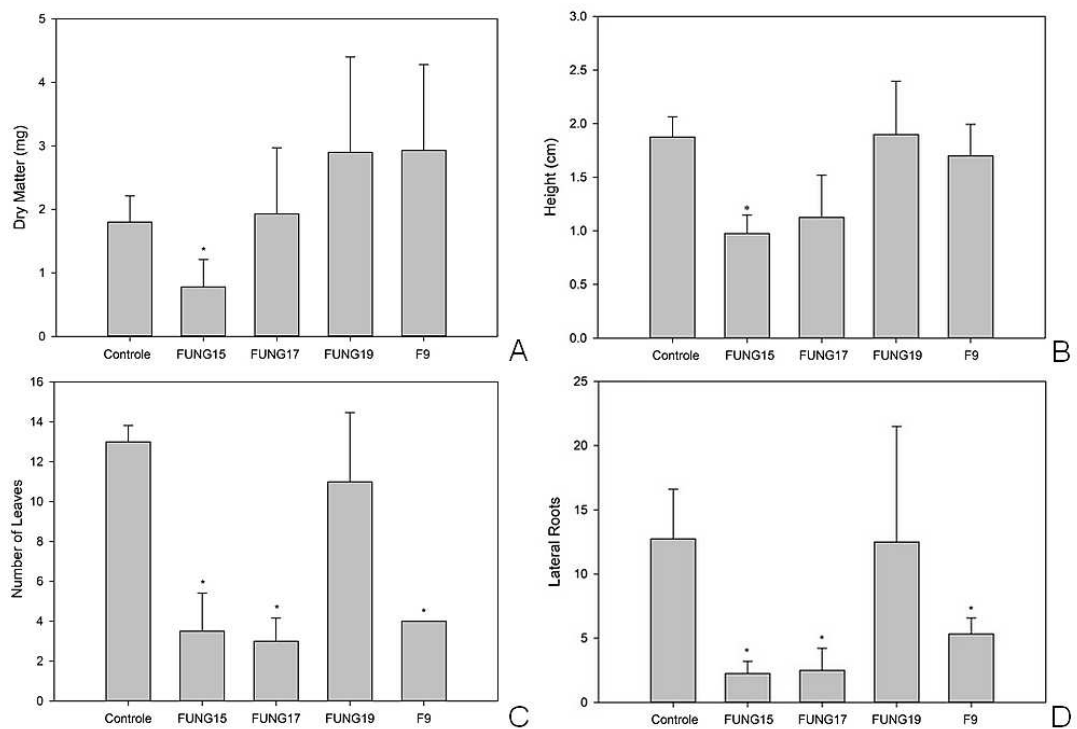
For the production of volatile organic compounds, the variables measured presented high variation between treatment replications. No statistically significant positive effects of the fungal presence on plant could be observed (Figure 6). However, FUNG15 caused significant decreases for all the four plant features considered in the experiment, while the isolates FUNG17 and F9 caused negative impacts only in plant lateral roots and number of leaves (Figure 6). Additionally, the isolate FUNG19 did not cause significant effects on plant development (Figure 6).



**Figure 4.** Detection of hydroxamate-type siderophores production by the fungal isolates by the Chrome Azurol S assay (CAS).



**Figure 5.** Means of hydroxamate-type siderophore production by *Eucalyptus grandis* rhizospheric fungal isolates grown in Simmon and Tessman medium at 28 °C for 10 days. Columns with the same lowercase letter are not significantly different by the Tukey test ( $p < 0.05$ ). The bars represent standard deviation.



**Figure 6.** Volatile compounds effects on *Eucalyptus grandis* (A) dry matter, (B) height, (C) number of leaves and (D) lateral roots. The volatile compounds were produced by the rhizospheric fungal isolates grown in Potato Dextrose Agar for 45 days at 30 °C and 12 h photoperiod. \* Statistical difference compared to control group (reference) by Wilcoxon rank sum test at 5%. The bars represent standard deviation.

## DISCUSSION

Considering the results from the promotion test *in vitro*, it is possible to notice that the isolates promoted growth through different mechanisms. FUNG17 exhibited higher values in production of phytohormones, which might explain the increases in dry matter and leaves development (Table 2; Figure 2; Figure 3). On the other hand, isolate FUNG19 did not produce high amounts of phytohormones *in vitro*, but it was the most efficient in phosphate solubilization, also produced siderophores and it was the only isolate which did not impacted negatively plant development on the volatile compounds experiment (Table 2; Table 3; Figure 6). FUNG15 performance might be influenced by gibberellins and siderophores production (Table 2; Figure 5).

It is important to establish that despite of the useful indication provided by *in vitro* mechanisms experiments, for all isolates, when in contact with the plant the fungi performance might change. Additionally, the higher values in dry matter, height and leaf area caused by the isolates probably were achieved through these mechanisms discussed in this work, but additional mechanisms might be also influencing plant development (Table 2).

In our study, the isolates presented IAA values that ranged from 0.96 to 64.33  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , coherent with most of the published studies using similar methodology. The amount of indole acetic acid produced by fungi is variable according to the fungal species and cultivation conditions (Tsavkelova et al., 2012; Chowdappa et al., 2013). The isolate FUNG17 was the most efficient at producing IAA and the amount produced was higher than values that are generally reported in the literature (Chowdappa et al., 2013; Hussain and Joo, 2015). However, IAA production of 115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was recorded for a *Trichoderma* isolate grown under similar conditions (Kumar et al., 2017). Indole acetic acid is an auxin recognized not only for its role in plant development, but also as an important signaling molecule for plant-microorganism interactions. Therefore, microorganisms with the capacity of producing considerable amounts of this phytohormone have a greater potential to affect plant development positively, acting in physiological process, stimulating plant growth, regulating plant responses and genic

expression (Contreras-Cornejo et al., 2009; Martínez-Medina et al., 2014; Patkar and Naqvi, 2017).

All four isolates tested in this study were capable of producing gibberellins in amounts that varied from 10.67 to 30.89  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The amounts of gibberellins produced by different fungal isolates is variable, this compound is strongly associated to plant growth promotion. Gibberellins action is associated to degradation of DELLA proteins in plants, which suppress plant growth. The phytohormone link DELLA proteins and allows the action of proteases, changing genic expression and resulting in cell elongation (Khan et al., 2009; Chowdappa et al., 2013; Salazar-Cerezo et al., 2018). Gibberellins are also recognized as important molecules that can be produced by fungi and affect positively plant growth, influencing germination, aerial development, senescence, among other processes. Additionally, gibberellins can be important for fungi pathogenicity and affect plant defense systems (Hamayun et al., 2011; Bhattacharya et al., 2012; Wiemann et al., 2013). Our study did not distinguish the different types of gibberellins that may be produced by fungi. Thus, the total amounts of gibberellins produced by the isolates are not necessarily bioactive. Further investigations are necessary to determine the types of gibberellins produced and their role in *E. grandis* growth.

Considering the results from the solubilization experiment, the four isolates tested presented different performances. The isolate FUNG19 was the most efficient, demonstrating a significant capacity to decrease medium pH in the presence of any of the P sources tested. Although there was an effect from the low pH level, particularly to calcium phosphate, this isolate probably has the capacity to produce efficient organic acids in the process of solubilization, once the level of solubilization was higher than other isolates even when the pH was similar. On the other hand, the yield was considerably lower with iron and aluminum phosphate. In these situations, the acidity was also lower, confirming the necessity for the production and action of organic acids in the process (Table 3).

Fungal phosphate solubilization is influenced, not only by the nature of the phosphate source, but also by the traits of the fungal isolate tested. The process occurs especially through the acidification of medium or by the

action of organic acids that can chelate cations, liberating phosphate (Massenssini et al., 2015). Solubilization of calcium phosphate can happen simply through medium acidification. Other types of phosphate, such as aluminum phosphate, iron phosphate, and rock phosphates, may need the direct action of organic acids, such as oxalic acid and citric acid, for P liberation (Mendes et al, 2014; Hussein and Joo, 2015; Massenssini et al., 2015).

The isolates FUNG15, FUNG17 and F9 were not efficient at the solubilization process, presenting values below 5% of solubilization, except for isolate FUNG15 that achieved 14% of solubilization for calcium phosphate. This value is still low and probably was due the acidification of the medium. Additionally, FUNG15 and F9 presented negative values of P liberation, suggesting immobilization of P by these fungi during the experiment (Table 3). Despite the level of acidification of the medium, these isolates did not produce high amounts of organic acids, based on its titratable acidity. Furthermore, the correlation between the titratable acidity and P liberation and solubilization reinforce the important role of organic acids on phosphate solubilization.

There is a considerably amount of siderophores types, distributed in three categories: hydroxamates, catecholates, and caboxylates. All three types can be produced by fungi and hydroxamates are the most common type produced by most of the species. In this study, all four isolates tested for siderophores production demonstrated the capacity to produce hydroxamate-type siderophores. The amounts of siderophores produced by fungi are highly variable according to the fungal species. Comparing the amounts registered for marine fungi, the values measured on this study are similar to several species (Baakza et al., 2004; Vala et al., 2006). However, recent studies use a different methodology to estimate siderophores production, which present the results in percentage. Therefore, it is not possible to compare the siderophores amounts with the fungi used in these studies (Trivedi et al., 2016; Patel et al., 2017).

Diverse factors can affect the amount of siderophores produced besides the availability of iron. The source of carbon, the temperature and the pH are the main factors which can affect the biosynthesis of

siderophores. Even though production of siderophores are linked with growth promotion for facilitating the acquisition of iron and consequently impacting plant development, even pathogenic fungi are able to produce these molecules as well. Therefore, although the isolate F9 did not promote growth on the *in vitro* evaluation, it was able to produce the molecule on this study, even though in lower levels (Aziz et al., 2016; Patel et al., 2017).

On this study, it is possible to notice that the VOCs emitted by the fungal isolates had only inhibitory effects, since the control group overcame significantly the values for most of the morphological plant features for the majority of the isolates (Figure 6). Many factors can influence volatile compounds action, such as the plant developmental phase, time of exposure, compounds types, concentrations and combination of the compounds. The production of the compounds can be variable over time even by the same fungal colony, it means that the same colony can change the profile of volatile compounds produced, consequently changing the effects on plants (Naznin et al., 2014; Lee et al., 2015; Lee et al., 2016).

Currently, more than 2000 compounds from 1000 fungal species already were identified, but most of their proprieties are still unknown. The possible effects include growth promotion, growth inhibition, disease attenuation and interspecific signaling between organisms physically apart (Effmert et al., 2012; Naznin et al., 2014; Siddiquee et al., 2015; Schmidt et al., 2015; Schmidt et al., 2016; Lemfack et al., 2017; Martínez-Medina et al., 2017). Further studies with our isolates must analyses the nature of the compounds and consider different times of exposure to the volatile compounds.

## **CONCLUSIONS**

Eucalyptus rhizosphere is colonized by diverse fungal species which exhibit growth promotion effects at distinct levels and acting through diverse mechanisms.

The characterization of growth promotion mechanisms revealed that the isolates obtained from the eucalyptus rhizosphere produced gibberellins and

indole acetic acid, solubilized different phosphate sources and synthesized siderophores.

Future exploration of the isolates' potentialities might be a promising path to achieve applicable technologies to eucalyptus cultivation, such as the development of fungal inoculum able to contribute to plant development and productivity.

## REFERENCES

- AZIZ, O.A.A., HELAL, G.A., GALAL, Y.G.M. & ROFAIADA, A.K.S. Fungal siderophores production in Vitro as affected by some abiotic factors. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 5, p. 210-222, 2016.
- BAAKZA, A., VALA, A.K., DAVE, B.P. & DUBE, H.C. A comparative study of siderophores production by fungi from marine and terrestrial habitats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 311, p.1-9, 2004.
- BHATTACHARYA, A., KOURMPETLI, S., WARD, D.A., THOMAS, S.G., GONG, F., POWERS, S.J., CARRERA, E., TAYLOR, B., GONZALEZ, F.N.C., TUDZYNSKI, B., PHILLIPS, A.L., DAVEY, M.R. & HEDDEN, P. Characterization of the fungal gibberellin desaturase as a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase and its utilization for enhancing plant growth. *Plant Physiology*, v. 160, p. 837-845, 2012.
- BRAGA, J.M. & DEFELIPO, B.V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e material vegetal. *Revista Ceres*, v. 21, p. 73-85, 1974.
- BRIC, J.M., BOSTOCK, R.M. & SILVERSTONE, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p. 535-538, 1991.
- CABALLERO-MELLADO, J., ONOFRE-LEMUS, J., SANTOS, P.E. & MARTÍNEZ-AGUILAR, L. The Tomato Rhizosphere, an Environment Rich in Nitrogen-Fixing *Burkholderia* Species with Capabilities of Interest for Agriculture and Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 5308-5319, 2007.
- CHOWDAPPA P., MOHAN KUMAR, S.P., JYOTHI LAKSHMI, M. & 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, p. 109–117, 2013.
- CONTRERAS-CORNEJO, H.A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C. & LÓPEZ-BÚCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 149, p. 1579-1592, 2009.
- CLARK, J. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, v. 23, p. 458-460, 1975.
- EFFMERT, U., KALDERÁS, J., WARNKE, R. & PIECHULLA, B. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the Soil. *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, p. 665-703, 2012.
- GOMES, N.C.M., FAGBOLA, O., COSTA, R., RUMJANEK, N.G., BUCHNER, A., MENDONA-HAGLER, L. AND SMALLA, K. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3758–3766, 2003.
- GRAHAM, H.D. & HENDERSON, J.H.M. Reaction of gibberellic acid & gibberellins with Folling-Wu phosphomolybdic acid reagent & its use for quantitative assay. *Plant Physiology*, v. 36, p. 405-408, 1961.
- GUPTA, G., PARIHAR, S.S., AHIRWAR, N.K., SNEHI, S.K. & SINGH, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Microbial & Biochemical Technology*, v. 7, p. 96-102, 2015.
- HAMAYUN, M., KHANB, S.A., KHAN. A.L., AHMADE, N., NAWAZF, Y., SHERG, H. & LEE, I.J. Gibberellin producing *Neosartorya* sp. CC8 reprograms Chinese cabbage to higher growth. *Scientia Horticulturae*, v. 129, p. 347-352, 2011.
- HARMAN, G.E., HOWELL, C.R., VITERBO, A., CHET, I. & LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, p. 43-56, 2004.
- HUSSEIN, K.A. & JOO, J.H. Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, v. 58, p. 847-855, 2015.
- IBA - INSTITUTO BRASILEIRO DE ÁRVORES. Relatório anual de 2017.
- KHAN, S.A., HAMAYUN, M., KIM, H.Y., YOON, H.J., LEE, Y.J. & KIM, J.G. Gibberellin production and plant growth promotion by a newly isolated

- strain of *Gliomastix murorum*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 25, p. 829-833, 2009.
- KUMAR, N.V., RAJAM, K.S. & RANI, M.E. Plant Growth Promotion Efficacy of Indole Acetic Acid (IAA) Produced by a Mangrove Associated Fungi-*Trichoderma viride* VKF3. V. 6, p. 2692-2701, 2017.
- LEE, S., YAP, M., BEHRINGER, G., HUNG, R. & BENNETT, W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. Fungal Biology and Biotechnology, v. 3, p. 1-14, 2016.
- LEE, S., HUNG, R., YAP, M. & BENNETT, J.W. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. Archives of Microbiology, v. 197, p. 723-727, 2015.
- LEMFACK, M.C., GOHLKE, B-O., TOGUEM, S.M.T., PREISSNER, S., PIECHULLA, B. & PREISSNER, R. mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. Nucleic Acids Research, v. 46, p. 261-265, 2017.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A., WEES, S.C.M.V. & PIETERSE, C.M.J. Airborne signals from *Trichoderma* fungi stimulate iron uptake responses in roots resulting in priming of jasmonic acid-dependent defences in shoots of *Arabidopsis thaliana* and *Solanum lycopersicum*. Plant, Cell and Environment, v. 40, p. 2691-2705, 2017.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A., ALGUACIL, M.D.M, PASCUAL, J.A. & VAN WEES, S.C.M. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. Journal of Chemical Ecology, v. 40, p. 804–815, 2014.
- MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. Phytopathology, v. 59, p. 153-163, 1969.
- MASSENSINI, A.M, TÓTOLA, M.R, BORGES, A.C. & COSTA, M.D. Solubilização potencial de fosfatos mediada pela microbiota rizosférica de Eucalipto cultivado em topossequência típica da Zona da Mata Mineira. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 39, p. 692-700, 2015.
- MENDES, G.O., FREITAS, A.L.M., PEREIRA, O.L., SILVA, I.R., VASSILEV, N.B. & COSTA, M.D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. Annals of Microbiology, v. 64, p. 239-249, 2014.

- NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, p. 265-270, 1999.
- NAZNIN, H.A., KIYOHARA, D., KIMURA, M., MIYAZAWA, M., SHIMIZU, M. & HYAKUMACHI, M. Systemic Resistance Induced by Volatile Organic Compounds emitted by Plant Growth-Promoting Fungi in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One*, v. 9, p. 1-10, 2014.
- PATEL, D., PATEL, S., THAKAR, P. & SARAF, M. Siderophore Producing *Aspergillus* spp as bioinoculant for enhanced growth of mung bean. *International Journal of Advanced Agricultural Sciences and Technology*, v. 6, p. 111-120, 2017.
- PATKAR, R.N. & NAQVI, N.I. Fungal manipulation of hormone-regulated plant defense. *PLoS Pathogens*, v. 13, p. 1-5, 2017.
- SABA, H., VIBHASH, D., MANISHA, M., PRASHANT, K.S., FARHAN, H. & TAUSEEF, A. Trichoderma – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere*, v. 3, p. 524-531, 2012.
- SALAZAR-CEREZO, S., MARTÍNEZ-MONTIEL, N., GARCÍA-SÁNCHEZ, J., PÉREZ-Y-TERRÓN, R. & MARTÍNEZ-CONTRERAS, R.D. Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, v. 208, p. 85-98, 2018.
- SCHMIDT, R., CORDOVEZ, V., BOER, W., RAAIJMAKERS, J. & GARBEVA, P. Volatile affairs in microbial interactions. *The ISME Journal*, v. 9, p. 2329-2335, 2015.
- SCHMIDT, R., ETALO, D.W., JAGER, V., GERARDS, S., ZWEERS, H., BOER, W. & GARBEVA, P. Microbial Small Talk: Volatiles in Fungal–Bacterial Interactions. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1-12, 2016.
- SIDDIQUEE, S., AZAD, S.A., BAKAR, F.A., NAHER, L. & KUMAR, S.V. Separation and identification of hydrocarbons and other volatile compounds from cultures of *Aspergillus niger* by GC–MS using two different capillary columns and solvents.
- SIMON, E.H. & TESSMAN, I. Thymidine-requiring mutants of phage T4. *Genetics*, v. 50, p. 526-532, 1963.
- SINGH, B.K., MUNRO, S. REID, E., ORD, B., POTTS, J.M., PATERSON, E. & MILLARD, P. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *European Journal of Soil Science*, v. 57, p. 72-82, 2006.

- SNOW, G.A. Mycobactin, a growth factor for *Mycobacterium johnei*. Part II. Degradation and identification of fragments. *Journal of the Chemical Society*, p. 2588-2596, 1954.
- TSAVKELOVA, E., OESER, B., OREN-YOUNG, L., ISRAELI, M., SASSON, Y., TUDZYNSKI, B. & SHARON, A. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. *Fungal Genetics and Biology*, v. 49, p. 48-57, 2012.
- TRIVEDI, H.B., VALA, A.K. & DAVE, B.P. Production of Catecholate Siderophores by a Manglicolous fungus *Emericella nidulans*: A Novel Observation. *Studies in Fungi*, v. 1, p. 146-149, 2016.
- VALA, A.K., DAVE, B.P. & DUBE, H.C. Chemical characterization and quantification of siderophores produced by marine and terrestrial aspergilli. *Canadian Journal Microbiology*, v. 52, p. 603-607, 2006.
- VENTURI, V. & KEEL, C. Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, v. 21, p. 187-198, 2016.
- VUJANOVIC, V., HAMELIN, R.C., BERNIER, L., VUJANOVIC, G & ST-ARNAUD, M. Fungal Diversity, Dominance, and Community Structure in the Rhizosphere of Clonal *Picea mariana* Plants Throughout Nursery Production Chronosequences. *Microbial Ecology*, v. 54, p. 672-684, 2007.
- WIEMANN, P., SIEBER, C.M.K., VON BARGEN, K.W., STUDDT, L., NIEHAUS, E-M., ESPINO, J.J., HUB, K., MICHELSE, C.B., ALBERMANN, S., WAGNER, D., BERGNER, S.V., CONOLLY, L.R., FISCHER, A., REUTER, G., KLEIGREWE, K., BALD, T., WINGFIELD, B.D., OPHIR, R., FREEMAN, S., HIPPLER, M., SMITH, K.M., BROWN, D.W., PROCTOR, R.H., MÜNSTERKÖTTER, M., FREITAG, M., HUMPF, H-U., GÜLDENER, U. & TUDZYNSKI, B. Deciphering the Cryptic Genome: Genome-wide Analyses of the Rice Pathogen *Fusarium fujikuroi* Reveal Complex Regulation of Secondary Metabolism and Novel Metabolites. *Pathogens*, v. 9, p. 1-35, 2013.
- YEDIDIA, I., SRIVASTVA, A.K., KAPULNIK, Y. & CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, v. 235, p. 235–242, 2001.
- ZHANG, R., VIVANCO, J.M. & SHEN, Q. The unseen rhizosphere root–soil–microbe interactions for crop production. *Current Opinion in Microbiology*, v. 37, p. 8-14, 2017.