

Solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma*⁽¹⁾.

Lillian França Borges Chagas⁽²⁾; Henrique Guilhon de Castro⁽³⁾; Aloisio Freitas Chagas Junior⁽³⁾; Evilanna Lima Arruda⁽²⁾; Luciane de Oliveira Miller⁽⁴⁾; Luiz Antonio de Oliveira⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPq/Rede Bionorte.

⁽²⁾ Estudante de pós-graduação - Bolsista CNPq; UFT; Gurupi, TO; lillianfb@hotmail.com, evilannalima@msn.com;

⁽³⁾ Professor Adjunto/Pesquisador; Universidade Federal do Tocantins (UFT); Gurupi, TO; hguilhon@uft.edu.br; chagasjraf@uft.edu.br;

⁽⁴⁾ Agrônoma/Fitopatologista; JCO Fertilizantes; Barreiras, BA; lucianeom@jcofertilizantes.com.br;

⁽⁵⁾ Pesquisador; Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia; Manaus, AM; luizoli@inpa.gov.br,

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de produção de ácido indol acético (AIA) e de solubilização de fosfato, *in vitro*, por isolados de *Trichoderma* spp. Isolados de *Trichoderma* foram repicados para Erlenmeyer (100 mL) contendo meios BD (batata e dextrose) na presença de L-triptofano, como precursor para biossíntese de AIA. Para a avaliação da capacidade de solubilização de fosfato, isolados foram repicados para Erlenmeyer (100 mL), contendo meio NBRIP (modificado). Após análise colorimétrica, determinaram-se os teores de AIA e fósforo solúvel. Quanto à solubilização de fosfato, todos os isolados testados foram capazes de solubilizar fosfato em meio NBRIP, sendo que o isolado JCO-UFT 85 apresentou concentração crescente no período de avaliação variando de 4,81 a 25,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o isolado TR-HAR apresentou maior solubilização chegando a 30,72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no 12º dia. Para AIA, todos os isolados foram capazes de produzir AIA no meio de cultura avaliado, suplementado com L-triptofano.

Termos de indexação: L-triptofano, ácido indol acético, fosfato tri-cálcico.

INTRODUÇÃO

Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos do solo podem ser diretos e indiretos. Os diretos podem ser a produção de hormônios, ou outra substância análoga a estes, que influenciam no crescimento ou desenvolvimento da planta, ou ainda suprindo suas necessidades nutricionais pela solubilização de fosfatos (Gravel et al., 2007). Já os benefícios indiretos podem ser pela ação de microrganismos por meio da supressão de patógenos (Harman et al., 2004; Gava & Menezes, 2012).

A produção de AIA por fungos tem sido reportada, evidenciando a capacidade de fungos em sintetizar AIA na rizosfera de plantas, podendo proporcionar o desenvolvimento radicular (Carvalho Filho, 2008).

Quanto à capacidade de solubilização de fosfatos, diversos microrganismos do solo, como os fungos, solubilizam diferentes formas de fosfatos inorgânicos. Kapri & Tewari (2010) destacaram o

potencial de solubilização de fosfato por isolados de *Trichoderma* spp. em meio de cultura, indicado pelas concentrações de fosfato solúvel ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

A utilização de microrganismos que possuem a capacidade de realizar este tipo de solubilização tem sido empregada como forma de substituir ou reduzir o uso de fertilizantes fosfáticos solúveis, pois dessa forma haverá melhor aproveitamento dos fosfatos naturais. Portanto, uma maior compreensão da eficiência e capacidade de *Trichoderma* em solubilizar fosfato e sintetizar AIA, além do potencial no biocontrole de doenças, poderá favorecer a seleção de cepas potencialmente úteis para disponibilizar o fósforo agregado a fontes de baixa solubilidade para o uso na agricultura, principalmente nos solos do cerrado.

Assim, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial de solubilização de fosfato e a capacidade de sintetizar AIA, ambos *in vitro*, usando isolados de *Trichoderma* spp. oriundos do produto Trichoplus JCO fertilizantes e isolados obtidos de solos do cerrado tocantinense.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Tocantins – Campus de Gurupi. Os isolados de *Trichoderma* spp. avaliados neste estudo foram obtidos junto a JCO Fertilizantes e Bioprodutos e fazem parte do mix de fungos que formam o produto Trichoplus (Tabela 1). Outros seis isolados foram obtidos de solos de várzea no município de Lagoa da Confusão no estado de Tocantins. A espécie de *Trichoderma* controle identificada e que faz parte do produto Trichoplus é o isolado TR-HAR (*Trichoderma harzianum*). Outros dois isolados, também são identificados e fazem parte do Trichoplus JCO (TR-GOK e TR-EUC). Os demais isolados foram identificados morfológicamente conforme Martins et al. (2008).

Para o ensaio de solubilização de fosfato *in vitro* os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados inicialmente em meio BDA (batata, dextrose e ágar) a 28 °C, por sete dias. A partir dessas colônias foram retirados oito discos de aproximadamente 5,0 mm de diâmetro, contendo micélio e esporos e

repicados para Erlenmeyer (100 mL), onde foram testados quanto ao potencial de solubilização de fosfato *in vitro* em meio NBRIP modificado (Nautyal, 1999), contendo os seguintes ingredientes (g L^{-1}): glicose, 10,0; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25; KCl, 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1. Foram adicionados ao meio, 50 mL de K_2HPO_4 (10%) e 100 mL de CaCl_2 (10%), para formação de precipitado insolúvel de fosfato de cálcio (CaHPO_4).

A estimativa quantitativa de solubilização de fosfato foi realizada em triplicata em delineamento inteiramente ao acaso. A incubação foi realizada a 28 ± 1 °C em um agitador a 150 rpm durante doze dias. Foram feitas avaliações aos três, seis, nove e doze dias após a repicagem. Para a determinação da concentração de fósforo (P) solúvel utilizou-se o método colorimétrico de Murphy & Riley (1962), subtraindo-se o P solúvel contido nos tratamentos pelo contido na amostra controle (meio de cultura com fosfato e sem inóculo).

Para as avaliações foram utilizadas uma parte do reagente, 0,5 ml da amostra filtrada mais 5 mL de água destilada para cada amostra. Após 25 minutos de reação o P solúvel foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 725 nm de absorbância. A curva padrão para quantificação de P foi feita a partir do fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e as concentrações calculadas em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Para a produção de AIA *in vitro*, os isolados foram transferidos, através de discos de aproximadamente 5,0 mm de diâmetros contendo o micélio e esporos do fungo, para frascos de Erlenmeyer (100 mL) contendo 80 mL com o meio BD na presença de L-triptofano. A concentração de L-triptofano utilizada foi de 100 mg L^{-1} , sendo utilizadas três repetições por isolado para cada tratamento em cada meio utilizado, em delineamento inteiramente ao acaso. Após três, seis, nove e doze dias de crescimento sob um agitador rotatório (100 rpm) a 28 ± 2 °C, a massa fúngica foi separada por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos. Para a análise colorimétrica de AIA (Gordon & Weber, 1951) foram utilizados uma parte do reagente de Salkowski [FeCl_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ + HClO_4 (35%)] e duas partes do sobrenadante obtido de cada isolado.

O fitormônio foi quantificado em espectrofotômetro em 530 nm. As concentrações, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram calculadas a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas da forma sintética do hormônio (0 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), cujas leituras foram a base para calcular a concentração de AIA nas amostras.

Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de agrupamento de médias

Scott-Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa estatístico ASSISTAT versão 7.6 beta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira avaliação, aos três dias de crescimento, a concentração de fosfato no meio variou de 2,03 a $18,92 \mu\text{g mL}^{-1}$ entre os tratamentos com inoculação, com os isolados JCO-UFT 110 e TR-HAR sendo superiores ($p < 0,05$) aos demais isolados (Tabela 2).

A concentração de fosfato variou de 6,38 a $18,95 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos filtrados de cultura dos isolados de *Trichoderma* na segunda avaliação (seis dias), com os isolados JCO-UFT 63 ($18,95 \mu\text{g mL}^{-1}$) e JCO-UFT 78 ($18,54 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentando concentrações significativamente superiores ($p < 0,05$). Aos nove dias de crescimento, as concentrações encontradas para os isolados JCO-UFT 63, JCO-UFT 85, JCO-UFT 87 e TR-EUC (21,19, 23,49, 20,98 e $24,88 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente), foram superiores ($p < 0,05$) aos demais isolados.

Na avaliação aos doze dias, o isolado TR-HAR apresentou concentração de fosfato de $30,72 \mu\text{g mL}^{-1}$, superior ($p < 0,05$) aos demais isolados. A concentração de fosfato significativamente mais baixa foi registrado para o filtrado de cultura do isolado TR-GOK, que variou de 5,42 a $13,38 \mu\text{g mL}^{-1}$ nas quatro épocas de avaliação.

A diminuição e/ou estabelecimento, da concentração de fosfato solubilizado, na última avaliação, aos doze dias após a repicagem (Tabela 2), para alguns isolados, pode ter sido em função da utilização pelos fungos para os processos celulares (Figura 1). O aumento inicial na concentração de fosfato, dos três aos seis dias, seguido por uma diminuição gradual no filtrado de cultura foi reportado em outros trabalhos (Nautyal, 1999; Kapri & Tewari, 2010). A diminuição da concentração de fosfato aos nove dias por alguns isolados pode ser correlacionada com a sua fixação no micélio de *Trichoderma*, e segundo Kapri & Tewari (2010), este fosfato poderá ser libertado de uma forma facilmente disponível em estreita proximidade com as raízes após a lise de micélio com a idade.

Quanto à capacidade de sintetizar ácido indol acético (AIA), todos os isolados produziram AIA no meio de cultura BD suplementado com L-triptofano (Tabela 3). Aos três dias de avaliação as maiores médias foram observadas para os tratamentos com os isolados TR-EUC ($1,1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e TR-GOK ($0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 3). No sexto dia de avaliação, destaque para o isolado JCO-UFT 110 ($1,36 \mu\text{g mL}^{-1}$). Já no nono dia de avaliação, o isolado JCO-UFT 110 apresentou a maior média ($p < 0,05$) ($3,1 \mu\text{g mL}^{-1}$).



¹). Na avaliação aos doze dias de crescimento, destaque novamente para o isolado JCO-UFT 110.

Houve aumento, na média geral, da concentração de AIA ao longo do período de avaliação (Figura 2), possivelmente em função do aumento no crescimento microbiano, consequentemente no metabolismo.

Carvalho Filho (2008) concluiu que alguns isolados de *Trichoderma* revelaram produção do fitohormônio AIA, em testes de filtrados de colônias com o reagente de Salkowski. Gravel et al. (2007), também verificaram a produção de AIA por um isolado de *T. atroviride*, utilizando diferentes meios de cultura contendo os precursores triptofano, triptamina e triptofol.

A produção de AIA pelos isolados de *Trichoderma* avaliados sugere o uso potencial desses fungos como promotores do crescimento radicular de espécies vegetais de importância agrícola, conforme documentado por Bjorkman (2004), Resende et al. (2004), Gravel et al. (2007) e Carvalho Filho (2008).

Estes resultados mostram o potencial de *Trichoderma* como possíveis promotores do crescimento vegetal, tendo em vista a capacidade de solubilização de fosfato e síntese de AIA, porém é necessário testes de inoculação de *Trichoderma* em plantas para avaliação do efeito da inoculação na promoção do crescimento vegetal, assim como, no controle biológico.

CONCLUSÕES

Todos os isolados de *Trichoderma* estudados foram capazes de solubilizar fosfato de Cálcio em meio de cultura, onde o melhor resultado foi obtido pelo isolado TR-HAR.

Todos os isolados usados nesse trabalho foram capazes de produzir AIA utilizando-se como precursor o L-triptofano.

O isolado que apresentou melhor desempenho quanto à produção de AIA foi o JCO-UFT 110.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo recurso financeiro e UFT Campus de Gurupi pelo suporte para a pesquisa.

REFERÊNCIAS

BJORKMAN, T. Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. *Plant Growth Regulation*, 43(1):89-92, 2004.

CARVALHO FILHO, M. R. *Trichoderma* spp. como agentes de biocontrole de *Cylindrocladium scoparium* e como promotores de crescimento de mudas de eucalipto. Brasília: Universidade de Brasília, 2008. 74p. Dissertação Mestrado.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. *Revista Ciência Agronômica*, 43(4):633-640, 2012.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiology*, 26(1):192-195, 1951.

GRAVEL, V.; ANTOUN, H.; TWEDDELL, R. J. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology & Biochemistry*, 39(8):1968-1977, 2007.

HARMAN, G. E., HOWELL, C. R., VITERBO, A., CHET, I., LORITO, M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2(1):43-56, 2004.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3):787-795, 2010.

MARTINS, A.; BRAÚNA, L. M.; MARTINS, I.; MELLO, S. C. M. Técnica modificada de microcultura de fungos para visualização microscópica. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos, 2008. 4p. (Comunicado Técnico, 176).

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry Acta*, 27:31-36, 1962.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphorus solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170(1):265-270, 1999.

RESENDE, M. L. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. *Ciência e Agrotecnologia*, 28(4):793-798, 2004.

Tabela 1. Isolados de *Trichoderma* spp. obtidos do produto Trichoplus JCO e isolados oriundos de solos de várzea no Tocantins.

Isolados	Espécie
JCO-UFT 63	<i>Trichoderma</i> sp.
JCO-UFT 78	<i>Trichoderma</i> sp.
JCO-UFT 85	<i>Trichoderma</i> sp.
JCO-UFT 87	<i>Trichoderma</i> sp.
JCO-UFT 110	<i>Trichoderma</i> sp.
JCO-UFT 111	<i>Trichoderma</i> sp.
TR-SM	<i>Trichoderma</i> sp.
TR-GOK	<i>T. asperellum</i>
TR-EUC	<i>T. harzianum</i>
TR-HAR	<i>T. harzianum</i>

Tabela 2. Solubilização de fosfato de cálcio (10 g L^{-1}) em meio NBRIP (modificado) por isolados de *Trichoderma* spp, em diferentes intervalo de tempo (dias)¹.

Isolados	Concentração de fosfato solubilizado ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	3 d	6 d	9 d	12 d
JCO-UFT 63	8,54 b	18,95 a	21,19 a	24,75 b
JCO-UFT 78	9,73 b	18,54 a	19,78 b	19,72 c
JCO-UFT 85	4,81 c	15,15 b	23,49 a	25,47 b
JCO-UFT 87	4,35 c	12,74 c	20,98 a	18,53 c
JCO-UFT 110	18,92 a	6,38 d	18,67 b	14,23 d
JCO-UFT 111	4,45 c	11,81 c	18,15 b	16,65 d
TR-SMm	2,03 d	10,99 c	19,56 b	16,01 d
TR-GOK	5,82 c	7,69 d	13,38 c	5,42 e
TR-EUC	2,12 d	11,09 c	24,88 a	20,94 c
TR-HAR	17,03 a	10,33 c	11,87 c	30,72 a
C.V.(%) ²	11,3	16,5	15,2	14,2

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%.² Coeficiente de Variação

Tabela 3. Produção de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por *Trichoderma* em meio BD na presença de L-triptofano¹

Tratamentos	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	3 d	6 d	9 d	12d
JCO-UFT 63	0,89 a C	1,02 b C	1,43 c B	2,91 c A
JCO-UFT 78	0,73 b B	0,97 b B	0,97 d A	1,27 d A
JCO-UFT 85	0,83 b C	1,07 b B	1,07 d B	1,50 d A
JCO-UFT 87	0,70 b D	1,24 a C	1,88 b B	3,08 b A
JCO-UFT 110	0,89 a D	1,36 a C	3,13 a B	3,93 a A
JCO-UFT 111	0,77 b D	1,17 b C	1,58 c B	2,69 c A
TR-SMm	0,67 b B	1,12 b A	1,12 d A	1,24 d A
TR-GOK	0,98 a C	1,07 b C	1,42 c B	2,24 c A
TR-EUC	1,13 a C	1,26 a C	1,45 c B	2,45 c A
TR-HAR	0,92 a B	0,85 c B	0,87 e B	1,87 d A
C.V.(%) ²	9,3	11,2	12,2	13,1

¹ Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5%.² Coeficiente de Variação

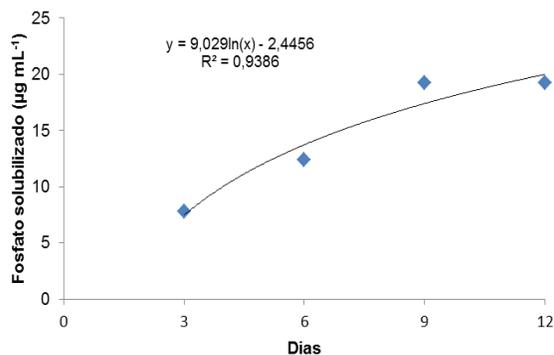


Figura 1: Solubilização de fosfato pelos isolados de *Trichoderma*. Médias dos isolados.

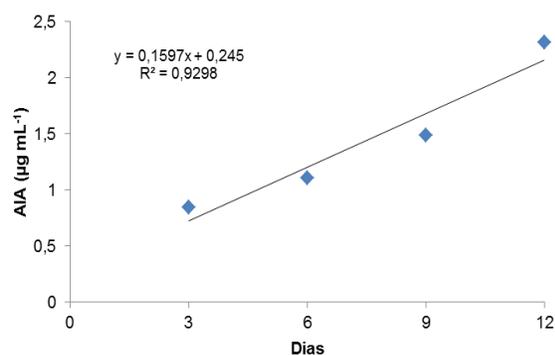


Figura 2: Produção de AIA pelos isolados de *Trichoderma*. Médias dos isolados.