

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM

SAMANTA MONÇÃO SILVA

**POTENCIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO VEGETAL SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

CAMPO GRANDE – MS
MARÇO – 2025

SAMANTA MONÇÃO SILVA

POTENCIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Fabiana Fonseca Zanoelo

CAMPO GRANDE – MS
MARÇO – 2025

Silva, Samanta Monção.

POTENCIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO / Samanta Monção Silva. – Campo Grande - Mato Grosso do Sul: 2025.

86 p.

1. Microorganismos. 2. Seca. 3. Agricultura. 4. Solo. I. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO**SAMANTA MONÇÃO SILVA****AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA PROMOÇÃO
DE CRESCIMENTO VEGETAL SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

28 de março de 2025

Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. FABIANA FONSECA ZANOELO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL-UFMS

Prof^a. Dr^a. GLÓRIA REGINA BOTELHO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA- UFSC

Prof. Dr. RENATO GRACIANO DE PAULA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO- UFES

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar, primeiramente, minha gratidão a Deus, aos Orixás e aos meus guias espirituais, que me sustentaram e orientaram ao longo dessa jornada, permitindo a conclusão de mais uma etapa tão importante em minha vida.

Agradeço à minha mãe, Francisca Cleia, ao meu irmão, Samuel Monção, e ao meu pai, Francisco Monção, pelo apoio constante ao longo de toda essa caminhada. Mesmo distantes, vocês sempre estiveram presentes no meu coração e em minhas conquistas.

Sou grata ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado, que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular e ao meu grupo de pesquisa, cujo suporte foi essencial durante a realização dos experimentos. Um agradecimento especial à minha orientadora, Prof.^a Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo, pela paciência, dedicação e orientação imprescindíveis durante todo o processo.

Minha gratidão também se estende à Prof.^a Dra. Bianca Obes Corrêa, pelo valioso apoio nos experimentos com plantas, e ao Prof. Dr. Rodrigo Galeano, que contribuiu imensamente com as metodologias aplicadas neste trabalho e cuja parceria, iniciada ainda na minha Iniciação Científica (PIBIC), tem sido inspiradora. Agradeço ainda aos professores do grupo de pesquisa, Giovana Giannesi e Douglas Masui, pelo suporte essencial no laboratório. Aos meus colegas de bancada, Isabela Pavão e João Souza, meu profundo agradecimento pela ajuda constante e pelo esclarecimento de dúvidas ao longo dos experimentos.

Aos meus amigos que estiveram ao meu lado desde o início dessa caminhada acadêmica, Claudio Ribeiro (meu companheiro de trajetória), Laura Castro, Yumi Ito, Iasmin Martinez e Jennifer Vital, meu sincero obrigado por todo apoio e amizade. E, por último, mas não menos importante, agradeço aos novos amigos que o Forfun me presenteou e que foram essenciais nesse intenso final de mestrado: Bernardo Amorim, David Alves, Ítalo Junior, Jéssica Lucena, Luciano Júnior, Maria Carolina Souza, Marcella Vasconcelos, Patrícia Fernandes, Raphael Almeida, Rodrigo Pádua, Shirley de Souza e Thammy Vieira. A todos vocês, meu mais profundo e sincero agradecimento. Muito obrigada!

RESUMO

A temperatura média global aumentou entre 0,2 °C e 1,1 °C desde 1850, período associado à Revolução Industrial. Essa variação, decorrente das mudanças climáticas, exerce um impacto significativo na agricultura, intensificando estresses abióticos. Nesse contexto, fungos endofíticos têm se destacado por estabelecerem relações mutualísticas com plantas, fornecendo benefícios como aumento da tolerância ao estresse abiótico. Este trabalho teve como objetivo identificar novos isolados fúngicos tolerantes à seca e avaliar seu potencial como promotores de crescimento vegetal. Os isolados foram coletados de afloramentos rochosos na Fazenda São João (Corumbá/MS), a partir das raízes da espécie *Discocactus ferricola*. Foram realizados testes de crescimento fúngico em diferentes temperaturas (30 °C, 35 °C e 40 °C) e níveis de déficit hídrico utilizando PEG (-0,1 MPa, -0,2 MPa e -0,4 MPa). Após a definição dos parâmetros, os isolados foram avaliados quanto à promoção de crescimento vegetal, com e sem PEG (-0,1 MPa). Os fungos analisados incluíram *Penicillium sp.* (DF1 e DF5), *Aspergillus sp.* (DF2 e DF4), *Chaetomium sp.* (DF3) e *Trichoderma sp.* (T24 e GT31). Todos os isolados cresceram a 30 °C e 35 °C, e demonstraram crescimento em meio BD com -0,1 MPa de PEG. Entre os isolados, DF1 destacou-se pela solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio, tanto na presença quanto na ausência de PEG. Todos os isolados foram capazes de produzir ACC deaminase (ACCD), com variações entre $18,46 \pm 3,8$ e $5,42 \pm 2,4$ μM de α -cetobutirato $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. A produção de ácido indol acético (AIA) foi observada em todos os fungos testados, com destaque para o isolado DF2 na presença de PEG ($53,99 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$). Em relação à produção de sideróforos, todos os isolados mantiveram produção constante, com DF1 apresentando os maiores valores em meio normal e com PEG (-0,1 MPa). Os ensaios enzimáticos demonstraram que os isolados produzem enzimas cruciais para o ciclo do carbono. O isolado DF1 (*Penicillium sp.*) foi selecionado para experimentos em milho, realizado em casa de vegetação sob estresse hídrico, devido ao conjunto de características relevantes, incluindo produção de AIA, sideróforos, solubilização de fosfatos, ACC deaminase e enzimas associadas à ciclagem de nutrientes. Nossos resultados mostraram que o fungo DF1 contribuiu para estratégias de defesa das plantas em condições de déficit hídrico, promovendo o acúmulo de osmólitos como açúcares totais, açúcares redutores e aminoácidos livres, para proteção dos tecidos vegetais e estimulando a produção de enzimas antioxidantes, essenciais para mitigar os danos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS). Adicionalmente, DF1 aumentou a atividade microbiana no solo, contribuindo para a saúde e fertilidade do ambiente, bem como para um ciclo de nutrientes mais equilibrado. Diante do exposto, observou-se que fungos isolados de regiões predominantemente rochosas mostraram grande potencial na promoção de crescimento vegetal em condições de estresse hídrico, e se mostram como uma alternativa sustentável para otimizar a produção agrícola.

Palavras-chave: microorganismos, seca, sustentabilidade, solo, agricultura.

ABSTRACT

The global average temperature has increased between 0.2 °C and 1.1 °C since 1850, a period associated with the Industrial Revolution. This variation, driven by climate change, has a significant impact on agriculture, intensifying abiotic stress. In this context, endophytic fungi have stood out for establishing mutualistic relationships with plants, providing benefits such as increased tolerance to abiotic stress. This study aimed to identify new drought-tolerant fungal isolates and evaluate their potential as plant growth promoters. The isolates were collected from rocky outcrops at Fazenda São João (Corumbá/MS), obtained from the roots of **Discocactus ferricola**. Fungal growth tests were conducted at different temperatures (30 °C, 35 °C, and 40 °C) and under water deficit conditions using PEG (-0.1 MPa, -0.2 MPa, and -0.4 MPa). After defining the parameters, the isolates were assessed for plant growth promotion, with and without PEG (-0.1 MPa). The analyzed fungi included **Penicillium** sp. (DF1 and DF5), **Aspergillus** sp. (DF2 and DF4), **Chaetomium** sp. (DF3), and **Trichoderma** sp. (T24 and GT31). All isolates grew at 30 °C and 35 °C and showed growth in BD medium with -0.1 MPa of PEG. Among the isolates, DF1 stood out for its ability to solubilize calcium and aluminum phosphates, both in the presence and absence of PEG. All isolates produced ACC deaminase (ACCD), with variations ranging from 18.46 ± 3.8 to 5.42 ± 2.4 μM of α -ketobutyrate $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein. Indole-3-acetic acid (IAA) production was observed in all tested fungi, with DF2 showing the highest concentration in the presence of PEG (53.99 ± 0.6 $\mu\text{g/mL}$). Regarding siderophore production, all isolates maintained consistent production, with DF1 exhibiting the highest values in both normal medium and PEG (-0.1 MPa). Enzymatic assays demonstrated that the isolates produce crucial enzymes for the carbon cycle. DF1 (**Penicillium** sp.) was selected for maize experiments conducted in a greenhouse under water stress conditions due to its relevant characteristics, including IAA production, siderophore synthesis, phosphate solubilization, ACC deaminase activity, and enzymes associated with nutrient cycling. Our results showed that DF1 contributed to plant defense strategies under water deficit conditions, promoting the accumulation of osmolytes such as total sugars, reducing sugars, and free amino acids for tissue protection and stimulating the production of antioxidant enzymes essential for mitigating damage caused by reactive oxygen species (ROS). Additionally, DF1 increased microbial activity in the soil, contributing to environmental health and fertility, as well as a more balanced nutrient cycle. Based on these findings, fungal isolates from predominantly rocky regions demonstrated significant potential in promoting plant growth under water stress conditions.

Keywords: Microorganisms, Drought, Sustainability, Soil, Agriculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Comparações de mapas dos meses de setembro/2024 e dezembro/2024 sobre o monitoramento da seca no território Nacional. (Fonte: Monitor de Seca)	16
Figura 2. Mecanismo direto e indireto de promoção de crescimento vegetal.....	19
Figura 3. Imagem a esquerda: Google Maps. Imagem a direita: Fazenda São João	43
Figura 4. Imagens ao microscópio ótico (aumento de 40x) dos isolados	44
Figura 5. Efeito da temperatura no crescimento de fungos filamentosos.....	45
Figura 6. <i>Heatmap</i> : solubilização de fosfato de Calcio, Ferro e Alumínio na ausência e presença de PEG 6000	49
Figura 7. Produção de sideróforos na presença e ausência de PEG 6000.....	54
Figura 8. Ensaio enzimáticos (A e B) amilase, (C e D) xilanase, (E e F) β -glucosidase, e (G e H) fosfatase e (I e J) protease.....	58
Figura 9. Efeito de <i>Penicillium</i> sp (DF1). no crescimento de milho (ADV9339) em condições normais e déficit hídrico.....	60
Figura 10. Análise bioquímica teor de clorofila e carotenóides na presença e ausência do fungo <i>Penicillium</i> sp (DF1).....	61
Figura 11. Efeito da inoculação de <i>Penicillium</i> sp (DF1) no crescimento do milho em condições normais e estresse hídrico.....	62
Figura 12. Quantificação de prolina (A) e dosagem de aminoácidos livres totais (B), na presença e ausência do fungo <i>Penicillium</i> sp (DF1).....	63
Figura 13. Dosagem de compostos fenólicos (A) e flavonóides (B), na presença e ausência do fungo <i>Penicillium</i> sp (DF1).....	65
Figura 14. Efeito da inoculação de linhagens de <i>Penicillium</i> sp (DF1) sobre o conteúdo de (A) APX – ascorbato peroxidase; (B) CAT – catalase (C) POD – peroxidase (D) SDO- superóxido dismutase e em folhas de milho.....	66
Figura 15. Dosagem da peroxidação lipídica na presença e ausência do fungo <i>Penicillium</i> sp (DF1).....	68
Figura 16. Atividade de hidrólise de diacetato de fluoresceína em amostras de solo rizosférico.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Culturas impactadas pela seca nos estados e variação total da produção divulgada em setembro de 2024 comparado a primeira estimativa de outubro de 2023..	16
Tabela 2: Massa seca em diferentes concentrações de PEG 6000.....	
Tabela 3. Atividade ACC deaminase. <i>Penicillium</i> sp (DF1 e DF5), <i>Aspergillus</i> sp (DF2 e DF4) <i>Chaetomium</i> sp (DF3) e <i>Trichoderma harzianum</i> (T24) e <i>Trichoderma reesei</i> (GT31).	50
Tabela 4. Produção de ácido indol-3-acético (AIA) na presença e na ausência de PEG 6000.....	53

LISTA DE ANEXOS

Documento de comprovação de cadastro no SIGEN	81
Documento de comprovação de cadastro no SIGEN	82

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcento
µg	micrograma
<i>p</i> -NPP	<i>para</i> -nitrofenilfosfato
µL	microlitro
ACC	1- carboxílico-1-aminociclopropano
ACCD	1- carboxílico-1-aminociclopropano deaminase
AIA	ácido indol-3-acético
APX	ascorbato peroxidase
Aw	atividade aquosa
BDA	ágar dextrose batata
CAS	chrome azurol S
CAT	catalase
Cm	centímetro
CMC	carboximetilcelulose
CoC ₂	cloreto de cobalto
Cu	cobre
DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
FDA	diacetato de fluoresceína
Fe	ferro
FeCl ₃	cloreto de ferro
FeSO ₄	sulfato de ferro
FPCP	Fungos Promotores de Crescimento de Plantas
g	grama
h	hora
HCl	ácido clorídrico
HClO ₄	ácido perclórico
K ₂ HPO ₄	fosfato dipotássico
K ₂ SO ₄	sulfato de potássio
KH ₂ PO ₄	fosfato de potássio monobásico
L-Trp	L-triptofano
M	Molar

mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
Mn	manganês
MnSO ₄ .H ₂ O	sulfato de manganês hidratado
n.º	número
N	nitrogênio
N	normalidade
NaOH	hidróxido de sódio
NH ₃	amônia
NH ₄ Cl	cloreto de amônio
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
P	fósforo
PEG	Polietilenoglicol
POD	peroxidase
p/v	peso por volume
pH	potencial de hidrogênio iônico
g	força relativa de centrifugação
s	segundo
SOD	superóxido dismutase
TCA	ácido tricloroacético
TLE	<i>Trichoderma</i> liquid enzyme
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Try	tirosina
U	unidade
v/v	volume por volume
Zn	zinco

$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

sulfato de zinco hidratado

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Revisão Bibliográfica	15
2.1 Mudanças climáticas e problemas da seca na agricultura brasileira	15
2.2 Estratégia vegetal e impactos em relação ao estresse hídrico	17
2.3 Associação de fungos na promoção de crescimento vegetal	18
2.3.1 Solubilização de fosfato	19
2.3.2 Produção do Fitohormônio ácido indol-3-acético (AIA)	20
2.3.3 Produção de sideróforos	21
2.3.4 Produção de Enzimas	22
2.3.4.1 Produção da 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACCD)	20
2.3.4.2 Enzimas extracelulares por fungos endofíticos	23
2.4 Antioxidantes	25
2.4.1 Enzimáticos	25
2.4.2 Não Enzimáticos	26
3. Objetivos	27
4. Material e Métodos	28
4.1 Origem, isolamento e preservação dos microrganismos	28
4.2 Efeito da temperatura no crescimento dos microrganismos	28
4.2.1 Efeito da temperatura no crescimento dos microrganismos	28
4.3 Caracterização dos isolados para promoção de crescimento vegetal em condições normais e de déficit hídrico	29
4.4 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato	29
4.4.1 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato em condições de déficit hídrico	30
4.5 Ensaio enzimático de ACC deaminase	30
4.5.1 Ensaio enzimático de ACC deaminase em condições de déficit hídrico	31
4.6 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	31
4.6.1 Produção de ácido indol-3-acético (AIA) em condições de déficit hídrico	32
4.7 Produção de Sideróforos	32
4.7.1 Produção de Sideróforos em condições de déficit hídrico	33
4.8 Produção enzimática em condições normais e em déficit hídrico	33
4.9 Ensaio enzimático e quantificação de proteínas	33
4.9.1 Dosagem de amilase e xilanase	33
4.9.2 Dosagem de protease	34
4.9.3 Dosagem de β -glucosidase e fosfatase	34

4.9.4 Quantificação de proteínas	35
4.10 Experimento de promoção do crescimento e déficit hídrico.....	35
4.11 Análises bioquímicas.....	36
4.11.1 Quantificação de clorofila e carotenóides.....	36
4.11.2 Dosagem de açúcares totais.....	37
4.11.3 Dosagem de açúcares redutores totais.....	37
4.11.4 Quantificação de Prolina.....	37
4.11.5 Dosagem de aminoácidos livres totais.....	38
4.11.6 Dosagem de compostos fenólicos totais.....	38
4.11.7 Dosagem de flavonóides totais.....	39
4.12 Enzimas antioxidantes.....	39
4.12.1 Dosagem da peroxidase	39
4.12.2 Dosagem da ascorbato peroxidase.....	40
4.12.3 Dosagem da catalase.....	40
4.12.4 Dosagem da superóxido dismutase (SOD).....	40
4.13 Avaliação da atividade microbiana pela hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA).....	41
4.14 Dosagem da Peroxidação Lipídica.....	41
4.15 Análise dos resultados e estatística.....	42
5. Resultados e Discussão.....	43
6. Conclusão	70
7. Referências Bibliográficas.....	71
Anexo	81

1. INTRODUÇÃO

A temperatura média global aumentou entre 0,2 °C e 1,1°C desde 1850, período correspondente à Revolução Industrial. Esta variação de temperatura é decorrente das mudanças climáticas, que causam um impacto significativo nas culturas agrícolas ao intensificar os estresses abióticos. Consequentemente, isso reduz o crescimento e o rendimento das produções agrícolas (Bilal et al., 2020; Saleem et al., 2024). Um dos estresses abióticos que mais afetam negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas é a seca, responsável por elevada mortalidade de plantas ainda na fase de mudas (Liu et al., 2021). O estresse hídrico induz a planta a realizar adaptações fisiológicas, morfológicas e bioquímicas para minimizar a perda de água, como por exemplo o fechamento dos estômatos (Sun et al., 2020). A forma como o estresse hídrico pode afetar a produtividade de uma cultura está relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que geram alto nível de toxicidade devido à exposição ao estresse, prejudicando assim o metabolismo da planta (Mansoor et al., 2022).

A interação entre microrganismos e plantas pode ser um dos fatores que auxilia no crescimento vegetal, contribuindo para a proteção a estresses abióticos conferindo resistência a condições adversas (Hanaka et al, 2021). Os microrganismos podem colonizar uma planta tanto na superfície quanto dentro dos tecidos e essa relação pode variar desde a patogênese latente até a simbiose mutualística, ou seja, os microrganismos podem ser: patógenos latentes epífitas ou endófitos (Tadych; White, 2019). Para fungos endofíticos, essa definição já trouxe a questão em que seriam fungos que não causavam danos a planta, visto que hoje essa definição foi substituída como microorganismos que estão dentro do tecido vegetal sendo patógeno ou não, variando assim de uma relação mutualística ou parasitária (Mishra; Bhattacharjee; Sharma, 2021).

Alguns fungos são capazes de estabelecer relações simbióticas com as plantas, destacando-se aqueles que atuam como endófitos. Eles oferecem diversos benefícios às plantas hospedeiras, como o aumento da resistência a estresses abióticos, incluindo a seca, e a produção de metabólitos que potencializam a absorção de nutrientes, favorecendo, assim, o crescimento vegetal (Morsy, et al. 2020; Tadych; White, 2019). Esses fungos podem ser encontrados associados às raízes, caules ou

folhas das plantas, geralmente sem causar danos, embora possam se dependendo da espécie endofítica, do ambiente e do estado fisiológico da planta hospedeira (Khalmuratova, et al. 2020; Ogbe, et al., 2023). As hifas dos fungos se ramificam e expandem sua distribuição no solo, podendo se conectar a outras plantas e absorver água de camadas mais profundas do solo, inacessíveis às raízes da planta, transportando-a para os tecidos corticais da planta através das vias apoplásticas (Ilyas, et al., 2021). Dessa forma, estudos mostram que plantas em condições de estresse ambientais, foram beneficiadas pela interação de fungos endofíticos devido ao seus diferentes mecanismos de sobrevivência, dentre esses a produção de enzimas antioxidantes que podem prevenir a produção de EROs (Hosseyini Moghaddam, et al ,2021), produção da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACCD) que cliva 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) sendo o precursor do fitohormônio etileno que se acumula nos tecidos vegetais levando a planta à senescência (Chaitanya, et al, 2021). Esses mesmos fungos além de beneficiar as plantas, podem também beneficiar as funções do solo, produzindo enzimas importantes no ciclo do Nitrogênio (N) e Carbono (C) como as amilases, xilanases que são capazes de decompor compostos orgânicos, as β -glucosidases que são capazes decompor dissacarídeos e oligossacarídeos, e as proteases que hidrolisam polímeros proteicos em aminoácidos, sendo responsável por fornecer nitrogênio biodisponível (Datta, et al, 2020).

Os fungos também são capazes de produzir compostos que auxiliam no crescimento e desenvolvimento vegetal, como a produção de fitohormônios, entre eles o ácido indol-3-acético (AIA), e moléculas como sideróforos, que se ligam ao ferro, facilitando seu transporte. Além disso, contribuem para a absorção de fósforo por meio do mecanismo de solubilização (Baron; Rigobelo, 2021).

Diversos fungos possuem a habilidade de solubilizar fosfatos insolúveis ou promover a assimilação de fósforo pelas plantas, integrando uma componente vital dos produtos microbianos comerciais e desempenhando um papel crucial na disponibilização de nutrientes essenciais para o desenvolvimento vegetal (Vassileva et al., 2022). Além disso, os fungos também conseguem realizar a mineralização de P orgânico através de enzimas como as fosfatases e fitases, contribuindo indiretamente para solubilização de P (Etesami; Jeong; Glick, 2021). Sendo assim, a

associação entre fungos e plantas, pode beneficiar ambos, fornecendo nutrientes e proteção a diferentes tipos de estresses (Trentin, et al,2024).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mudanças climáticas e problemas da seca na agricultura brasileira

As mudanças climáticas são uma preocupação global pois resultam no aumento da temperatura média global, elevando a taxa de evaporação da água e acelerando o processo de seca (Shahzad et al., 2021). Esse processo está sendo mais rápido devido a interferência das atividades humanas. Por outro lado, outras regiões tem ocorrido tempestades, inundações mais severas, causando um desequilíbrio ambiental (Saleem et al., 2024). Tais alterações ambientais prejudicam a agricultura ao expor as plantas a estresses abióticos e bióticos, impactando negativamente a produtividade (Iqbal et al., 2023). Embora as secas ocorram naturalmente, as mudanças climáticas podem intensificar e aumentar sua frequência e severidade, agravando assim, os desafios para a produção agrícola (Shahzad et al., 2021).

Nesse sentido, a agricultura é uma das atividades mais impactadas pela seca, com perdas que podem afetar toda a cadeia produtiva. De acordo com o boletim do Risco da Seca na Agricultura Familiar (RISAF) de 2024, a previsão inicial para a safra era de 317,5 milhões de toneladas. No entanto, devido ao impacto da seca, a décima segunda estimativa da safra divulgada em setembro de 2024 indicou a produção de 298,41 milhões de toneladas, o que significa uma redução de 6,0%. A Tabela 1, elaborada pela Centro Nacional de Monitoramento e Alertas de Desastres Naturais (CEMADEN) com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), revela os Estados que sofreram impactos na cultura de milho devido à seca ("RiSAF - RISCO DE SECA NA AGRICULTURA FAMILIAR AGO./24", 2024).

Os impactos da seca, de acordo com o Índice Integrado de Seca (IIS3), indicaram que em setembro de 2024 houve um aumento no número total de municípios com seca extrema em relação ao mês de agosto. No entanto, apesar dos indicadores de seca em setembro, houve um avanço positivo no cenário nacional, com a diminuição do número de municípios que apresentavam seca extrema em janeiro de 2025 ("Boletim de Impactos de Extremos de Origem Hidro-Geo-Climático em Atividades Estratégicas para o Brasil", 15/10/2024, ANO 07 No 71 e 16/01/2025, ANO 07 No 74).

Pelo Monitor de Secas do Brasil, uma ferramenta que integra diversas informações para acompanhar regularmente a situação da seca no país, é possível

realizar comparações da evolução ou recuo da seca ao longo dos meses através do mapa do Brasil (Figura 1) ("Monitor de Secas do Brasil", 2025).

Tabela 1: Culturas impactadas pela seca nos estados e variação total da produção divulgada em setembro de 2024 comparado a primeira estimativa de outubro de 2023.

Estado	Safr	Cultura	PRODUÇÃO SAFRA 2023/24 (em mil t)		
			1ªEstimativa	11ªEstimativa	VAR. %
BA	2ª	Milho	5,1	64,8	24,4
MS	2ª	Milho	11.81,7	8.248,2	-25,6
MG		Arroz (Sequeiro)	2,8	2,2	-21,4
PR	3ª	Feijão cores	0,7	1,2	71,4
	2ª	Milho	13.394,2	12.939,4	-3,4
PI	1ª	Milho	1.837,5	1.235	-32,8
RO	2ª	Feijão cores	3,8	1,2	-68,4
RO	2ª	Milho	2.264,5	2.055,1	-9,2

As culturas consideram a produção total (Fonte: CEMADEN).

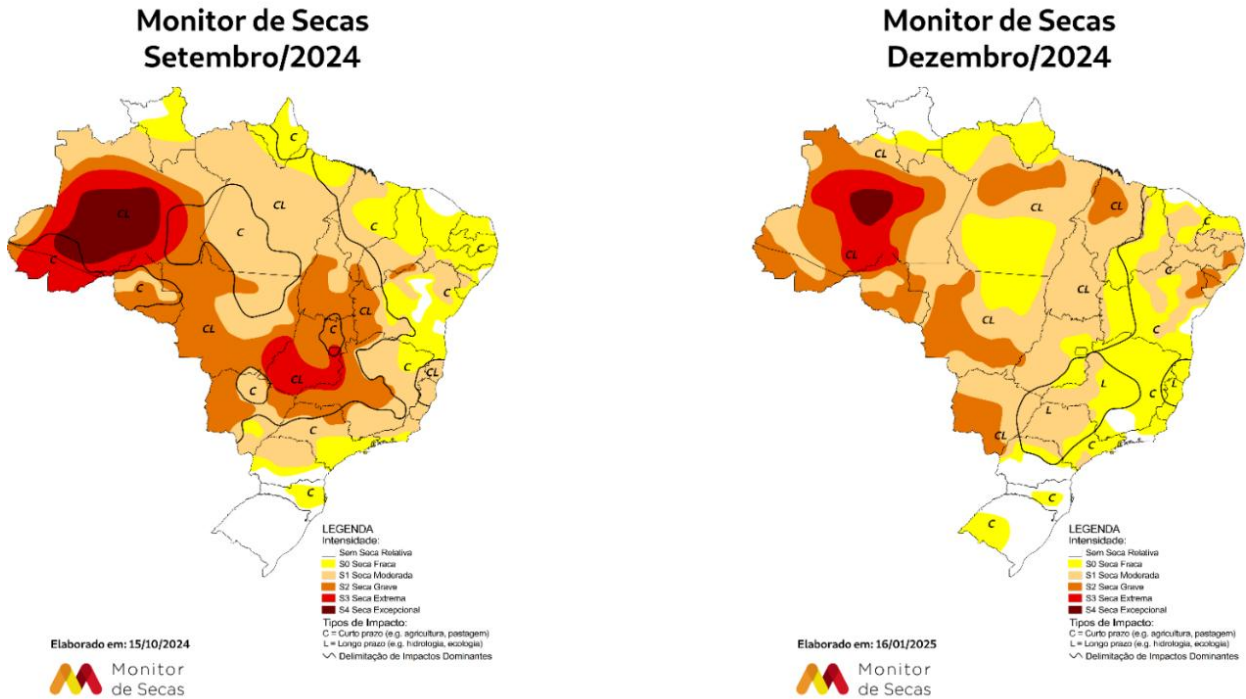


Figura 1: Comparações de mapas dos meses de setembro/2024 e dezembro/2024 sobre o monitoramento da seca no território Nacional. (Fonte: Monitor de Seca)

2.2 Impactos e estratégia vegetal em relação ao estresse hídrico

Em condições de déficit hídrico, as plantas adotam três mecanismos principais de resposta: escape do estresse, prevenção do estresse e tolerância ao estresse (Bistgani et al., 2024). O mecanismo de escape do estresse envolve a aceleração do ciclo de vida, resultando em floração precoce esse processo pode ser impulsionado pela alta produção do fitormônio etileno, que promove a senescência da planta (Chaitanya et al., 2021).

A prevenção do estresse está relacionada a mecanismos que impedem ou minimizam seu impacto, como o fechamento dos estômatos, que reduz a perda de água e, conseqüentemente, a transpiração, ajudando a evitar a desidratação (Bistgani et al., 2024). Outro mecanismo é a redução do número de folhas, o que permite menor consumo de água (Abobatta, 2019).

A tolerância ao estresse é um mecanismo crucial. Nesse caso, as plantas enfrentam estresses prolongados e se protegem por meio da síntese de proteínas, como as aquaporinas, que são proteínas localizadas nas membranas plasmáticas ou vasculares que facilitam o transporte de água e ajudam a mitigar os efeitos do estresse (Bistgani et al., 2024).

Dessa forma, as estratégias de sobrevivência adotadas pelas plantas em resposta ao estresse hídrico podem comprometer a produção agrícola (Bandurska, 2022). Embora as plantas tentem reduzir a perda de água, esse comportamento pode levar à restrição de CO₂, com aumento na produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que são tóxicas e danificam as células vegetais, e à inibição da fotossíntese, resultando em desequilíbrios hormonais (Ilyas et al., 2021).

Apesar desses efeitos adversos, as plantas também empregam mecanismos para minimizar os danos causados pela seca (Ilyas et al., 2021). Entre esses mecanismos estão a produção de enzimas antioxidantes, como peroxidase (POD) e catalase (CAT), que conseguem converter os subprodutos oxidativos prejudiciais à planta em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Por meio de outros processos, com o auxílio de cofatores como cobre, zinco, manganês e ferro, as plantas conseguem converter o H₂O₂ em água. Além disso, o acúmulo de solutos como açúcares e prolina desempenha a função de regular a pressão osmótica dentro da célula, reduzindo a perda de água e preservando a integridade celular (Bistgani et al., 2024).

Para reduzir esse impacto na cultura devido ao estresse hídrico, trabalhos com fungos como *Trichoderma harzianum* (Bakhshi et al., 2023), *Trichoderma asperellum* (Estévez-Geffriaud et al., 2020), *Fusarium solani* (Bakhshi et al., 2023) e *Beauveria bassiana* (Kuzhuppillymyal-Prabhakarankutty et al., 2020) têm demonstrado uma melhora no rendimento da cultura, auxiliando na tolerância ao estresse hídrico. Esses fungos representam uma alternativa promissora para a prevenção de perdas na produção. Além disso outros microorganismos como as bactérias, tem sido estudado para promoção de crescimento vegetal e também para o estresse hídrico como as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus megaterium* (Jha; Yadav; Mohamed, 2023) como também o gênero *Bacillus* (Azeem et al., 2022).

2.3 Associação de microorganismos a promoção de crescimento vegetal

A seca prejudica o desenvolvimento das plantas e, conseqüentemente, impacta a produção agrícola, por isso têm sido investigadas estratégias para mitigar esses danos, como a associação de fungos com plantas (Ghabooli, Kaboosi, 2022). Estudos indicam que esses fungos podem tolerar estresses, permanecendo na planta sem causar danos e contribuindo para o seu desenvolvimento (Bilal et al., 2020; Javed et al., 2022). Essa relação simbiótica entre fungos e plantas beneficia ambas as partes: a planta oferece proteção ao fungo, enquanto o fungo auxilia na disponibilidade de nutrientes do solo e na produção de compostos que favorecem o crescimento vegetal e a resistência a estresses (Trentin et al., 2024).

A promoção de crescimento vegetal mediada por fungos ocorre por meio de dois tipos de mecanismos. O primeiro é o mecanismo direto, que envolve a regulação e produção de fitormônios e a aquisição de nutrientes, enquanto o mecanismo indireto está relacionado à indução da resistência sistêmica, que ocorre através da liberação de enzimas e compostos voláteis para aumentar a tolerância a estresses abióticos e bióticos (Adeleke et al., 2022). Baron e Rigobelo (2021) apresentaram um esquema detalhado da ação desses mecanismos, como ilustrado na figura 1.

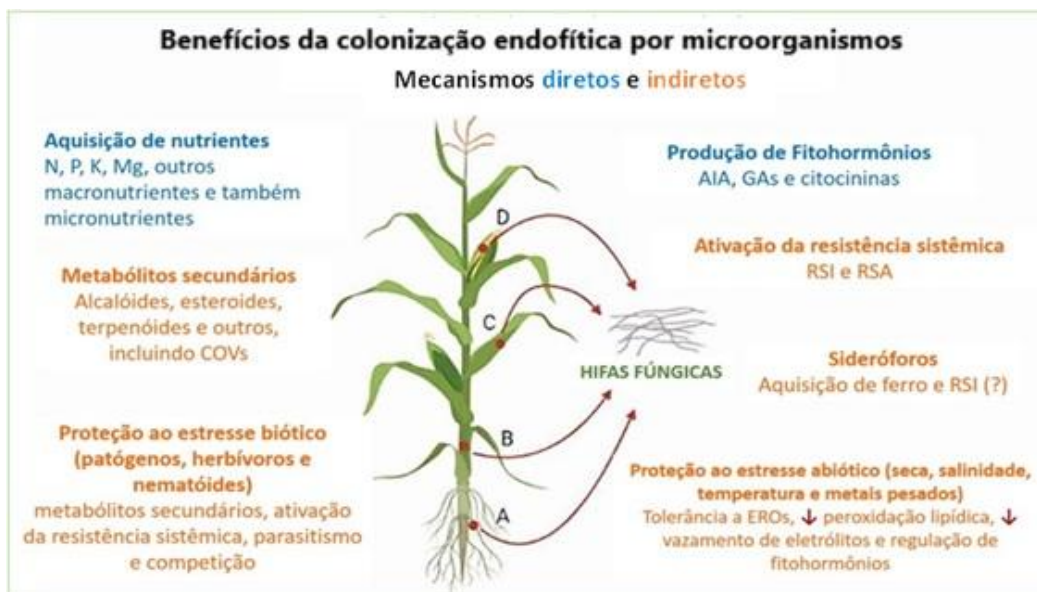


Figura 2: Mecanismo direto e indireto de promoção de crescimento vegetal. Raízes (A), Caule (B), Folhas (C), Sistemas reprodutivos e Frutos (D). Mecanismo direto é demonstrado no texto em cor azul e o mecanismo indireto está indicado no texto pela cor laranja. Esquema adaptado por Baron e Rigobelo (2021).

Entre os diversos grupos de microrganismos, os fungos filamentosos se destacam pela maior tolerância ao estresse hídrico em comparação com bactérias, principalmente devido a fatores como a produção de longas hifas, que permitem a extração de água de regiões mais profundas do solo (Hanaka et al., 2021). Assim, a identificação de fungos endofíticos adaptados a ambientes com déficit hídrico surge como uma estratégia promissora para aumentar a resistência das plantas à seca, oferecendo contribuições significativas para o avanço da biotecnologia (Hosseyini Moghaddam et al., 2021).

Além da tolerância ao estresse hídrico, os fungos devem contribuir para outros parâmetros essenciais ao desenvolvimento vegetal, como a disponibilização de fósforo (P) para as plantas, um elemento crucial para o crescimento e metabolismo dos vegetais (Etesami; Jeong; Glick, 2021).

2.3.1 Solubilização de fosfato

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o desenvolvimento celular, e está presente em várias biomoléculas como ácidos nucleicos, adenosina trifosfato, enzimas (Kaur et al., 2024). A deficiência de P pode levar à redução do tamanho e número de folhas, além de limitar o crescimento das raízes, o que pode, por sua vez,

atrasar a floração e comprometer a produtividade final de uma cultura (Echeverria et al., 2024).

Embora o solo contenha um grande reservatório de fósforo, apenas uma pequena quantidade está disponível para as plantas, que o absorvem nas formas de íons monobásicos e dibásicos, por essa razão, a aplicação em larga escala de fertilizantes fosfatados é uma prática comum para suprir essa deficiência (Subrahmanyam et al., 2020). No entanto, essa prática pode resultar em sérios problemas ambientais, como a poluição das águas superficiais e subterrâneas devido à elevada quantidade de produtos químicos, além disso, o fósforo tem a tendência de se complexar com outros óxidos metálicos, o que reduz sua disponibilidade para as plantas (Echeverria et al., 2024).

Estudos apontam que dentre a grande diversidade de espécies fúngicas cerca de 0,1% - 0,5%, são constituídos por fungos solubilizadores de fosfato (FSF) sendo grande maioria fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* (Saleem et al, 2020; Vassileva et al., 2022).

Portanto, esses fungos podem promover o crescimento e desenvolvimento vegetal, pois são capazes de dissolver fontes de fosfatos presente no solo que estão complexados com metais devido à alta reatividade do P, formando fosfatos de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio (Lacava et al., 2021). Os fungos utilizam mecanismos como secreção de ácidos orgânicos e enzimas como as fosfatases e fitases, tornando o solo mais ácido e facilitando a liberação de P que será absorvido pelas plantas (Echeverria et al., 2024).

2.3.2 Produção do fitohormônio ácido indol-3-acético (AIA)

A fisiologia vegetal é regulada por diversos tipos de fitohormônios, dentre os quais as auxinas se destacam como um dos principais reguladores da atividade vegetal, um representante de grande importância desse grupo é o ácido indol-3-acético (AIA), que promove o crescimento das raízes das plantas, facilita a absorção de nutrientes e contribui para a divisão celular (Saleem et al., 2020).

Existem algumas outras formas derivadas do AIA que contribuem também para a atividade das auxinas como: o indol-3-acetaldeído, indol-3-etanol, indol-3-acetonitrila,

ácido indol butírico (IBA) e ácido 1-naftalenoacético (NAA) (Etesami e Glick, 2024). Porém o ácido indol-3-acético é o de maior importância devido a sua produção não ser exclusivamente por plantas, mas também por microrganismos, sendo assim um dos fatores que contribuem para uma interação benéfica entre microrganismos e plantas na promoção de crescimento vegetal (Jahn et al., 2021;).

Existem duas vias no qual o AIA pode ser produzido, uma dependente de triptofano (Trp) e outra não dependente, sendo a via dependente de Trp a via mais comum para a produção do fitohormônio, dessa forma, quando a planta secreta L-triptofano, os microrganismos podem utilizar para produzir AIA (Thakor et al., 2023).

Quando a planta é submetida a um estresse hídrico, seu crescimento é comprometido pela redução na produção de fitohormônios como o AIA, pois aumenta a produção de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) no qual é precursor de outro fitormônio, o etileno, que em níveis elevados consegue inibir a produção de AIA (Orozco-Mosqueda et al., 2020; Etesami e Glick, 2024). Fungos capazes de tolerar condições adversas, como a seca, e produtores de AIA, podem auxiliar a planta contribuindo no desenvolvimento e crescimento vegetal, prevenindo também no início da senescência induzida pelo estresse hídrico (Saleem et al., 2020).

2.3.3 Produção de sideróforos

Além do fósforo, o ferro é um nutriente essencial para as plantas, desempenhando um papel fundamental em processos metabólicos, como ciclo do ácido cítrico, transporte de elétrons, fosforilação oxidativa e fotossíntese (Poveda et al., 2021). O ferro (Fe) atua como cofator essencial em várias enzimas envolvidas na síntese de fitormônios, incluindo a enzima 1-aminociclopropano ácida-1-carboxílica oxidase, que está diretamente relacionada à biossíntese do etileno. Além disso, o Fe desempenha um papel crucial como cofator em enzimas redox, como peroxidases e catalases (Rai et al., 2021; Gurleen et al., 2023). No entanto, na natureza o ferro é comumente encontrado na forma de Fe^{3+} , o que dificulta sua absorção pelas plantas (Subrahmanyam et al., 2020).

Alguns microrganismos, incluindo bactérias e fungos, são capazes de produzir sideróforos, compostos envolvidos na captação de ferro e também associados ao

mecanismo de biocontrole (Chitta Ranjan Deb; Mum Tatung, 2024). Devido a essa propriedade, tem-se atribuído grande importância aos microrganismos produtores de sideróforos, considerando seu potencial em diversas aplicações biotecnológicas (Tamariz-Angeles et al., 2021).

Sideróforos são moléculas de baixo peso molecular (500–1500 Dalton) com alta afinidade ao Fe^{3+} , refletindo seu nome, que significa “transportador de ferro”. Esse metabólito secundário, pode ser produzido por fungos e bactérias, e pode ser classificado em quatro tipos diferentes de acordo com os tipos de ligantes, estrutura e grupo funcional (Saleem et al., 2020) Primeiro os carboxilato que possui uma hidroxila ou carboxila que podem doar ferro, sendo mais eficiente em ambientes com pH ácidos os hidroxamatos que fornecem duas moléculas oxigênio (O_2) ao ferro e o catecolato é, uma classe também conhecida como fenol-catecolato, produzida apenas por bactérias e possuem grupo ácido mono- ou di-hidroxibenzóico que serve como sequestrador de ferro. Os tipos mistos que produzem dois ou mais tipos de sideróforos (Deb e Tatung, 2024).

A produção de sideróforos por esses microrganismos auxilia na quelação do Fe^{3+} , reduzindo-o a Fe^{2+} , tornando-o mais solúvel e disponível para as plantas. Isso não apenas promove o crescimento vegetal, mas também protege a planta contra a colonização por fitopatógenos, atuando como um método de biocontrole, ao reduzir a disponibilidade de ferro para os sideróforos inibem o desenvolvimento desses organismos (Saleem et al., 2020; Sivakumar et al., 2020; Nasif et al., 2023). Nesse contexto, a avaliação do potencial de microrganismos, como bactérias e fungos, tem sido amplamente estudada, pois gêneros de bactérias como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Achromobacter* (Tamariz-Angeles et al., 2021; Syed et al., 2023), assim como fungos dos gêneros *Talaromyces*, *Hypoxylon*, *Tolypocladium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, são conhecidos por apresentarem a produção de sideróforos (Tamariz-Angeles et al., 2021; Moropana et al., 2024; Cui et al., 2025)

2.3.4 Produção de enzimas:

2.3.4.1 1-Aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACCD)

Quando as plantas são expostas a determinado estresse, podem desencadear produção do fitohormônio etileno, que é responsável pela senescência (Wang et al., 2022). O processo começa com a união da metionina e ATP, catalisada pela enzima S adenosil-metionina sintetase, formando S adenosil-metionina (SAM). Em seguida, pela ação da enzima ACC sintase, SAM é convertido em ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), o principal precursor do etileno (Orozco-Mosqueda et al., 2020; Rehman et al., 2022).

Para mitigar a produção de etileno desencadeada pelo estresse nas plantas, a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACCD) desempenha um papel crucial. Ela hidrolisa o 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) em amônia e α -cetobutirato, ajudando a planta a tolerar melhor a exposição ao estresse (Wang et al., 2022; Kour et al., 2024).

A produção da enzima ACCD pode estar indiretamente associada ao crescimento das plantas, pois a redução dos níveis de etileno contribui para o aumento da transdução do sinal de AIA, que é crucial para o desenvolvimento vegetal. O etileno, sendo um inibidor desse sinal, pode interferir negativamente no crescimento das plantas (Orozco-Mosqueda et al., 2020). Estudos demonstram que fungos e bactérias podem produzir ACCD, incluindo os gêneros de fungos *Trichoderma* e *Penicillium*, e os gêneros de bactérias *Bacillus* e *Pseudomonas* (Rauf et al., 2021; Wang et al., 2022; Kour et al., 2024).

2.3.4.2 Enzimas extracelulares por fungos

A ciclagem de nutrientes é um processo importante para manter o equilíbrio do ecossistema, pois, nesse processo, os nutrientes são disponibilizados de volta ao ambiente a partir da degradação da biomassa por enzimas extracelulares (Devi et al., 2023). Os fungos filamentosos produzem enzimas extracelulares que são usadas para degradar compostos complexos, e essas enzimas podem ser aplicadas comercialmente devido à sua estabilidade, disponibilidade, custo e menor impacto ambiental (Slama et al., 2021). Enzimas como protease, β -glucosidase, xilanase e amilases, produzidas por fungos, desempenham um papel crucial no processo de ciclagem de nutrientes (C e N), mantendo o solo mais saudável para as plantas

hospedeiras e, conseqüentemente, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Devi et al., 2023).

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas, resultando na formação de aminoácidos livres e oligopeptídeos, podendo ser classificadas de acordo com o pH em que atuam, sendo as proteases ácidas comumente produzidas por fungos e atuando em pH entre 3,8 e 5,6, pertencentes ao grupo de proteases aspárticas. Entretanto, algumas bactérias também podem produzir proteases ácidas, mas geralmente produzem proteases classificadas como neutras ou alcalinas, que atuam em faixas de pH entre 5-8 e 8-12, respectivamente (Solanki et al., 2021). Possuem importância na ciclagem do nitrogênio e, por esse motivo, são enzimas que indicam atividade na mineralização presente no solo (Vieira et al., 2020; Slama et al., 2021; Da Silva et al., 2021). Além disso, as proteases podem ser classificadas por tipo de hidrólise, por semelhanças com enzimas proteolíticas como tripsina, que podem apresentar mecanismo de comportamento catalítico e também as proteases que especificidade de sítios de hidrólise como as endopeptidases (Song et al., 2023)

As β -glucosidases degradam oligossacarídeos e/ou celobiose e desempenham um papel fundamental na síntese de ligações glicosídicas, sendo uma das enzimas mais prevalentes no solo. Elas atuam na etapa final da decomposição da celulose, tornando-se, assim, enzimas indicadoras da qualidade do solo devido à sua influência no teor de carbono presente, já que o produto final dessa degradação é a glicose, uma fonte essencial de energia para outros microrganismos (Da Silva et al., 2021; Dhevagi et al., 2021).

As xilanases desempenham o papel crucial ao hidrolisar a xilana, um polissacarídeo encontrado em biomassas lignocelulósicas vegetal. Essas enzimas convertem hemiceluloses beta-1,4-xilana em xilose, um monossacarídeo com cinco carbonos (Dhevagi et al., 2021; Slama et al., 2021). As amilases, possuem o papel de hidrolisar as ligações α -1,4 e α -1,6-glicosídicas presentes na amilose e amilopectina, respectivamente, que estão no amido convertendo-as em maltose, dextrinas ou glicose dependendo do tipo de amilase. As amilases podem ser classificadas em: α -amilase, β -amilase e γ -amilase ou glucoamilase, sendo as β -amilases as mais produzida por microrganismos como bactérias e fungos (Bhatt et al., 2020; Slama et al., 2021).

A enzima fosfatase também produzidas pelos fungos, possui uma grande importância na disponibilidade de fósforo para as plantas (EL-SAWAH et al., 2021), incluindo no processo de mineralização através da liberação dessa enzima, pois são capazes de realizar a conversão do fosfato orgânico presente no solo em fosfatos di ou monobásicos, fazendo com que sejam disponíveis facilmente para a absorção nas plantas (Bononi et al., 2020).

Além dos fungos, outros microrganismos, como bactérias e leveduras, também são reconhecidos como produtores de enzimas. Entre os gêneros de maior importância na produção de enzimas estão *Trichoderma* e *Aspergillus*, para fungos e *Bacillus* e *Pseudomonas*, para bactérias (Bhadra et al., 2022).

2.4 Antioxidantes

2.4.1 Enzimáticos

A seca, pode causar desequilíbrio fisiológico nas plantas, resultando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Dvořák et al., 2021). Esse aumento pode levar ao acúmulo dessas espécies, provocando danos oxidativos nas células vegetais e, eventualmente, levando à apoptose celular. No entanto, em concentrações baixas, as EROs podem servir como sinais para a ativação de genes envolvidos na resposta ao estresse (Mansoor et al., 2022).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas nos tecidos vegetais, principalmente dentro de organelas como cloroplastos e mitocôndrias, essas moléculas resultam da redução de oxigênio e levam à produção de compostos como radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais hidroxila (OH^-) e oxigênio singlete (O_2) (Dumanović et al., 2021). Durante períodos de estresse, as plantas ativam a transcrição de enzimas antioxidantes, como uma estratégia de defesa, contribuindo para a mitigação dos danos causados por esses compostos reativos (Sahu et al., 2022).

Entre as enzimas antioxidantes, as principais classes responsáveis pela eliminação das espécies reativas de oxigênio (ERO) incluem superóxido dismutases (SODs), peroxidases (GPXs), catalases (CATs) e ascorbato peroxidases (APXs), as quais reduzem os níveis de EROs por meio da conversão do peróxido de hidrogênio em água (H_2O) e oxigênio (O_2). Um exemplo desse mecanismo é a oxidação que ocorre

no grupamento heme da enzima catalase em que o Fe^{2+} é reduzido devido à interação com H_2O_2 (Dvořák, et al., 2021; Dumanović, et al., 2021; Mansoor, et al., 2022). Sendo assim o sistema mais importante para a defesa da planta em condições de estresse é a produção de enzimas antioxidantes que procuram espécies reativas de oxigênio para mitigar os danos causados por essas moléculas (Begum et al., 2021).

2.4.2 Não Enzimáticos

Além das enzimas, as plantas também utilizam defesas não enzimáticas contra o aumento das EROs, empregando antioxidantes de baixo peso molecular como prolina, flavonóides e carotenóides (Mansoor et al., 2022). A prolina e os flavonóides são eficazes na eliminação de radicais hidroxila (OH^-) e oxigênio singlete, prevenindo danos causados pela lipoperoxidação, reduzindo prejuízos nas camadas externas dos cloroplastos. Por sua vez, os carotenóides, uma classe de fitonutrientes e pigmentos solúveis em gordura devido à sua longa cadeia alquílica, ajudam a reduzir os níveis de EROs e protegem lipoproteínas e membranas (Kesawat et al., 2023).

A cultura do milho (*Zea mays* L.), da família Poaceae, utilizada como modelo para este trabalho, é de grande importância mundial e é cultivada globalmente sob diversas condições climáticas. O milho é necessário não somente para alimentação humana, mas também como combustível e ração animal (Khaeim et al., 2022). Por ser uma espécie C4, necessita de umidade e luz para produzir alto rendimento e massa seca total, sendo moderadamente sensível a condições de seca e temperaturas elevadas (Badr et al., 2020; Khaeim et al., 2022).

Alguns estudos mostram que plantas inoculadas com fungos dos gêneros *Trichoderma* (Quazi et al., 2024), *Aspergillus* (Attia et al., 2024) e *Penicillium* (Kaur e Saxena, 2023) ajudaram na resistência contra estresse em plantas, induzindo a produção de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como aumento de prolina, enzima peroxidase e também no aumento de carotenóides.

Com isso, a interação dos fungos com as plantas, pode melhorar tanto o desenvolvimento como também aumentar a produção de produtos gerados para realizar defesa na planta, afim de reduzir os efeitos causado pelo estresse (Begum, et al., 2022).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar novos isolados fúngicos tolerantes à seca, e avaliar o potencial como promotores de crescimento vegetal.

3.2 Objetivos específicos

- a) Selecionar novos isolados fúngicos tolerantes ao estresse hídrico;
- b) Avaliar o crescimento dos isolados em diferentes temperaturas;
- c) Avaliar as características relacionadas à promoção de crescimento vegetal em condições de estresse hídrico
- d) Avaliar a eficiência do isolado mais promissor em condições de estresse hídrico na promoção de crescimento de milho em casa de vegetação;
- e) Avaliar os parâmetros de crescimento da planta: tamanho, massa seca e fresca da raiz e parte aérea
- f) Avaliar os parâmetros bioquímicos foliares;
- g) Avaliar atividade microbiana do solo.

.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem, isolamento e preservação dos microrganismos

Amostras de raízes de *Discocactus ferricola* Buining & Brederoo (Cactaceae) foram coletadas de um afloramento rochoso localizado na Fazenda São João (19° 10'46.2"S, 57° 32'19.1"W), em Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil, e transportadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus do Pantanal. O isolamento dos microrganismos da amostra foi realizado pelo Dr. Rodrigo Galeano e depositado na Micoteca da UFMS, em Campo Grande, MS, Brasil. A identificação dos isolados, em nível de gênero, foi realizada pela técnica da Micoteca Dra. Clarice Rossatto Marchetti.

Também foram utilizados dois fungos do gênero *Trichoderma* (T24 – *Trichoderma harzianum* e GT31 – *Trichoderma reesei*), que fazem parte da coleção da Micoteca da UFMS, em Campo Grande, MS, Brasil.

Os fungos foram mantidos por meio de repiques periódicos em tubos de ensaio contendo meio BDA (Batata – Dextrose-Ágar) e incubados em BOD com fotoperíodo de 12 h a 30 °C por 7 a 10 dias. Após o crescimento, os fungos foram armazenados em geladeira a 4 °C, podendo ser utilizados por um período de até 30 dias.

4.2 Análise dos isolados *in vitro*

4.2.1 Efeito da temperatura no crescimento dos microrganismos

A padronização seguiu a metodologia *one-factor-at-a-time* (OFAT), a qual foi empregada um teste por vez a fim de padronizar a condição mais adequada para avaliar os parâmetros de promoção de crescimento vegetal dos fungos em condições normais e de déficit hídrico.

Foram realizados screening com sete isolados fúngicas dos gêneros: *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2 e DF4) *Chaetomium* (DF3) e *Trichoderma* (T24 e GT31) em relação a temperatura e tolerância hídrica.

Os fungos foram crescidos em placas de petri em meio sólido de BDA por sete dias em diferentes temperaturas (30°C, 35°C e 40°C) e avaliação do crescimento em placa ocorreu de forma visual, observando o crescimento total em placa para cada temperatura.

4.3 Caracterização dos isolados para promoção de crescimento vegetal em condições normais e de déficit hídrico

A caracterização dos isolados foi realizada em erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio líquido de batata e dextrose (BD) acrescido de PEG 6000 6%, 12% e 18% para simular os níveis de potenciais osmóticos -0,1MPa, -0,2MPa e -0,4MPa, respectivamente (MENESES et al., Embrapa, 2007).

Discos de micélio de 5 mm (contendo 1×10^7 de esporos/mL) foram inoculados ao meio e incubadas a 35 °C por sete dias com agitação a 110 rpm. Após o crescimento, os isolados foram filtrados à vácuo utilizando papel filtro (Whatman nº 1), realizada a pesagem da massa fresca, e submetidas a secagem na estufa por 24 horas a 60°C para avaliar a massa seca.

4.4 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato

A capacidade dos isolados em solubilizar fosfato foi avaliada em meio líquido Pikovskaya (1948) (pH 7,0), utilizando $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (0,5%); FePO_4 (0,5%); e AlPO_4 (0,5%) como fonte fosfatada.

Em frascos erlenmeyer de 250 mL, foram adicionados 50 mL de meio contendo: Glicose 1%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,05%; NaCl 0,02%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; KCl 0,02%; Extrato de levedura 0,05%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0002%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0002%; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0,05%. O inóculo foi realizado utilizando-se três discos de micélio de 5 mm (contendo 1×10^7 de esporos/mL) da cultura. As culturas foram incubadas em *shaker* sob agitação constante de 110 rpm por sete dias a 28 °C. O meio foi filtrado a vácuo, centrifugado a $8.609 \times g$ durante 10 min o sobrenadante utilizado para mensuração do pH final em pHmetro digital e quantificação de P solúvel.

A concentração de fósforo solúvel foi determinada conforme o método proposto por Murphy e Riley (1962). A solução reveladora foi preparada utilizando H_2SO_4 5 N (50%); tartarato de antimônio e potássio (1 mg de Sb/mL) (5%); molibdato de amônio (20,0 g em 0,5 L de água destilada) (15%) e ácido ascórbico 0,1 M (30%). 100µL do sobrenadante foi homogeneizado com 2,9mL de água destilada e 480µL da solução reveladora. Após 30 min de reação as absorbâncias foram medidas a 880 nm

utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®), sendo expresso em μg de P/ml a partir de curva padrão com Fosfato de Potássio (KH_2PO_4).

4.4.1 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato em condições de déficit hídrico

Para essa etapa os isolados foram crescidos no meio descrito anteriormente, porém acrescentado PEG 6000 a concentração representativa de $-0,1\text{Mpa}$ (6%) estabelecendo a mesma temperatura e tempo de crescimento.

4.5 Ensaio enzimático de ACC deaminase

A avaliação da produção da enzima ACC- deaminase (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminase) foi realizada de acordo com Viterbo et al. (2010). Discos de micélio de 5 mm (contendo 1×10^7 de esporos/mL) dos isolados fúngicos foram crescidas em duas etapas. Na primeira etapa foram crescidos em erlenmeyer de 50mL contendo 10 mL de meio sintético (Meio 1) (SM; Yedidia et al., 1999), Glicose (1,5%); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1%); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02%); K_2HPO_4 (0,06%); KCl (0,015%) e 1,0 mL de elementos traços ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0005%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0006%; $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,0004%; CoCl_2 0,0002%). Os isolados foram crescidos em agitador orbital (110 rpm) durante 48 h à 30°C . Após as 48 horas os isolados foram transferidos para o meio 2 em erlenmeyer de 25 mL com 5 mL de meio que consiste apenas da troca da fonte de nitrogênio, substituindo o Sulfato de Amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) pelo substrato sintético ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano- ACC (Sigma-Aldrich) na concentração de 3 mM. Os isolados foram novamente incubados por 48 horas em agitador orbital (110 rpm) a 30°C .

Para quantificar a produção da enzima, foi necessário realizar a maceração do micélio que foi centrifugado por 10 min a $8600 \times g$ e ressuspender em tampão Tris 0,1 M (pH 8,0). Um volume de $200\mu\text{L}$ foi coletado e homogeneizado com $25\mu\text{L}$ de tolueno e agitado em vórtex por 30 ss. Em seguida, foram adicionados $20\mu\text{L}$ de ACC 3mM e incubados em banho maria por 15 minutos a 30°C . Após esse período, 1mL de HCl 0,56N foi adicionado e as amostras centrifugadas por 10 min a $8600 \times g$. $500\mu\text{L}$ do sobrenadante foi homogeneizado com $400\mu\text{L}$ de HCl e $150\mu\text{L}$ de solução de DNF (0,1

g de 2,4-dinitrofenilidrazina em 50 mL de HCl 2 N) e incubados novamente a 30°C em banho-maria por 30 min e em seguida adicionados 1mL de NaOH 2N. A absorbância foi medida a um comprimento de onda de 540 nm utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®).

A atividade da ACC deaminase foi avaliada pela quantidade de α -cetobutirato produzido pela desaminação do ACC a partir da utilização de uma curva padrão com α -cetobutirato. A atividade da ACCD foi expressa em μ M de α -cetobutirato h-1 mg-1 de proteína. Para determinar a concentração de proteínas nas amostras, foi utilizado o método proposto por Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão, a 595 nm.

4.5.1 Ensaio enzimático de ACC deaminase em condições de déficit hídrico

Para essa etapa foram selecionados os fungos que apresentaram produção de ACCD (DF1, DF2, DF3, DF5 e T24) e foram submetidos ao mesmo ensaio, porém incluindo PEG 6000 a concentração representativa de -0,1Mpa. As análises seguiram como já descrito no item 4.5. Após a conclusão deste experimento, foram selecionados os fungos que iriam dar continuidade às próximas etapas deste estudo.

4.6 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

Para avaliar a capacidade de produção de AIA, discos de micélio de 5 mm (contendo 1×10^7 de esporos/mL) dos isolados DF1, DF2, DF3, DF5 e T24, foram crescidos em erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio Czapek modificado: Glicose (1%); extrato de levedura (0,1%); K_2HPO_4 (0,1%); $MgSO_4$ (0,05%); $FeSO_4$ (0,001%); pH 7.0, e o meio suplementado com L- triptofano (L-Trp) a 0,1% (p/v) tendo vista que é precursor do fitormônio. Os isolados foram cultivados em agitador orbital (110 rpm), por 7 dias a 35°C na ausência de luz.

Para detectar de forma qualitativa a produção de AIA foi utilizada a metodologia conforme descrita por Gordon e Weber (1951). A avaliação da produção de AIA foi feita em três, cinco e sete dias de incubação, alíquotas de 2 mL foram coletadas e centrifugadas durante 10 min a 8600 x g. Após a centrifugação foram coletados 100 μ L do sobrenadante e homogeneizados com 100 μ L do reagente de Salkowski (2% de $FeCl_3$ 0.5 M, 98% de $HClO_4$ a 35%). As amostras foram incubadas em temperatura

ambiente por 30 min no escuro. É indicado como positivo a produção de AIA pela formação da cor rosa após o fim da incubação. Em seguida foi realizada a avaliação quantificação do AIA segundo o método proposto por Loper e Schroth (1986). A leitura das amostras foi feita em comprimento de onda de 530nm em um leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®). A concentração de AIA foi determinada pela curva-padrão de AIA comercial (Sigma-Aldrich®) preparada com quantidades conhecidas: 1, 5, 10, 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.6.1 Produção de ácido indol-3-acético (AIA) em condições de déficit hídrico

Seguindo a etapa de déficit hídrico, os isolados foram crescidos no meio descrito anteriormente, porém acrescentado PEG 6000 (-0,1Mpa). As análises seguiram como já descrito no item 4.6, seguindo a mesma temperatura e tempo de crescimento.

4.7 Produção de Sideróforos

Discos de micélio de 5 mm (contendo 1×10^7 de esporos/mL) foram crescidos em erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio Czapek modificado com ausência de ferro: Glicose (1%); extrato de levedura (0,1%); K_2HPO_4 (0,1%); MgSO_4 (0,05%). Toda vidraria utilizada no experimento foi lavada em solução de HCl 3M e enxaguada três vezes com água deionizada.

A avaliação da produção de sideróforos foi realizada utilizando o método do Chrome Azurol S(CAS) descrito por Schwyn e Neilands (1987) e modificado por Alexander e Zuberer (1991). A solução CAS é preparada a partir de quatro soluções diferentes. Para solução 1 foi preparado 25 mL de HDTMA 10mM. 100mL da solução 2 é preparada a partir do cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM) com HCL 10mM. A solução 3 foi preparada com 25 mL de Cromo Azurol S 2mM e a solução 4 contendo 4,307g de piperazina anidra junto com 6,25mL de HCL 12M completados em 50mL de água. Para o preparo da solução CAS- Férrica foi preciso misturar: 25mL da solução 1, 1,5mL da solução 2, 7,5mL da solução 3, 56,25mL da solução 4, obtendo o volume final de 100mL. Essa solução estabelece o complexo CAS-Fe formando uma solução de coloração azul.

Após o tempo de incubação em agitador orbital (110 rpm) por cinco dias a 35°C, as culturas foram centrifugadas durante 10 min a 8600 x g e o sobrenadante seguiu para análise. Foram coletadas alíquotas de 100µL e homogeneizadas com 100µL da solução de CAS. Após 60 minutos de incubação em temperatura ambiente e no escuro, a leitura foi realizada em leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®) a 630 nm. O branco foi preparado sem a adição de filtrado das culturas (amostra de referência). Para o cálculo da porcentagem de produção de sideróforos os valores de absorbância das amostras foram subtraídos pelo valor de absorbância da amostra de referência, seguindo a fórmula:

$$\% \text{ Unidade de Sideróforos} = (Ar - Aa) \div Ar \times 100.$$

Em que: Ar = Absorbância de referência; Aa = Absorbância da amostra

4.7.1 Produção de Sideróforos em condições de déficit hídrico

Para etapa de tolerância hídrica, os isolados foram crescidos no meio descrito anteriormente, porém acrescentado PEG 6000 (-0,1Mpa). As análises seguiram como já descrito no item 4.7.

4.8 Produção enzimática em condições normais e em déficit hídrico

Para os ensaios enzimáticos, discos de micélio de 5 mm (contendo 1×10^7 de esporos/mL) dos isolados foram inoculados em erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio TLE (Ramada, et al, 2016): $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$ (0,03%); KH_2PO_4 (0,2%); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,14%); $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,03%); uréia (0,03%); peptona (0,1%); solução de traços (Fe^{2+} , Zn^{+2} , Mn^{2+} , Cu^{2+}) (0,1%); com 1% de farelo de trigo como fonte de carbono em pH 6,5. Outro meio TLE com PEG (-0,1Mpa) também foi preparado para avaliar a produção em déficit hídrico. Após 7 dias de incubação em agitador orbital (110 rpm), alíquotas de 3, 5 e 7 dias foram coletadas, centrifugadas por 10 min a 8600 x g e os sobrenadantes foram coletados para avaliar a produção enzimática.

4.9 Ensaio enzimático e quantificação de proteínas

4.9.1 Dosagem de amilase e xilanase

A atividade de xilanase e amilase foi avaliada usando ácido 3',5'-dinitrosalicílico (DNS) conforme descrito por Miller (1959). O ensaio enzimático foi realizado utilizando 500 µL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) contendo 1% de amido solúvel ou xilana oat spelt (Sigma- Aldrich) para amilase e xilanase respectivamente, 400 µL de água destilada e 100 µL do extrato bruto. A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C por 10 minutos. Após a incubação, foram retirados 200 µL da amostra, os quais foram homogeneizados com 200 µL de DNS e fervidos por 5 minutos.

Após essa etapa foram adicionados 2 mL de água destilada e coletados 200µL de cada amostra para as leituras das absorbâncias em leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®), em comprimento de onda de 540 nm. Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol glicose por minuto sob as condições do ensaio.

4.9.2 Dosagem de proteases

O ensaio enzimático de protease, foi realizado utilizando-se 1,0 mL de tampão fosfato de sódio monobásico 50 mM (pH 6,5) com 1% de caseína como substrato e 100 µL do extrato bruto, segundo metodologia descrita por Sarath et al. (1996). A mistura foi incubada por 10 min a 45°C e interrompida com 500 µL de ácido tricloroacético (TCA). A mistura foi centrifugada a 8600 x g por 10 min e o sobrenadante foi utilizado. As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro (FEMTO®) em comprimento de onda de 280 nm. A atividade foi expressa em unidade por mL (U/mL), a partir de uma curva padrão de Tirosina (Try), definindo assim a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 µmol de Try/min nas condições do ensaio.

4.9.3 Dosagem de β-glucosidase e fosfatase

A atividade β-glucosidase e fosfatase, foi avaliada usando *p*-nitrofenil-β-D-glucopiranosídeo (*p*NP-Glu) e *p*-nitrofenil-fosfato (*p*NP-P) como substrato, seguindo método descrito por Tabatai e Eivasi (1988). Para reação foram adicionados 40µL de *p*NP-Glu (5mM) ou *p*NP-P (5mM), 50µL de tampão acetato de sódio 100mM (pH 5,0)

e 10µL do extrato bruto e incubados por 10 min em banho maria a 37°C. Para interromper a reação, foram adicionados 100µL NaOH 0,1 M. A absorbância foi medida a 410 nm utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®). Uma unidade de atividade (1U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de *p*-nitrofenolato por minuto.

4.9.4 Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada empregando-se o método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão, a 595 nm.

4.10 Análise do isolado *in planta*

Experimento em casa de vegetação de promoção de crescimento vegetal por *Penicillium* DF1 em milho em condições normais e stress hídrico

4.10.1 Experimento de promoção do crescimento e déficit hídrico

O fungo DF1 foi previamente cultivado em meio BDA inclinado por 7 dias a 30°C. Posteriormente, foi preparada uma suspensão de conídios em carboximetilcelulose (CMC), ajustando-se a concentração para 1×10^7 esporos/mL utilizando uma câmara de Neubauer sob microscopia óptica.

Vasos com capacidade de 700 mL contendo aproximadamente 1 kg de solo foram utilizados para os experimentos. O solo foi enriquecido com superfosfato simples (31%, 1,44 g), ureia (0,72 g) e cloreto de potássio (0,72 g). Sementes de milho (*Zea mays* ADV 9339) foram empregadas como modelo experimental. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos e oito repetições cada. Os parâmetros de crescimento das plantas foram avaliados sob três regimes de irrigação: irrigação padrão da casa de vegetação (três irrigações diárias de aproximadamente 15 mL cada), irrigação moderada (uma irrigação diária durante sete dias) e ausência de irrigação (durante sete dias).

As plantas foram irrigadas até o 16º dia de desenvolvimento, após isso foram submetidas ao stress hídrico. Após 22 dias de crescimento das plantas, essas foram retiradas e utilizadas para as primeiras análises, incluindo a altura da parte aérea,

comprimento da raiz, massas fresco e seco. Em seguida, as folhas de cada tratamento foram separadas para análises bioquímicas.

4.11 Análises bioquímicas

Para as análises de açúcares totais, açúcares redutores, aminoácidos livres totais, compostos fenólicos e flavonóides, a preparação da matéria fresca consistiu na maceração de 0,3 g de massa fresca foliar em nitrogênio líquido, seguida pela adição de 5 mL de solução de metanol 80%. As amostras foram centrifugadas a 8600 x g por 10 minutos e colocadas em tubos Falcon de 15 mL, envoltos em papel alumínio para preservar as amostras da luz.

Para as análises das enzimas antioxidantes—peroxidase, ascorbato peroxidase, catalase e superóxido dismutase—a preparação para a extração enzimática envolveu a maceração de 0,3 g de massa fresca foliar em nitrogênio líquido, seguida pela adição de 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), polivinilpolipirrolidona (PVPP), 50 µL de EDTA 10 mM, 500 µL de ácido ascórbico 200 mM e 1,95 mL de água destilada. As amostras foram centrifugadas a 8600 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado em tubos de 5 mL, para posterior análise de cada enzima.

4.11.1 Quantificação de clorofila e carotenóides

Para a extração dos pigmentos, 0,3 g de massa fresca foliar foram pesados e macerados em nitrogênio líquido, seguidos da adição de 1,5 mL de acetona 85%. As amostras foram colocadas em microtubos de 2,0 mL e centrifugadas a 8600 x g por três minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e armazenado em tubos falcon de 15 mL, protegidos da luz. A adição de acetona 85% foi repetida até que o pellet ficasse descolorido. Posteriormente, o volume da amostra foi ajustado para 10 mL e a leitura realizada em espectrofotômetro em três comprimentos de onda: 645, 663 e 470 nm.

As concentrações de clorofila total, clorofila a e b foram analisadas segundo a metodologia de Ross (1974) e as concentrações de carotenoides de acordo com Lichtenthaler (2001). Ambas as análises foram medidas espectrofotometricamente e a razão clorofila a/b e carotenoides foram calculadas conforme a fórmula abaixo:

Clorofila *a*: $C^a = 12.25 A_{663} - 2.79 A_{647}$ (ug/mL solução)

Clorofila *b*: $C^b = 21.50 A_{663} - 5.10 A_{647}$ (ug/mL solução)

Clorofila total: Clorofila *a* + Clorofila *b* (ug/mL solução)

Carotenóides totais: $[(1000 A_{470}) - (1.82 C^a) - (85.02 C^b)] / 198$ (ug/mL solução)

4.11.2 Dosagem de açúcares totais

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia de Dubois (1956). Foram coletados 10 µL do extrato metanólico e homogeneizados com 490 µL de água destilada, 500 µL de fenol (5%) e 2 mL de H₂SO₄ em tubos de ensaio, deixando em repouso por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C em banho-maria, e as absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro.

A concentração de açúcares totais foi determinada a partir de uma curva-padrão, utilizando diferentes concentrações de glicose, partindo de uma solução com concentração de 1 mg/mL. Açúcares totais foram expressos em açúcar total por mg⁻¹ peso fresco.

4.11.3 Dosagem de açúcares redutores totais

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia de Miller (1959). Foram coletados 10 µL do extrato e homogeneizados com 90 µL de água destilada, 100 µL de DNS em tubos de ensaio. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 100°C, e as absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 540 nm utilizando-se um Leitor de microplacas (SpectraMax Plus 384®).

A concentração de açúcares totais foi determinada a partir de uma curva-padrão, utilizando diferentes concentrações de glicose, partindo de uma solução com concentração de 1 mg/mL. Açúcares redutores foram expressos em açúcar total por mg⁻¹ peso fresco.

4.11.4 Quantificação de Prolina

O aminoácido prolina foi quantificado seguindo a metodologia de Bates et al. (1973). 0,3g de massa fresca foliar foram pesadas e maceradas em 5,0 mL de ácido sulfossalicílico a 3% e centrifugadas a 2100 x g por 10 min. 500 µL do sobrenadante foram homogeneizados com 500 µL de solução de ninidrina ácida (ninidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona) + ácido acético glacial (CH₃COOH) + ácido fosfórico (H₃PO₄) 6M) e 500 µL de Ácido acético glacial e incubadas por 60 min a 96°C. Após a incubação, foram adicionados 1,0 mL de tolueno aos tubos e agitados por 30 segundos em um agitador vórtex. Após a separação das fases orgânica e aquosa, a parte pigmentada com coloração rósea foram realizadas as leituras das absorbâncias a 520 nm em espectrofotômetro.

Para o cálculo de concentração de prolina, foi realizada uma curva padrão com prolina (1,0 mg/mL) empregando a equação de Bates et al. (1973) com modificações de acordo com o ensaio:

$$\left[\frac{\frac{\mu g \text{ prolina}}{0,5 \text{ mL da A}} \times 1,0 \text{ mL de T} \times 5,0 \text{ mL de AS}}{115,13 \mu g/\mu mol} \right] \div \text{peso (g) de amostra}$$

4.11.5 Dosagem de aminoácidos livres totais

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia de Sandhya (2010). Foram coletados 50 µL do extrato e homogeneizados com 450 µL de metanol 80%, 500 µL de tampão citrato (citrato de sódio diidratado a 0,04 M + ácido cítrico a 0,06 M, suplementado com ácido ascórbico a 0,2%) pH 5,2 e 1mL de solução de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70%, em tubos de ensaio. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 95°C, e as absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 570 nm.

A concentração foi determinada a partir de uma curva-padrão, utilizando diferentes concentrações de L-leucina, partindo de uma solução com concentração de 1 mg/mL. Os resultados são expressos em mg g⁻¹ de peso fresco.

4.11.6 Dosagem de compostos fenólicos totais

O ensaio seguiu a metodologia de Arnaldos (2001). Foram coletados 200 µL do extrato e homogeneizados com 2mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 2%, 150 µL de

Folin-Ciocalteu, em tubos de ensaio. As amostras foram deixadas em repouso no escuro por 60 minutos em temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 750 nm.

A concentração foi determinada a partir de uma curva-padrão de ácido gálico (1mg/mL). Os resultados são expressos como mg de equivalente de ácido gálico por mg g⁻¹ peso fresco.

4.11.7 Dosagem de flavonóides totais

O ensaio seguiu a metodologia de Assis et al. (2020) adaptada de Woisky e Salatino (1998) com algumas modificações. Foram coletados 500 µL do extrato e homogeneizados com 2,5mL de etanol e 500 µL de cloreto de alumínio (AlCl₃) 2% em metanol, em tubos de ensaio. Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso no escuro por 60 minutos a temperatura ambiente. As absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 420 nm.

A concentração foi determinada a partir de uma curva-padrão, utilizando diferentes concentrações de rutina, partindo de uma solução com concentração de 1 mg/mL. Os resultados são expressos como mg de equivalente de rutina por g⁻¹ peso fresco.

4.12 Enzimas antioxidantes

4.12.1 Dosagem da peroxidase

Para o ensaio da peroxidase, foram utilizadas as amostras preparadas conforme descrito no item 4.10 para ensaio enzimas antioxidantes. O ensaio seguiu a metodologia de Campos (2003). O extrato enzimático (750µL) foi homogeneizado com 1,25mL de tampão fosfato-citrato (pH 5,0) contendo Na₂HPO₄ 0,2 M + ácido cítrico 0,1 M, 125 µL de H₂O₂ 3% e 125 µL de pirogallol (0,5%) em tubos de ensaio. Em seguida as amostras foram encubadas em banho maria a 30 °C por 15 min. Após a encubação 125 µL da solução de meta bissulfito de sódio 2% foram adicionadas, homogeneizadas em vórtex e deixadas em repouso por 10 min. As absorbâncias foram lidas num comprimento de onda de 450nm.

A atividade da enzima foi expressa em unidade enzimática (UE). Uma unidade da enzima é definida como a quantidade de extrato enzimático que acusou um aumento na absorbância de 0,001 unidade por minuto de reação. Para expressão enzimática foi utilizado o coeficiente de extinção molar ($2,47 \text{ mM cm}^{-1}$).

4.12.2 Dosagem da ascorbato peroxidase

O ensaio seguiu a metodologia de Nakano (1981). O extrato enzimático (25 μ L) foi homogeneizado no momento na leitura no espectrofotômetro a 290 nm com 0,5 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 50 μ L de ácido ascórbico 10 mM, 50 μ L de H_2O_2 2 mM e 375 μ L de água destilada em tubos de ensaio. Feita de forma cinética, com duração de 60 s, com intervalo de 10 em 10 s, em que foi observado o decréscimo da absorbância. O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando o coeficiente de extinção molar ($2,8 \text{ mM cm}^{-1}$).

4.12.3 Dosagem da catalase

O ensaio seguiu a metodologia de Havir (1987). O extrato enzimático (50 μ L) foi homogeneizado no momento na leitura no espectrofotômetro a 240 nm com 0,7 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 50 μ L de tampão fosfato de potássio + PVPP 1%, 250 μ L de H_2O_2 50 mM em tubos de ensaio. A leitura foi feita de forma cinética, com duração de 90 s, com intervalo de 10 em 10 s, em que foi observado o decréscimo da absorbância. O cálculo da atividade enzimática foi feito utilizando o coeficiente de extinção molar ($39,4 \text{ mM cm}^{-1}$).

4.12.4 Dosagem da superóxido dismutase (SOD)

O ensaio seguiu a metodologia de Sun (1988). Tubos de ensaio foram cobertos com papel alumínio para evitar o contato com luz. Foram adicionados aos tubos 1 mL do tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,8) contendo EDTA 0,1 mM e metionina 19,5 mM, em seguida adicionado 50 μ L do extrato enzimático. Em ambiente com baixa luminosidade, foram adicionados 150 μ L de NBT 750 μ M e 300 μ L de riboflavina 10 μ M. Após isso os tubos foram expostos a luz por 10 min e em seguidas protegidas novamente com o papel alumínio. O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro no comprimento de onda de 560 nm. Tubos de reação com 50 μ L de tampão fosfato de

sódio, substituindo o extrato enzimático, que permaneceram no escuro ou expostos à luz foram utilizados como controle 1 e controle 2, respectivamente.

Para calcular a atividade de SOD, seguiu-se a equação:

$$AbsA = AbsA560nm - AbsB$$

Em seguida é calculado a porcentagem (%) de inibição:

$$\% \text{ inibição da redução de NBT pela SOD} = \frac{AbsBs - AbsA}{AbsBs} \times 100$$

É calculado a unidade da enzima seguindo a regra de 3 onde 50% de inibição é igual a 1 unidade (U) de enzima. Por fim, o cálculo para obtenção da U de SOD total do extrato enzimático levando em conta 1,0 g de massa fresca foliar:

$$\text{Cálculo da U de SOD total} = \frac{U \text{ de SOD}}{V (\mu L)} \times Vt \div MF (g)$$

A atividade específica (AE) foi expressa dividindo a U de SOD / proteína.

4.13 Dosagem da peroxidação lipídica

O ensaio seguiu a metodologia adaptada de Cakmak and Host (1991). Em microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 200 μ L da solução de TBA (0,5% p/v) composta de 0,05g de ácido tiobarbitúrico, 10mL de solução de TCA 12%, homogeneizado com 50 μ L do extrato enzimático. As amostras foram incubadas em banho-maria por 30 min a 90 °C e em seguidas retiradas e resfriadas em gelo na ausência de luz. Após 15 min de resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi lido no espectrofotômetro a um comprimento de onda de 532 e 600 nm.

O teor de MDA nas amostras foi calculado com base usando o coeficiente absortividade do MDA de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ e os resultados são expressos como nmol g⁻¹ MF (peso fresco), conforme a equação:

$$\text{Concentração de MDA (mM)} = \frac{A532 \text{ nm} - A600 \text{ nm}}{\xi \cdot b}$$

$$\text{Concentração de MDA } (\mu\text{mol}) = \text{Concentração de MDA } (\text{mM}) \times 1000$$

$$\text{Concentração de MDA } (\text{nmol por g de MF}) = \frac{\text{Concentração de MDA } (\text{nmol}) \times 100}{0,1 - 0,5}$$

4.14 Avaliação da atividade microbiana pela hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)

Para realizar o ensaio de hidrólise do diacetato de fluoresceína, seguiu-se a metodologia de Guini et al. (1998). Foram pesados 1,25g de solo de cada tratamento em erlenmeyer de 125 mL. Em seguida foram adicionados 5 mL de tampão fosfato de potássio 60 mM (pH 7,6) e 50 µL de diacetato de fluoresceína (FDA) e as amostras foram incubadas a 25°C por 60 min em agitação. Após isso, foram acrescentados 5 mL de acetona, centrifugadas a 1400 x g por 10 min e protegidas da luz com papel alumínio. As absorbâncias foram lidas em comprimento de onda de 490 nm.

Para a quantificação de FDA hidrolisado, uma curva padrão com diferentes concentrações de FDA (0, 100, 200, 300 e 400 µg) foi preparada em tubos de ensaio contendo tampão fosfato de potássio 60 mM. Os tubos foram fervidos por 1 h para ocorrer a hidrólise do substrato. Os resultados foram expressos em µg de FDA hidrolisado por grama de solo.

4.15 Análise dos resultados e estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos representam a média e desvio padrão, de acordo com as metodologias pré-estabelecidas. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA), e quando significativo, as médias são comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). Somente no ensaio de solubilização de fosfato foi necessário utilizar um segundo teste de Scott- Knott para comparação entre os tratamentos.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1 Origem dos isolados

Os cinco fungos utilizados neste estudo foram coletados na Fazenda São João (FSJ), localizada em Corumbá (Figura 3), uma área caracterizada por um afloramento rochoso, formação geológica originada pela deposição de sedimentos ferruginosos do Planalto Residual do Maciço do Urucum, associada à ação de intemperismo (Lima et al., 2019). Esses ecossistemas, conhecidos como 'bancadas lateríticas' ou 'cangas', abrigam vegetação adaptada a condições ambientais extremas, como escassez hídrica e temperaturas elevadas (Takahasi e Meirelles, 2014; Ruas et al., 2020). O clima regional é classificado como Aw megatérmico, de acordo com Köppen, apresentando invernos secos e verões chuvosos, com uma temperatura média anual de 25,1 °C e máximas que podem atingir 40 °C (Soriano, 2000).



Figura 3: Imagem a esquerda: Google Maps. Imagem a direita: Fazenda São João (19° 10 '46.2 "S, 57° 32' 19.1"W), em Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.

A adaptação de plantas, como *Discocactus ferricola*, a ambientes desafiadores pode promover a associação com espécies fúngicas que apresentam mecanismos de tolerância a condições abióticas adversas (Viana et al., 2020). Nesse contexto, a relevância dessa região torna-se evidente para a investigação de novos isolados com potencial para atuar como promotores de crescimento vegetal sob condições de déficit hídrico.

A partir do isolamento e com base nas características morfológicas, foram identificados os gêneros dos fungos: *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2 e DF4) *Chaetomium* sp (DF3) (figura 4).

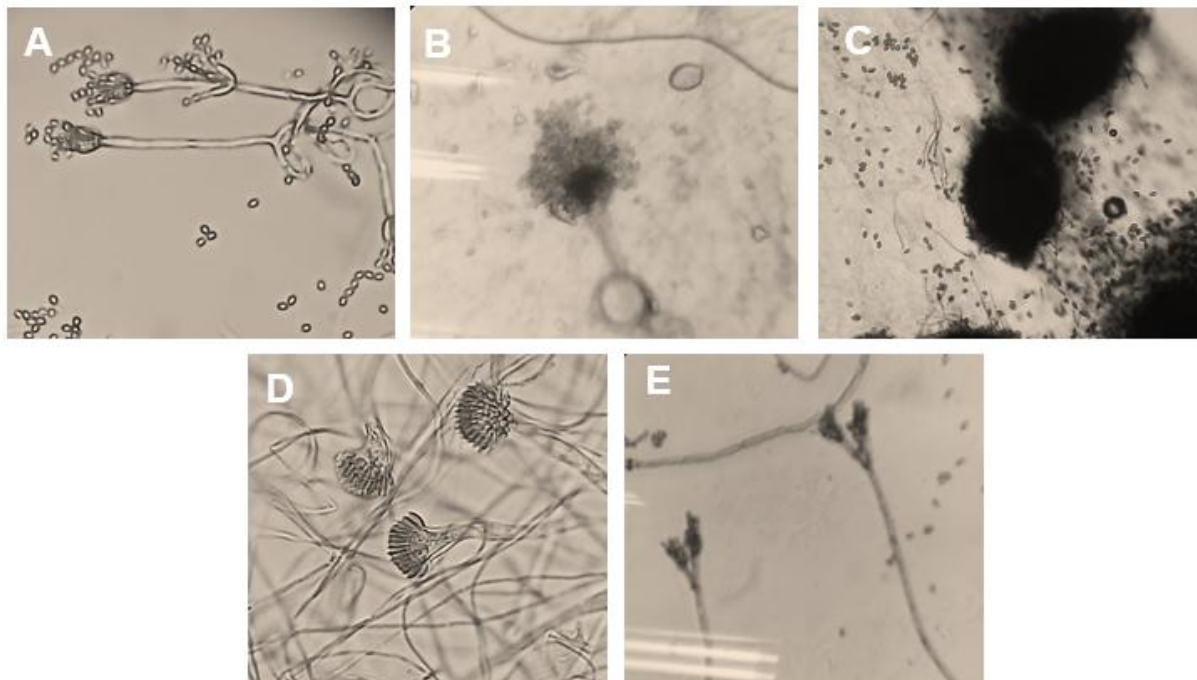


Figura 4: Imagens ao microscópio ótico (aumento de 40x) dos isolados *Penicillium* sp (DF1) (A), *Aspergillus* sp (DF2) (B), *Chaetomium* sp (DF3) (C), *Aspergillus* sp (DF4) (D) e *Penicillium* sp (DF5) (E).

Foi observado que os fungos classificados como *Penicillium* sp (DF1 e DF5), apresentaram conídios em cadeia a partir de verticilos das fiálides. Para os fungos classificados como *Aspergillus* sp (DF2 e DF4), hifas septadas e hialinas, com ramificações dicotômicas. Já para o fungo classificado com o gênero *Chaetomium* sp (DF3), apresentou estruturas reprodutivas arredondadas, os esporos em formato de limão com hifas ramificadas.

Os isolados T24 e GT31 pertencente da coleção presente na Micoteca do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos- INBIO (UFMS), já foram identificados a nível de espécie como *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma reesei*, respectivamente.

5.2 Efeito da temperatura no crescimento dos microrganismos

Foi realizado um screening com sete isolados para avaliar o crescimento das colônias em diferentes temperaturas. com o objetivo de comparar visualmente o

crescimento das colônias. Como mostrado na Figura 5, todos os isolados apresentaram crescimento nas temperaturas de 30 e 35 °C.

Nessas temperaturas, as características das colônias, como cor, formato e coloração, não foram alteradas. Em temperatura de 40 °C, houve uma redução significativa no crescimento para a maioria dos isolados (DF1, DF3, T24 e GT31), exceto para os fungos DF2, DF4 e DF5, que mantiveram o crescimento tomando todo o tamanho da placa. Com base nos resultados obtidos, a temperatura de 35 °C foi escolhida para dar sequência aos experimentos.

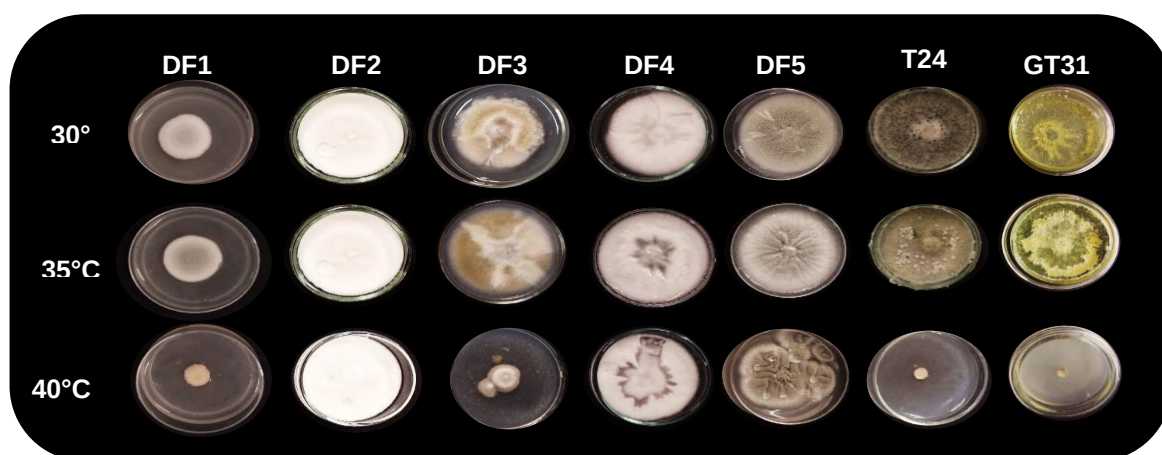


Figura 5: Efeito da temperatura no crescimento de fungos filamentosos em meio sólido (BDA). *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2 e DF4) *Chaetomium* sp (DF3), *Trichoderma harzianum* (T24) e *Trichoderma reesei* (GT31).

5.2 Caracterização dos isolados para promoção de crescimento vegetal em condições normais e de déficit hídrico

Após determinar a temperatura ideal de crescimento em 35°C, foi avaliado a capacidade dos isolados de crescer sob condições de déficit hídrico, utilizando PEG 6000 nas concentrações de -0,1 MPa, -0,2 MPa e -0,4 MPa. Todos os isolados apresentaram crescimento micelial em todas concentrações de PEG (-0,4 MPa) (Tabela 2). Contudo, sob déficit hídrico de -0,1 MPa, os isolados demonstraram o maior crescimento micelial, com destaque para o isolado T24, cujo desempenho foi estatisticamente superior aos demais. Nesse intervalo de déficit hídrico, os outros isolados não apresentaram diferença estatística, exceto pelos isolados DF2 e DF4.

Tabela 2: Massa seca em diferentes concentrações de PEG 6000 (-0,1MPa, -0,2MPa e -0,4MPa), em meio BD. *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2 e DF4), *Chaetomium* (DF3) e *Trichoderma harzianum* (T24) e *Trichoderma reesei* (GT31).

Mpa PEG (%) /ISOLADO	DF1	DF2	DF3	DF4	DF5	T24	GT31
0,0	100%±0,0 ^a	100%±0,0 ^a	100%±0,0 ^a	100%±0,0 ^a	100%±0,0 ^a	100%±0,0 ^a	100%±0,0 ^a
-0,1	80,7%±0,5 ^c	85,4%±6,0 ^b	81,0%±2,2 ^c	88,5%±1,5 ^b	83,1%±1,2 ^c	97,9%±1,4 ^a	83,5%±3,0 ^c
-0,2	74,4%±1,8 ^d	67,8%±9,0 ^e	73,6%±2,7 ^d	73,7%±1,4 ^d	72,4%±1,2 ^d	77,9%±2,9 ^c	65,7%±1,6 ^e
-0,4	59,4%±1,5 ^f	60,5%±2,6 ^f	73,2%±2,4 ^d	73,9%±1,2 ^d	53,6%±0,8 ^g	75,0%±1,8 ^d	63,7%±2,9 ^e

As letras diferentes representam diferenças significativas em relação aos tratamentos (p-value < 0,05), conforme determinado pelo teste de Tukey.

A utilização do polietilenoglicol (PEG) em experimentos de déficit hídrico em meio de cultura é devido ao seu alto peso molecular, solubilidade em água, propriedades não iônicas e incapacidade de penetrar nas células, resultando na criação de um potencial osmótico negativo no meio de cultura, sem causar danos ou toxicidade às células (Ahmad et al., 2020; Martínez-Santos et al., 2021). Estudos utilizando PEG para simular estresse hídrico demonstram o crescimento de fungos em concentrações similares às utilizadas neste estudo. Kaur e colaboradores (2023) demonstraram que os isolados cresceram em concentrações simuladas de -0,4 MPa, com destaque para o fungo *Penicillium citrinum*. Todos os isolados demonstraram capacidade de sobrevivência sob concentrações que simulam -0,1 MPa, um potencial osmótico que caracteriza ambientes de seca em regiões agrícolas. Lü e colaboradores (2023), observaram o mesmo padrão de crescimento, com diversos isolados, dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* — os mesmos gêneros analisados neste estudo — mantendo seu crescimento até a concentração máxima de PEG 6000 (-0,4 MPa), semelhante à utilizada neste trabalho.

Em concentrações de PEG 6000 que simulam -0,1 MPa, não foram observadas alterações significativas no desenvolvimento micelial. Assim, a concentração de 6% de PEG 6000 foi utilizada para simular o estresse hídrico, correspondendo a um potencial osmótico de -0,1 MPa.

5.3 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato em condições normais e déficit hídrico

Neste estudo, os sete isolados fúngicos foram avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio na presença e ausência de PEG, em diferentes tempos de incubação (três, cinco e sete dias) como demonstrado no *Heatmap* (Figura 6).

Os isolados DF1, DF2, DF3 e T24, pertencentes aos gêneros *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Chaetomium* sp e a espécie *Trichoderma harzianum*, demonstraram eficiência no processo de solubilização de fosfato de cálcio ao longo dos dias. Os valores observados foram de 674,6 µg P/mL, 365,0 µg P/mL, 420,5 µg P/mL e 373,1 µg P/mL, para *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp, *Chaetomium* sp e a espécie *Trichoderma harzianum*, respectivamente, após cinco dias de incubação, exceto para o isolado T24, que alcançou seu pico em sete dias de incubação (Figura 6).

Na presença de PEG, os isolados também apresentaram solubilização de fósforo a partir da fonte de fosfato de cálcio, embora em menor grau comparado ao meio padrão. Os isolados DF1, DF3 e GT31, dos gêneros *Penicillium* sp, *Chaetomium* sp e a espécie *Trichoderma reesei*, respectivamente, destacaram-se nesse ensaio com valores de 517,6 µg P/mL, 337,9 µg P/mL e 237,4 µg P/mL, respectivamente (Figura 6). Para o isolado DF1, que apresentou a maior solubilização comparado aos demais, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos na ausência e na presença de PEG.

Na segunda fonte de fosfato (fosfato de ferro), os isolados DF2 e DF1 foram os que apresentaram a maior solubilização de fósforo, com valores de 680,5 µg P/mL e 642,2 µg P/mL, respectivamente (Figura 6). O pico de produção foi alcançado após cinco dias de incubação para DF2 e sete dias para DF1.

Na presença de PEG, os isolados DF2 e DF1 continuaram a se destacar em solubilização de fosfato de ferro, enquanto o isolado T24 também demonstrou essa capacidade, apresentando valores de 471,1 µg P/mL para DF2, 343,4 µg P/mL para DF1 e 360,6 µg P/mL para T24 (Figura 6), sendo que os dois últimos não exibiram diferença estatística significativa. Além disso, DF2, que teve o maior destaque na solubilização, não mostrou diferença estatística entre as condições com e sem PEG, nos tempos de cinco e sete dias de incubação.

Na última fonte de fosfato (fosfato de alumínio), os isolados DF1, DF5 (*Penicillium* sp.) e T24 apresentaram os maiores níveis de solubilização em comparação aos demais isolados, com valores de 694,6 µg P/mL, 584,3 µg P/mL e 447,5 µg P/mL, respectivamente (Figura 6). Os resultados mostraram picos de produção após cinco dias de incubação. Na presença de PEG, esses mesmos isolados continuaram a se destacar, com valores de 380,0 µg P/mL, 325,0 µg P/mL e 329,2 µg P/mL para DF1, DF5 e T24, respectivamente (Figura 6). Comparando os valores de DF1 na ausência e presença de PEG, observou-se uma diferença estatística, com maior solubilização em meio sem PEG.

As amostras mantiveram pH ácido durante a solubilização de fósforo (na faixa entre pH 2 e pH4), indicando a produção de ácidos orgânicos que tornam o fosfato mais disponível (dados não apresentados). Esses ácidos promovem o crescimento fúngico e aumentam a biodisponibilidade de fósforo, com correlação entre a redução do pH e o aumento da solubilização (Bononi et al., 2020). A avaliação da solubilização de fosfatos de ferro e alumínio por isolados fúngicos é fundamental, dado que solos agrícolas brasileiros possuem alta concentração desses metais. Em solos ácidos, predominam fosfatos de alumínio e ferro, que limitam a disponibilidade de fósforo devido à sua forte adsorção, enquanto fosfatos de cálcio predominam em solos alcalinos (Jónatan et al., 2024). O pH do solo é um fator determinante para a mobilidade do fósforo (Rawat et al., 2020).

Estudos, como o de Galeano et al. (2023), demonstraram a capacidade de fungos tolerantes à seca em solubilizar fósforo. A cepa 34-P (*Penicillium chrysogenum*) destacou-se ao alcançar $92,54 \pm 8,41$ µg P/mL sob estresse salino, enquanto o controle apresentou $68,72 \pm 4,47$ µg P/mL após 15 dias de incubação. De forma semelhante, a cepa DF1 (*Penicillium* sp) também mostrou alta eficiência em solubilizar fósforo em condições de estresse.

O estudo de Zhang et al. (2023) demonstrou que o isolado Sarita-12 (*Penicillium*) apresentou capacidade de solubilizar fosfato de ferro, semelhante ao comportamento do isolado DF1 neste estudo.

O estudo de Tandon et al. (2020) revelou que a cepa NBRI-PR5 de *Trichoderma koningiopsis* é tolerante à seca e solubiliza fósforo, alcançando $70,8 \pm 1,6 \mu\text{g P/mL}$. Esses resultados reforçam o papel dos fungos em promover o crescimento vegetal sob condições de estresse abiótico, facilitando a absorção de fósforo pelas plantas.

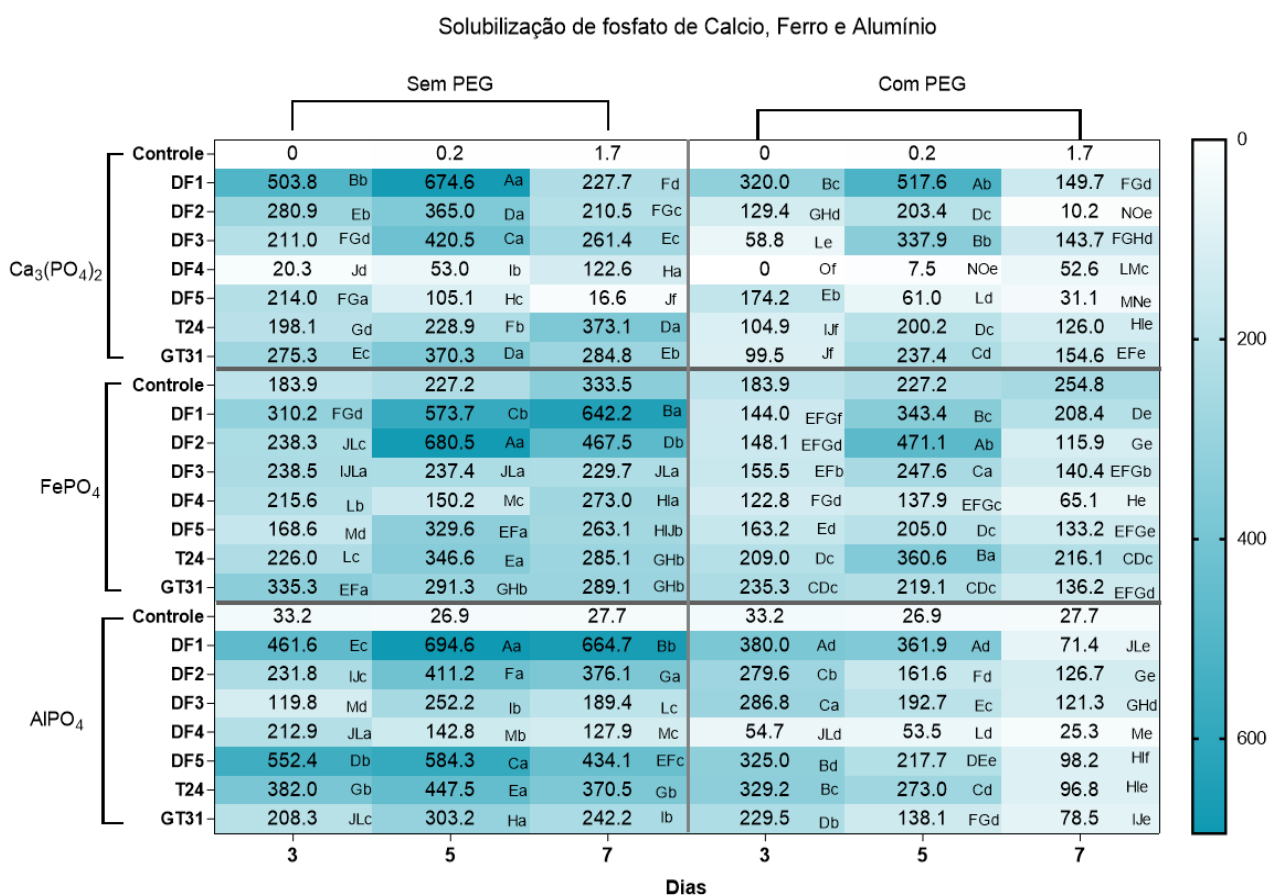


Figura 6: Heatmap: solubilização de fosfato de Cálcio, Ferro e Alumínio na ausência e presença de PEG 6000. *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2 e DF4), *Chaetomium* (DF3) e *Trichoderma harzianum* (T24) e *Trichoderma reesei* (GT31). As diferentes letras maiúsculas representam diferenças significativas em relação aos tempos e aos isolados (*, $p\text{-value} < 0,05$), conforme determinado pelo teste de Tukey. As diferentes letras minúsculas representam diferenças significativas em relação aos tratamentos (*, $p\text{-value} < 0,05$), conforme determinado pelo teste de Scott-Knott.

5.4 Ensaio enzimático de ACC deaminase em condições normais e déficit hídrico

A avaliação do ensaio enzimático de ACC deaminase (ACCD) revelou que todos os isolados analisados foram capazes de produzir a enzima. Destacando-se os isolados DF5 (*Penicillium* sp) *Trichoderma reesei* (GT31) e *Trichoderma harzianum* (T24) e com valores de $18,46 \pm 3,8$, $17,45 \pm 1,3$, $15,66 \pm 1,0 \mu\text{M}$ de α -cetobutirato $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente (Tabela 3). Com base nesses resultados, somados

à análise de ACC deaminase, os isolados DF4 e GT31 não avançaram para etapas posteriores. Dessa forma, os isolados DF1, DF2, DF3, DF5 e T24 foram selecionados para o ensaio de ACCD sob condições de estresse hídrico, simuladas com PEG 6000 (-0,1 MPa).

Nesta nova análise, alguns isolados, mesmo sob estresse, conseguiram aumentar sua atividade enzimática, destacando-se com maior atividade dentre eles o isolado T24, que apresentou um valor de atividade superior de $17,28 \pm 3,6 \mu\text{M}$ de α -cetobutirato $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. Os isolados DF2 (*Aspergillus* sp) e DF1 (*Penicillium* sp) tiveram valores de atividade aumentados em condições de estresse, de $10,91 \pm 3,4$ e $10,22 \pm 4,2 \mu\text{M}$ de α -cetobutirato $\text{h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína, respectivamente. (Tabela 3).

Tabela 3: Atividade ACC deaminase. *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2 e DF4) *Chaetomium* sp (DF3) e *Trichoderma harzianum* (T24) e *Trichoderma reesei* (GT31).

Isolados	Atividade ACCD ($\mu\text{M}/\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$) s/ PEG	Atividade ACCD ($\mu\text{M}/\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$) c/ PEG
DF1	$8,4 \pm 4,5^c$	$10,22 \pm 4,2^b$
DF2	$8,05 \pm 3,6^c$	$10,91 \pm 3,4^b$
DF3	$13,43 \pm 1,9^b$	$9,82 \pm 4,3^b$
DF4	$5,42 \pm 2,4^c$	_____
DF5	$18,46 \pm 3,8^a$	$8,31 \pm 1,5^b$
T24	$15,66 \pm 1,0^{ab}$	$17,28 \pm 3,6^a$
GT31	$17,45 \pm 1,3$ (GALEANO et al., 2025) **	_____

As letras representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$), conforme determinado pelo teste de Tukey. O resultado de GT31 representado por asterisco segue segundo (GALEANO, et al, 2025).

Fungos tolerantes ao estresse hídrico que produzem ACC deaminase (ACCD) desempenham um papel crucial para as plantas ao regularem a produção do fitohormônio etileno, responsável pela senescência, a qual ocorre precocemente em situações de estresse (Wang et al., 2022). Esses fungos convertem o precursor do etileno (ACC) em amônia e α -cetobutirato, reduzindo os efeitos negativos do estresse.

Estudos com o gênero *Trichoderma* corroboram essa função, como o trabalho de Wang et al. (2022), que relatou uma atividade enzimática de 4557,92 nM α -KB $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ no isolado *T. asperellum*. De forma semelhante, Rehman et al. (2022) reportaram uma atividade de ACCD de 342 nmol de α -cetobutirato $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ na cepa TP de *T. gamsii*. Esses estudos destacam o potencial do gênero *Trichoderma* na produção de ACCD, resultado que também foi observado no presente estudo, no qual o isolado T24 apresentou a maior produção.

5.5 Produção de ácido indol-3-acético (AIA) em condições normais e déficit hídrico

A produção desse fitormônio se encontra por duas vias: a independente de triptofano e a dependente desse aminoácido. Para os fungos é encontrado na literatura geralmente a produção pela via dependente de triptofano (KESWANI et al. 2020).

A maior produção de AIA foi observada para o DF2 (*Aspergillus* sp) após três dias de crescimento na ausência de PEG ($53,99 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$), como demonstrado na Tabela 4. Na presença de PEG a maior produção foi observada para o isolado T24 (*Trichoderma harzianum*) ($51,01 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$) após sete dias de crescimento. Foi possível observar que DF1 (*Penicillium* sp) manteve a produção de AIA constante e aumentada em meio estressado com PEG nos três dias de análise, isso mostra a estabilidade de produção pelo fungo (Tabela 4).

A produção de fitohormônios é de grande importância, pois está diretamente relacionada ao crescimento vegetal como o desenvolvimento das raízes facilitando a absorção de nutrientes por exemplo (SODHI et al., 2023). Fungos produzem AIA e toleram estresses abióticos podem auxiliar as plantas a enfrentar a senescência precoce combinando a produção de AIA fúngica com o AIA vegetal, evitando que níveis do fitohormônio diminua gerando assim um aumento da produção de etileno, fitohormônio no qual é gerado a partir do ACC (OROZCO-MOSQUEDA et al., 2020).

No estudo desenvolvido por Galeano e colaboradores (2023), foi observado *Penicillium chrysogenum* (34-P) produziu $26,88 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$ de AIA em 24 horas de incubação em condições de estresse salino. Outro estudo, com *Aspergillus welwitschiae*, observou-se um aumento na produção de AIA em condições de estresse a metal ($54,83 \mu\text{g/mL}$) em comparação com condições normais ($15,56 \mu\text{g/mL}$)

(HUSNA, et al,2022). Dessa forma, podemos observar a importância desses microrganismos no auxílio a plantas submetidas a diferentes tipos de estresses abióticos.

Tabela 4: Produção de ácido indol-3-acético (AIA) na presença e na ausência de PEG 6000 durante 3, 5 e 7 dias de incubação. *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2) *Chaetomium* sp (DF3) e *Trichoderma harzianum* (T24).

	3 dias		5 dias		7 dias	
	$\mu\text{g/mL}$	com PEG $\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	com PEG $\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	com PEG $\mu\text{g/mL}$
DF1	$22,11 \pm 0,6^c$	$31,50 \pm 0,1^c$	$19,17 \pm 0,8^c$	$20,78 \pm 0,2^c$	$21,89 \pm 0,9^c$	$33,34 \pm 0,2^b$
DF2	$53,99 \pm 0,6^a$	$34,42 \pm 0,8^b$	$29,12 \pm 0,6^b$	$27,71 \pm 0,9^b$	$48,25 \pm 0,6^a$	$23,58 \pm 0,8^c$
DF3	$4,75 \pm 0,3^e$	$7,37 \pm 0,7^d$	$4,90 \pm 0,9^e$	$5,73 \pm 0,2^d$	$14,03 \pm 0,5^d$	$15,75 \pm 0,1^d$
DF5	$5,95 \pm 0,5^d$	$6,54 \pm 0,8^e$	$7,87 \pm 0,5^d$	$3,06 \pm 0,2^e$	$5,97 \pm 0,8^e$	$2,42 \pm 0,2^e$
T24	$28,39 \pm 0,9^b$	$39,98 \pm 0,3^a$	$29,46 \pm 0,3^a$	$30,37 \pm 0,9^a$	$33,54 \pm 0,5^b$	$51,01 \pm 0,7^a$

As letras representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$), conforme determinado pelo teste de Tukey.

5.6 Produção de Sideróforos em condições normais e déficit hídrico

Foi observado conforme apresentado na Figura 9 que os isolados, na presença e ausência de PEG (-0,1Mpa), conseguiram produzir sideróforos. O isolado DF1 (*Penicillium* sp) apresentou maior produção de sideróforos em meio normal e com PEG (0,1Mpa), com valores entre $97,2 \pm 0,1 \%$ e $95,4 \pm 0,2 \%$, respectivamente (Figura 8). A menor produção foi observada para o isolado T24 (*Trichoderma* sp), com valores de $74,8 \pm 0,9 \%$ em meio normal e $69,1 \pm 1,5 \%$ em meio com presença de PEG (0,1Mpa) como mostra no gráfico (Figura 7).

Os microrganismos produzem sideróforos principalmente em condições de limitação de ferro, pois esses compostos facilitam a captura e o transporte do elemento para as plantas, tornando-se essenciais em ambientes onde a disponibilidade de ferro é reduzida (Chowdappa et al., 2020; Sodhi et al., 2023). Apesar disso, a cepa DF1 (*Penicillium* sp.) apresentou elevada produção de sideróforos, possivelmente devido ao fato de ter sido isolada de um ambiente rico em sedimentos ferruginosos, o que pode ter conferido uma alta afinidade pelo ferro (Fe) e uma resposta aprimorada para

a produção de sideróforos mesmo em condições de limitação desse elemento. Estudos indicam que o gênero *Penicillium* possui potencial de produção de sideróforos em condições de estresse salino, como observado por Da Silva et al. (2024) e Galeano et al. (2023).

Embora o fungo T24 (*Trichoderma harzianum*) tenha apresentado a menor produção de sideróforos neste estudo, a relevância do gênero *Trichoderma* é amplamente reconhecida devido à sua capacidade de tolerar estresses abióticos e produzir sideróforos em níveis comparáveis aos relatados aqui. Estudos evidenciam essa capacidade, como o de Zhao et al. (2020), no qual *T. asperellum* Q1 produziu entre 62,04% e 55,22% de sideróforos após três e cinco dias de incubação, respectivamente. De forma semelhante, Khoshmanzar et al. (2020) observaram que *T. longibrachiatum* KH e *T. longibrachiatum* MA produziram sideróforos com valores variando entre 73,63% e 34,36%. Esses dados reforçam a importância de *Trichoderma* como uma alternativa promissora em condições adversas, incluindo T24 analisada neste estudo.

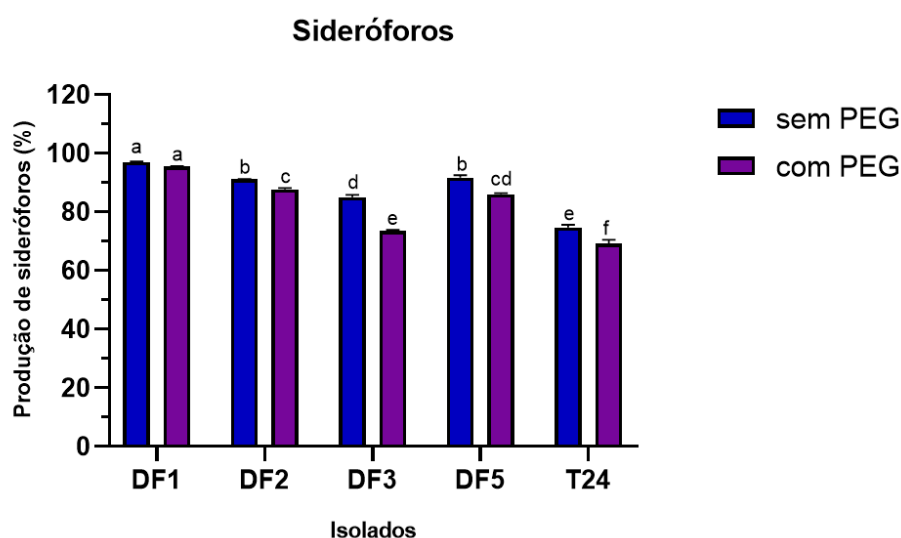


Figura 7: Produção de sideróforos na presença e ausência de PEG 6000. *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2) *Chaetomium* sp (DF3) e *Trichoderma harzianum* (T24). As diferentes letras representam diferenças significativas (*, p-value < 0,05), conforme determinado pelo teste de Tukey.

5.7 Ensaios enzimáticos (amilase, xilanase, proteases, β -glucosidase, fosfatase)

Os ensaios enzimáticos para amilase mostraram uma produção enzimática superior para o isolado DF2 (*Aspergillus* sp), com $1,49 \pm 0,2$ U/mL em sete dias de incubação em meio sem PEG (Figura 8). Por outro lado, o isolado DF5 (*Penicillium* sp) destacou-se na produção de amilase em meio contendo PEG, atingindo $1,68 \pm 0,1$ U/mL (Figura 8 A e B) após cinco dias de incubação. As amilases degradam amido através da hidrólise de ligações glicosídicas e, sob déficit hídrico, essas enzimas podem fornecer glicose que auxiliam no fortalecimento da planta (Byregowda et al., 2022). Outro aspecto a ser considerado sobre a produção dessa enzima é o local de isolamento dos fungos. Fungos isolados de flores tendem a sintetizar mais amilase do que aqueles isolados a partir de raízes (de Oliveira Amaral et al., 2022). Neste estudo, os isolados foram obtidos de raízes, o que resultou em uma produção enzimática consistente na ausência e na presença de déficit hídrico.

A produção de xilanase foi observada em todos os isolados (Figura 8). O isolado DF2 apresentou um pico de atividade de $3,43 \pm 0,4$ U/mL no meio sem PEG após três dias de incubação. Em meio contendo PEG, o isolado DF5 apresentou uma produção maior de xilanase, atingindo $4,60 \pm 0,3$ U/mL após cinco dias de incubação (Figura 8 C e D). As xilanases desempenham um papel crucial na degradação de resíduos agrícolas e matéria orgânica, sem causar danos ao meio ambiente (Bhadra et al., 2022). As xilanases atuam na degradação da xilana, um componente da parede celular das plantas, contribuindo para a ativação da sinalização de defesa vegetal e fortalecendo a resposta das plantas a condições de estresse (Guo et al., 2021). Assim, o aumento na produção de xilanase em meios contendo PEG pode desempenhar um papel relevante na resposta das plantas ao déficit hídrico.

A produção de β -glucosidase foi observada em todos os isolados (Figura 8). O isolado DF5 apresentando uma maior produção em comparação com os demais. Em meio normal, o isolado DF5 alcançou um pico de produção de $0,62 \pm 0,1$ U/mL após sete dias de incubação (Figura 8 E), enquanto em meio com PEG a produção foi de $0,43 \pm 0,1$ U/mL após cinco dias de incubação (Figura 8 F). Há poucos registros de produção de β -glucosidase sob condições de estresse hídrico ou outros tipos de estresse abiótico. No entanto, estudos com fungos do gênero *Penicillium* demonstraram produção de β -glucosidase com valores de $4,35 \pm 0,38$ U/mL (He et al., 2024) e $4,55 \pm 0,97$ U/mL (Fu et al., 2024). Como mencionado anteriormente, as

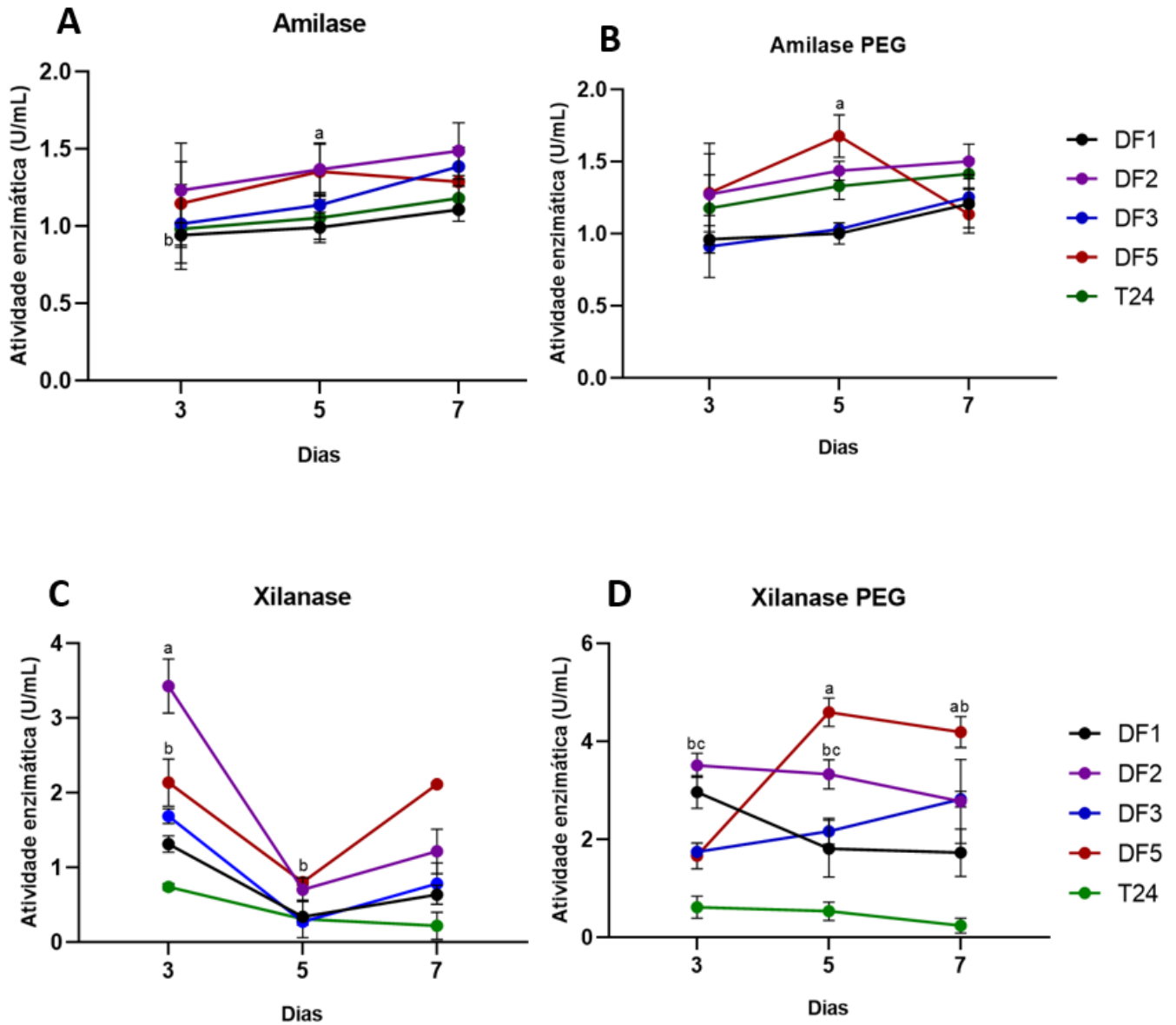
β -glucosidases são importantes devido à sua capacidade de degradar oligossacarídeos e/ou celobiose, indicando, assim, uma saúde adequada do solo (Da Silva et al., 2021; Dhevagi et al., 2021).

A produção de fosfatase foi verificada em todos os isolados analisados (Figura 10). Em condições normais, o isolado DF3 (*Chaetomium* sp.) apresentou a maior produção após sete dias de incubação, com um valor de $0,71 \pm 0,1$ U/mL. Sob condições de déficit hídrico, o isolado DF5 alcançou o desempenho maior, produzindo $0,71 \pm 0,1$ U/mL em apenas três dias de incubação. A produção de fosfatases é fundamental pois elas desempenham um papel essencial no crescimento vegetal, promovendo a mineralização dos nutrientes presentes no solo (Adedayo & Babalola, 2023). Estudos envolvendo gêneros similares, como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*, também demonstraram atividade significativa na produção dessa enzima (Brazhnikova et al., 2022).

Por fim foi avaliado a produção de protease na presença e ausência de PEG. O isolado DF3 apresentou produção superior em comparação aos demais, atingindo um pico de $0,25 \pm 0,5$ U/mL após três dias de incubação em condições normais (Figura 8 I). Em meio contendo PEG, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os isolados DF2 e DF3, ambos com valores de $0,22 \pm 0,0$ U/mL. Estudos comparativos indicaram que, de maneira geral, os isolados são capazes de produzir essas enzimas para hidrolisar ligações peptídicas quando necessário, o que é crucial para a transformação de proteínas em aminoácidos livres (Sharma et al., 2023). Observou-se que são escassos os estudos sobre a quantificação dessas enzimas sob a influência de estresses abióticos. No entanto, trabalhos como o de Galeano (2023) com *Penicillium chrysogenum* (34-P) permitiram comparar a influência do estresse na produção de enzimas como amilase, xilanase e protease.

A amilase apresentou maior produção em meio não estressante ($14,13 \pm 1,13$ U/mL em 96 horas), enquanto a protease foi mais abundante em meio estressante ($10,02 \pm 0,74$ U/mL em 120 horas). A produção de xilanase manteve-se constante em

ambos os meios, com valores próximos a $7,13 \pm 0,87$ U/mL em condições normais e $5,83 \pm 0,32$ U/mL sob estresse abiótico.



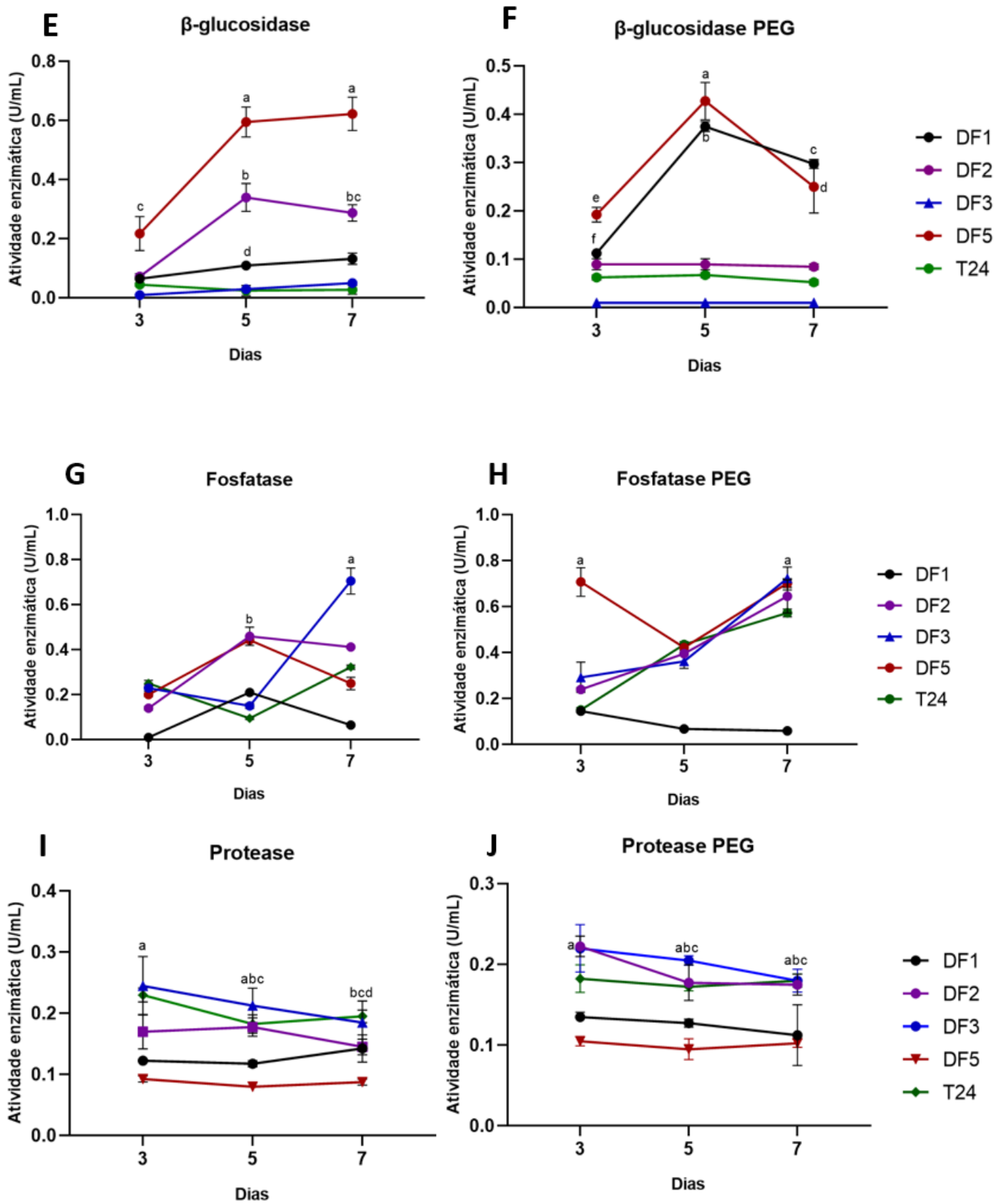


Figura 8: Ensaios enzimáticos (A e B) amilase, (C e D) xilanase, (E e F) β -glucosidase, e (G e H) fosfatase e (I e J) protease, após 3, 5, e 7 dias de crescimento em meio TLE com e sem PEG 6000 (-0,1MPa). *Penicillium* sp (DF1 e DF5), *Aspergillus* sp (DF2), *Chaetomium* sp (DF3) e *Trichoderma harzianum* (T24). As diferentes letras representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$).

5.8 Análise do isolado *in planta*

O isolado DF1 (*Penicillium* sp) foi selecionado para realizar testes em plantas na casa de vegetação, com indução ao estresse hídrico, por reunir a maioria das características relevantes de promoção de crescimento vegetal, como produção de AIA, sideróforos, solubilização de fosfato, AAC deaminase e enzimas e ciclagem de nutrientes.

Foram utilizadas sementes de milho ADV9339 inoculadas com DF1 e submetidas a duas condições de déficit hídrico: condição de irrigação moderada e ausência de irrigação. De acordo com resultados obtidos apresentados na Figura 11 A e B, observou-se que a inoculação do isolado DF1 proporcionou maior comprimento de parte aérea (25,1%) e raiz (11,9%) no tratamento controle (T1), como também um aumento na massa fresca da raiz (39,4%) e parte aérea (51,7 %), quando comparado com plantas sem a inoculação do isolado (Figura 9 C e D), mostrando diferença significativa em relação aos tratamentos.

O desenvolvimento significativo das plantas inoculadas com DF1 evidencia o potencial dos fungos na promoção do crescimento vegetal, mediado por mecanismos diretos e indiretos (Adeleke et al., 2022). Quanto aos tratamentos com déficit hídrico, as plantas inoculadas com DF1 demonstraram maior desenvolvimento radicular em irrigação moderada (5,1%) e ausência de irrigação (6,1%) (Figura 9 B) comparadas ao controle. Isso pode ser atribuído à interação do fungo na estimulação do desenvolvimento radicular através da produção de AIA, já que fungos são capazes de produzir este fitohormônio em condições de estresse hídrico, promovendo o crescimento vegetal (Saleem et al., 2020). Além disso, a produção de longas hifas permite a extração de água de regiões mais distantes do solo (Hanaka et al., 2021).

Foi observado que plantas inoculadas com o fungo do gênero *Penicillium* sp, mostraram maior massa e maiores comprimentos de caules em relação ao controle. Em trabalho realizado por OU et al (2023) também foi observado que a inoculação com *Penicillium* sp, demonstrou incremento na massa e comprimentos do caule em plantas submetidas ao stress hídrico (Kaur; Saxena, 2023)

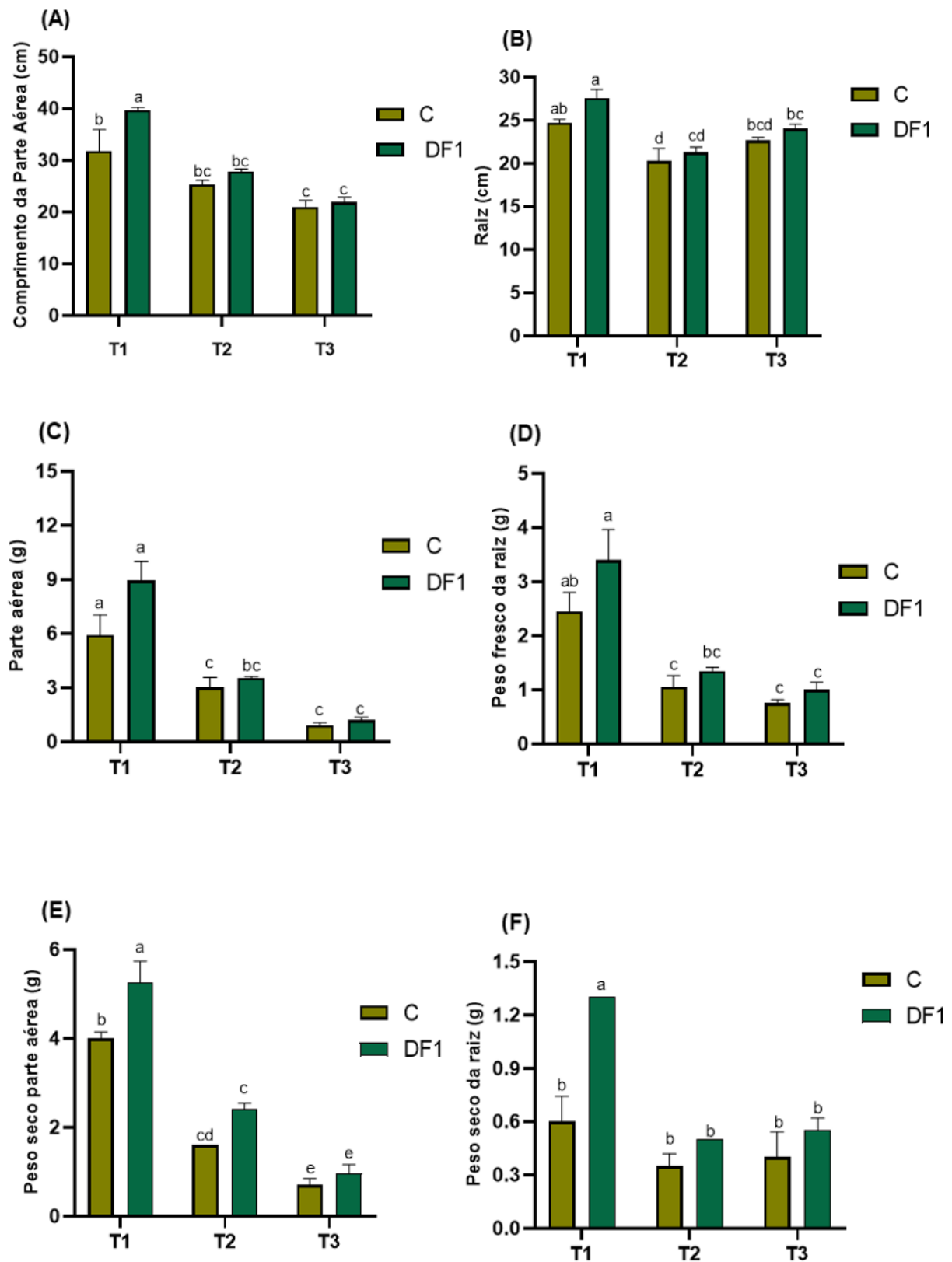


Figura 9: Efeito de *Penicillium* sp (DF1) no crescimento de milho (ADV9339) em condições normais e déficit hídrico. C: controle DF1: *Penicillium* sp. Tratamento controle (T1), tratamento com irrigação moderada (T2), tratamento na ausência de irrigação (T3). Letras diferentes representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$).

5.9 Análises bioquímicas

5.9.1 Quantificação de clorofila e carotenóides

A inoculação com DF1 aumentou significativamente os conteúdos de clorofila e carotenóides em todos os tratamentos avaliados, conforme ilustrado nas Figuras 10A e 10B. Nas condições de irrigação moderada (T2) e ausência de irrigação (T3), as plantas inoculadas com DF1 apresentaram um aumento significativo de 41,7% e 67,4%, respectivamente, no conteúdo de clorofila em comparação com o controle (Figura 10A). Quanto aos carotenóides totais, os maiores aumentos foram observados nas plantas inoculadas com irrigação normal (T1), que apresentaram aumento de 369,3% em relação ao controle (Figura 10B).

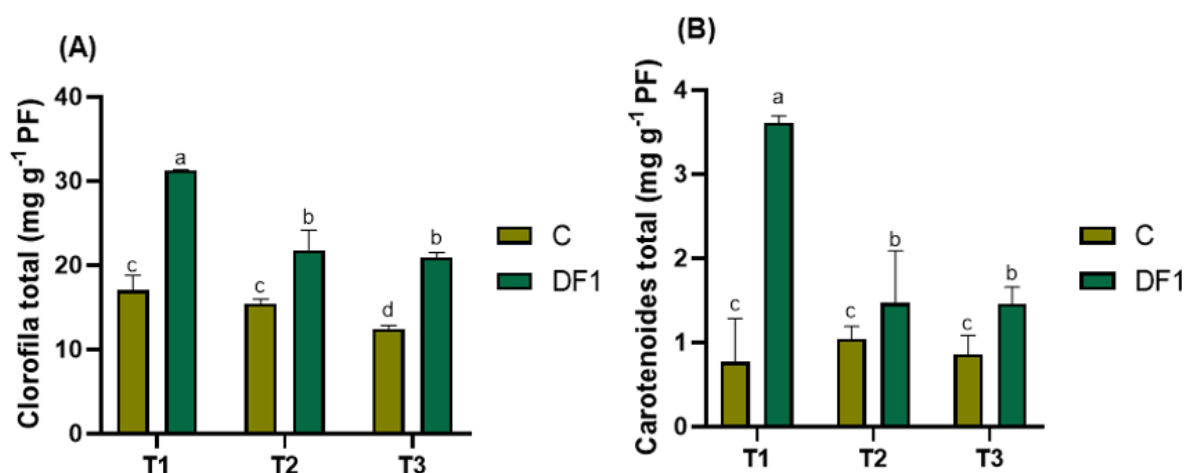


Figura 10: Análise bioquímica teor de clorofila e carotenóides na presença e ausência do fungo *Penicillium* sp (DF1). C: controle DF1: *Penicillium* sp. Tratamento controle (T1), tratamento com irrigação moderada (T2), tratamento na ausência de irrigação (T3). Clorofila (A), carotenóides (B). Diferentes letras representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$).

Esses resultados demonstraram que a inoculação com DF1 teve um efeito positivo na produção de clorofila e carotenóides, constituindo uma estratégia importante para mitigar os impactos da restrição hídrica. As plantas inoculadas com DF1 apresentaram taxas mais altas de clorofila e carotenóides, sugerindo que o fungo contribuiu para a maior eficiência do fotossistema, mesmo sob condições de déficit hídrico (Begum et al., 2021). A clorofila e os carotenóides são pigmentos essenciais para a fotossíntese e a produção de energia. Além disso, o aumento na concentração de clorofila e carotenóides pode estar relacionado ao crescimento mais robusto das raízes e da parte aérea das plantas, uma vez que o desenvolvimento dessas estruturas favorece a absorção de água e nutrientes (Zhang et al., 2020).

Kaur et al. (2023) demonstraram que a inoculação com o fungo *Penicillium citrinum* resultou em aumentos nos níveis de clorofila e carotenóides. Um estudo com o gênero *Aspergillus* igualmente evidenciou a eficácia do fungo na promoção do crescimento, contribuindo para maiores taxas de clorofila e carotenóides, especialmente em plantas submetidas a estresse hídrico (Niaz et al., 2024).

5.9.2 Dosagem de açúcares totais e redutores

As plantas inoculadas com o DF1 mostraram aumento em relação ao conteúdo de açúcares totais em condições normais (44,9%) e condições de ausência de irrigação (30,2%), quando comparado com as plantas sem a inoculação do fungo (Figura 11 A). O mesmo acontece com açúcares redutores em que a planta em condições normais apresentou diferença significativa produzindo mais açúcares redutores quando inoculada com DF1 (41,5%), e quando submetido a ausência de irrigação, manteve produção maior quando comparada a planta sem o fungo (84,8%) (Figura 11 B).

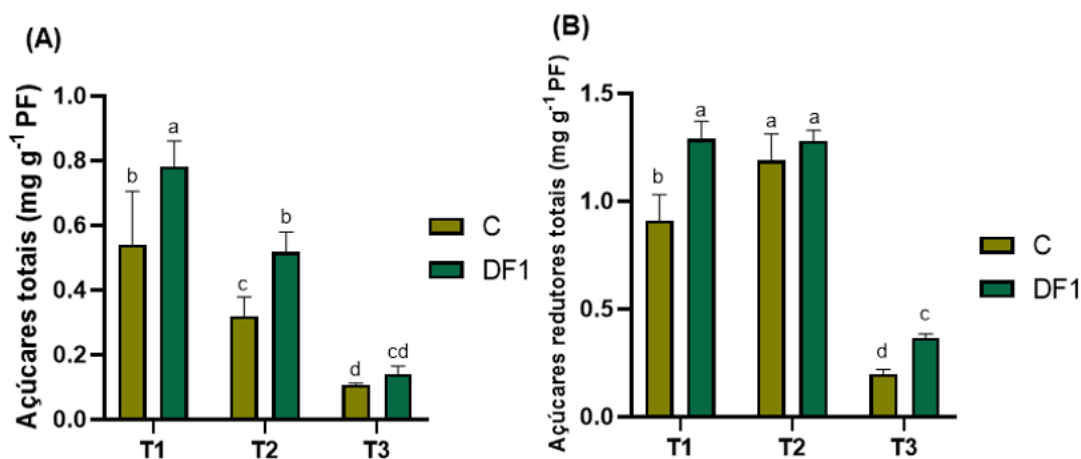


Figura 11: Efeito da inoculação de *Penicillium* sp (DF1) no crescimento do milho em condições normais e estresse hídrico. (A) Açúcares totais (B) Açúcares Redutores. C: controle DF1: *Penicillium* sp. Tratamento controle (T1), tratamento com irrigação moderada (T2), tratamento na ausência de irrigação (T3). Diferentes letras representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor p < 0,05).

O acúmulo de açúcares nos tecidos vegetais são uma forma de defesa contra possíveis estresses, afim de manter o potencial hídrico e o turgor celular (Liu, et al, 2021). Sendo assim, a planta inoculada com o fungo mostrou eficiência na produção de açúcares totais e redutores, afim de conferir proteção contra estresses. Resultados

semelhantes foram encontrados por Kaur (2023) e Bakhshi (2023), nos quais plantas sob condições de estresse hídrico, inoculadas com os fungos *Penicillium citrinum* e *Trichoderma harzianum*, apresentaram aumento nos níveis de açúcares, tanto em condições normais e estresse.

5.9.3 Quantificação de Prolina e dosagem de aminoácidos livres totais

Assim como os açúcares, o aminoácido prolina é importante para proteção da planta em condições de estresse, afim de reduzir perda de água e manter a turgência da planta (Ilyas et al., 2021; Bistgani et al., 2024). Nesta análise, as plantas não inoculadas produziram mais prolina (73,6%), em relação as plantas inoculadas com DF1 (Figura 12A). As plantas em tratamento com condições normais e de irrigação moderada não apresentam valores significativos de produção de prolina, o que sugere que a planta não esteve sob efeito suficiente de estresse para realizar tal produção.

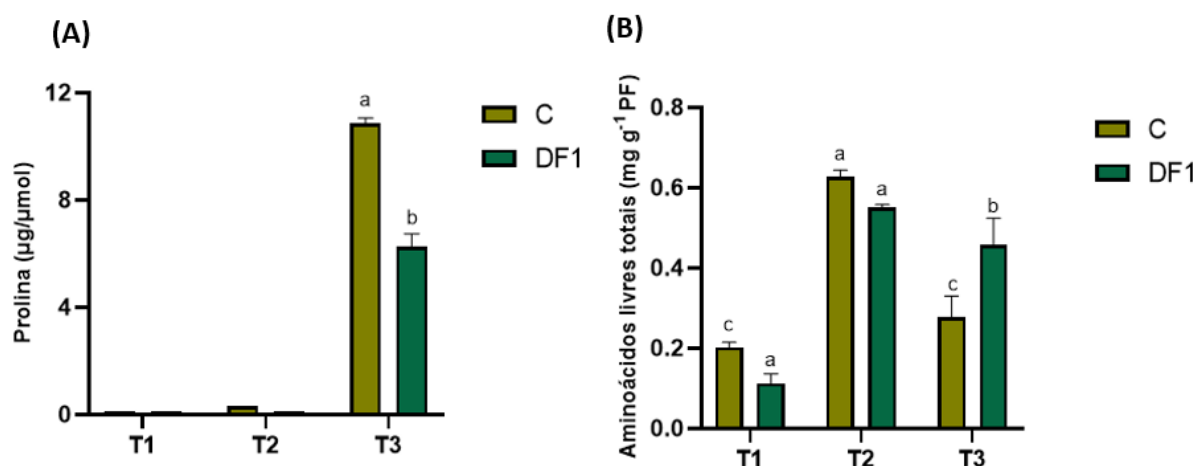


Figura 12: Quantificação de prolina (A) e dosagem de aminoácidos livres totais (B), na presença e ausência do fungo *Penicillium* sp (DF1). C: controle DF1: *Penicillium* sp. Tratamento controle (T1), tratamento com irrigação moderada (T2), tratamento na ausência de irrigação (T3). Diferentes letras representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$).

Estudo realizado com os fungos *T. harzianum* e *F. solani* (Bakhshi; Saeid Eshghi; Zia Banihashemi, 2023), mostraram parâmetros diferentes deste estudo, onde, as plantas inoculadas com fungos elevaram a produção de prolina. As plantas possuem diversas estratégias para defesa de estresses, produção de prolinas é uma dessas, pois acúmulo de prolina protege as células vegetais mantendo a homeostase a célula turgida para o desenvolvimento e crescimento da planta (Ghosh et al., 2021).

O aminoácido prolina é um dos principais osmólitos nas plantas, sendo capaz de se acumular nos tecidos vegetais em condições de estresse. No entanto, as plantas também podem aumentar os níveis de outros aminoácidos, a fim de tolerá-lo (Guo et al., 2020). Assim, ao comparar os resultados de prolina com os de aminoácidos livres neste estudo, observou-se que a planta inoculada com DF1 priorizou a produção de outros aminoácidos como mecanismo de defesa, visando à proteção contra o déficit hídrico.

Diferente da prolina, plantas inoculadas com DF1 resultaram em um aumento significativo ($p \leq 0,05$) no conteúdo de aminoácidos livres totais na condição de ausência de irrigação com um aumento de 64,9% (Figura 12B).

Em outros estudos, observou-se que plantas inoculadas com os fungos *Glomus versiforme* (Begum et al., 2021) e *Trichoderma harzianum* (Bakhshi, Saeid Eshghi, Zia Banihashemi, 2023) apresentaram uma estratégia de aumento tanto nos níveis de outros aminoácidos quanto de prolina. No entanto, como demonstrado neste estudo, a estratégia adotada pela planta não afetou seu desenvolvimento, conforme mostrado na Figura 12 A e B.

5.9.4 Dosagem de compostos fenólicos e flavonóides totais

As plantas não inoculadas apresentaram conteúdo maior de compostos fenólicos (9,4%) na ausência de irrigação (T3), em comparação a planta inoculadas com DF1 (Figura 13A).

A produção de compostos fenólicos é uma estratégia utilizada pela planta para evitar danos oxidativos causados pelo estresse (Guo et al., 2020). Dessa forma, é sugerido que a planta inoculada com DF1 obteve menor produção do composto, pois não utilizou essa estratégia como defesa ao estresse, ou também não investiu nessa produção pois com a presença do fungo, conseguiu tolerar mais o estresse. Em outros casos, plantas inoculadas com fungos podem sim auxiliar na elevação dos níveis de

produção de compostos fenólicos, contribuindo melhor na defesa da planta submetida a estresse hídrico (Bakhshi; Saeid Eshghi; Zia Banihashemi, 2023)

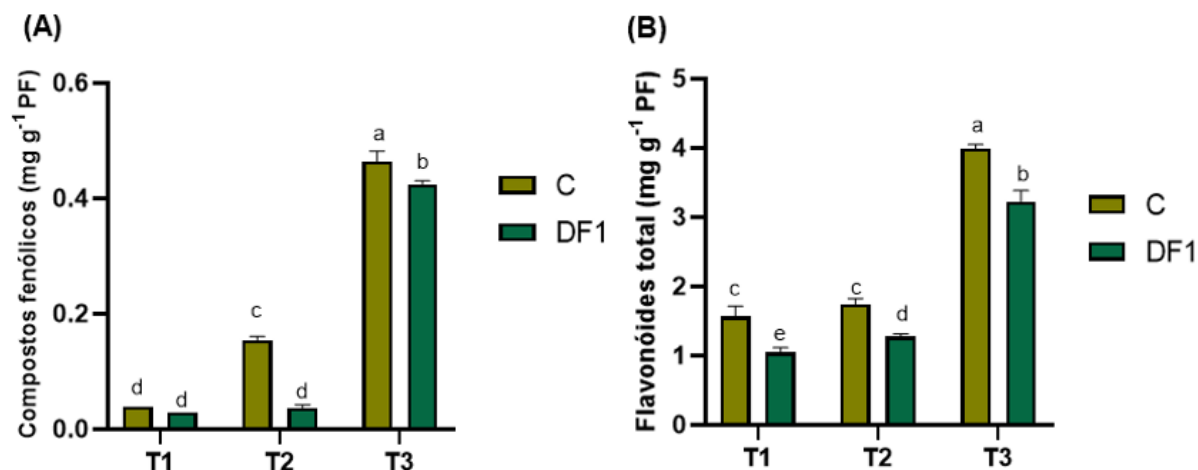


Figura 13: Compostos fenólicos (A) e Flavonóides totais (B), na presença e ausência do fungo *Penicillium* sp (DF1). C: controle DF1: *Penicillium* sp. Tratamento controle (T1), tratamento com irrigação moderada (T2), tratamento na ausência de irrigação (T3). Diferentes letras representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$).

Em relação a produção de flavonóides, as plantas inoculadas com DF1 seguiram o mesmo padrão das análises de prolina, quando comparada com as plantas não inoculadas, em que foi apresentada maior nível de flavonóides em todos os tratamentos, destacando o maior nível em tratamento na ausência de irrigação (23,9%), apresentando assim uma diferença estatística em relação a planta inoculada com fungo (figura 13 B).

Os flavonóides são metabólitos secundários secretados pelas plantas com função antioxidante, responsáveis por inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteger as células contra danos oxidativos (Liu et al., 2022). No presente estudo, foi observado que plantas não inoculadas com o fungo produziram maior quantidade de flavonóides em comparação às inoculadas, sugerindo que as plantas inoculadas com DF1 apresentaram maior tolerância ao estresse e, conseqüentemente, reduziram a necessidade de investir na produção desses compostos. De maneira semelhante, estudos com plantas inoculadas com *B. bassiana* não identificaram diferenças estatísticas significativas em relação às plantas sem o inóculo (Gana, Etsassala e Nchu, 2022), reforçando a hipótese de que as plantas recorreram a outras estratégias para mitigar o estresse, como observado neste trabalho.

5.10 Enzimas antioxidantes

As análises das enzimas antioxidantes revelaram que as plantas inoculadas com o isolado DF1 apresentaram aumento nos níveis dessas enzimas em todos os tratamentos, tanto em condições normais quanto sob déficit hídrico (Figura 14). Em relação à ascorbato peroxidase (Figura 14A), embora não tenha sido observada diferença estatística nos tratamentos T1 e T2, no tratamento T3 as plantas inoculadas produziram significativamente mais ascorbato ($28,15 \pm 2,1$ U/mg de proteína) em comparação às plantas não inoculadas.

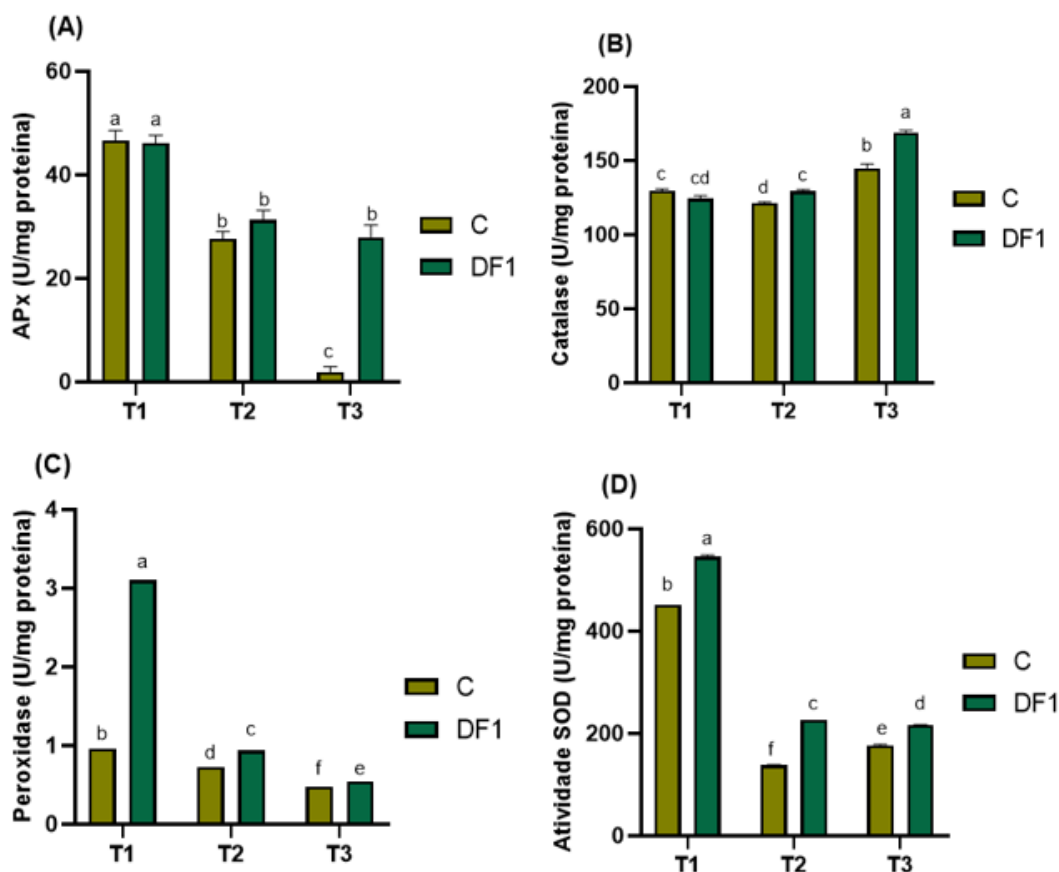


Figura 14: Efeito da inoculação de *Penicillium* sp (DF1) sobre o conteúdo de (A) APX – ascorbato peroxidase; (B) CAT – catalase (C) POD – peroxidase (D) SDO- superóxido dismutase e em folhas de milho colhidas em condições normais e estresse hídrico. C: controle DF1: *Penicillium* sp. Tratamento controle (T1), tratamento com irrigação moderada (T2), tratamento na ausência de irrigação (T3). Letras diferentes representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$) de acordo com o teste Tukey.

As plantas inoculadas com o isolado DF1 apresentaram níveis superiores de catalase em todos os tratamentos. Esse efeito foi especialmente evidente no

tratamento T3, no qual as plantas inoculadas mostraram um aumento significativo em comparação às plantas não inoculadas, com uma atividade de $168,76 \pm 1,9$ U/mg de proteína (Figura 14B).

Para peroxidase foi observado que os níveis foram elevados na planta inoculada com DF1 no tratamento T1, no valor de $3,1 \pm 0,1$ U/mg proteína (Figura 14 C), porém manteve-se uma diferença significativa de produção superior nos tratamentos T2 e T3 quando comparada com a planta sem o fungo. Por fim, a atividade da enzima superóxido dismutase foi aumentada em 20,7% nas plantas inoculadas com DF1. O maior destaque foi observado no tratamento T1, onde houve uma diferença significativa em relação às plantas não inoculadas. Diferenças significativas também foram registradas nos tratamentos T2 e T3, conforme mostrado na Figura 14C. As defesas contra espécies reativas de oxigênio estão diretamente relacionadas à produção de enzimas antioxidantes. Quando submetidas ao estresse, as plantas podem ativar a produção dessas enzimas como uma estratégia de defesa, reduzindo os danos provocados pelos compostos reativos (Sahu et al., 2022). Os resultados obtidos demonstram que as plantas inoculadas com o isolado DF1 apresentaram uma maior produção enzimática, destacando a importância da interação simbiótica entre fungo e planta na proteção contra condições de estresse. Esse efeito positivo também é evidenciado no desenvolvimento das plantas, conforme observado na Figura 14, onde as plantas inoculadas com DF1 apresentaram maior comprimento e meio peso fresco, tanto na parte aérea como raiz.

5.11 Dosagem da peroxidação lipídica

As análises da peroxidação lipídica mostraram que as plantas inoculadas com DF1 apresentaram menor peroxidação em todos os tratamentos (Figura 15). Em contraste, plantas não inoculadas no tratamento T3 exibiram maior peroxidação lipídica (208%), com uma diferença significativa em relação às plantas inoculadas com DF1 no mesmo tratamento.

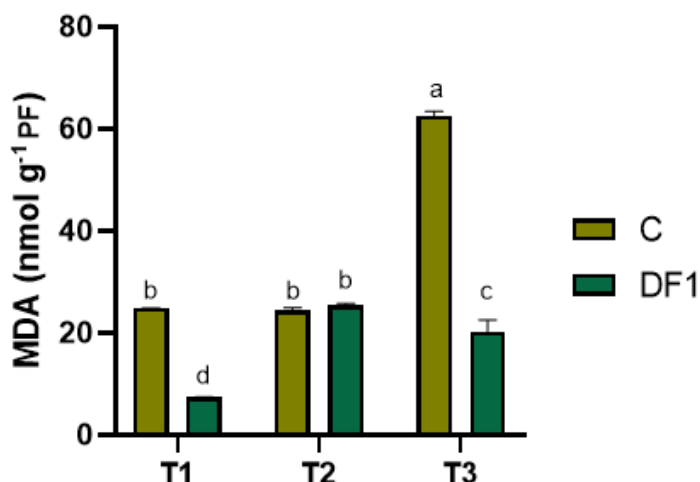


Figura 15: Dosagem da peroxidação lipídica na presença e ausência do fungo *Penicillium* sp (DF1). C: controle DF1: *Penicillium* sp. Tratamento controle (T1), tratamento com irrigação moderada (T2), tratamento na ausência de irrigação (T3). Diferentes letras representam diferenças estatísticas em relação aos tratamentos (valor $p < 0,05$).

Os resultados indicam que as plantas inoculadas com DF1 apresentaram menor peroxidação lipídica. Em altos níveis, as espécies reativas de oxigênio (ROS) causam a desnaturação de proteínas e a degradação das biomembranas, podendo levar à morte da planta (Javed et al., 2022). De forma semelhante, o estudo de Begum (2022) demonstrou que plantas inoculadas com fungos apresentaram uma menor taxa de peroxidação lipídica, reforçando a eficácia dessa associação para mitigar os danos oxidativos.

5.11 Avaliação da hidrólise do diacetato de fluoresceína

Por fim, a última análise realizada neste estudo avaliou a atividade microbiana geral do solo. Observou-se que os solos com plantas inoculadas com o fungo DF1 apresentaram maior atividade microbiana (Figura 16). Embora não tenham sido detectadas diferenças estatisticamente significativas nos tratamentos T1 e T2, em condições de déficit hídrico (T3) houve uma diferença significativa, com maior atividade microbiana nos solos com plantas inoculadas em comparação aos solos com plantas não inoculadas.

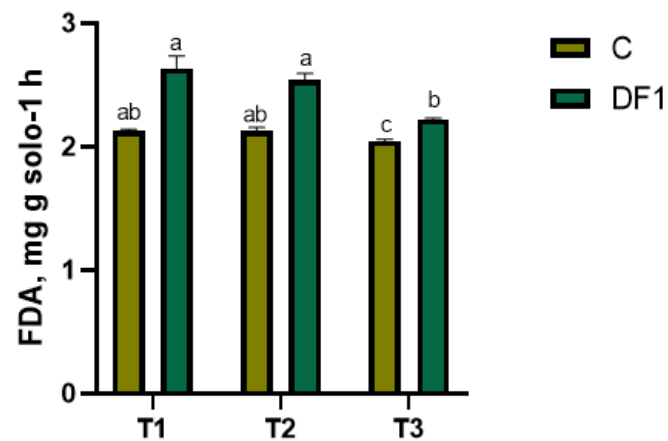


Figura 16: Atividade de hidrolise de diacetato de fluoresceína em amostras de solo rizosférico de milho inoculado com *Penicillium* sp (DF1 submetido a estresse hídrico. C: controle DF1: *Penicillium* sp. Tratamento controle (T1), tratamento com irrigação moderada (T2), tratamento na ausência de irrigação (T3). Letras Diferentes representam diferenças estatísticas entre aos tratamentos (valor $p < 0,05$).

O aumento da atividade microbiana nos solos das plantas inoculadas com DF1 indica que, além de favorecer o desenvolvimento das plantas por meio da promoção do crescimento e da defesa contra o estresse hídrico, esse fungo também pode contribuir para a saúde do solo. Estudos, como o de Galeano et al. (2025), demonstraram que fungos do gênero *Trichoderma* também desempenham um papel significativo no aumento da atividade microbiana do solo, promovendo a solubilização e a transferência de nutrientes essenciais.

6. Conclusão

O trabalho demonstrou o potencial de fungos adaptados a regiões com altas temperaturas e baixa disponibilidade hídrica, evidenciando sua capacidade de promover o crescimento vegetal tanto em condições normais quanto sob déficit hídrico. Todos os isolados apresentaram características de promoção vegetal, em condições de estresse hídrico. Contudo, dentre todos os isolados DF1 se destacou na solubilização de fosfato e na produção de sideróforos. Em casa de vegetação, o isolado DF1 promoveu um desenvolvimento das raízes e parte aérea de milho ADV9339, destacando a importância dessa interação simbiótica.

Além disso, o fungo DF1 desempenhou um papel crucial no fortalecimento dos mecanismos de defesa das plantas sob condições de estresse hídrico, promovendo o acúmulo de osmólitos, como açúcares totais, açúcares redutores e aminoácidos livres. Esses compostos contribuíram para a proteção dos tecidos vegetais ao estabilizar as estruturas celulares e manter o equilíbrio osmótico. Adicionalmente, o DF1 estimulou a produção de enzimas antioxidantes, essenciais para mitigar os danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS). Os solos associados a plantas inoculadas com DF1 apresentaram maior hidrólise do diacetato de fluoresceína, o que pode indicar o potencial desse isolado na promoção da saúde e fertilidade do solo.

Com base nesses resultados, o isolado DF1 mostrou-se eficiente como promotor de crescimento vegetal em condições de déficit hídrico e um promissor para uma agricultura mais sustentável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOBATTA, W. F. Drought adaptive mechanisms of plants – a review. **Advances in Agriculture and Environmental Science Open Access (AAEOA)**, v. 2, n. 1, p. 42–45, 2019.
- ADEDAYO, A. A.; BABALOLA, O. O. Fungi That Promote Plant Growth in the Rhizosphere Boost Crop Growth. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 239, 10 fev. 2023.
- ADELEKE, B. S. et al. Biocontrol mechanisms of endophytic fungi. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, 2022.
- AHMAD, M. A. et al. PEG 6000-stimulated drought stress improves the attributes of in vitro growth, steviol glycosides production, and antioxidant activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1552, 2020.
- ALEXANDER, D. B.; ZUBERER, D. A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and fertility of soils**, v. 12, n. 1, p. 39–45, 1991.
- Arnaldos, T. L., Munoz, R., Ferrer, M. A., Calderón, A. A. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria×ananassa*, cv. Chandler) callus culture. **Physiologia Plantarum**, 113, 315-322, 2001.
- Assis, R. M. A., Carneiro, J. J., Medeiros, A. P. R., Carvalho, A. A., Honorato, A. C., Carneiro, M. A. C., Bertolucci, S. K. V. B., Pinto, J. E. B. P. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic manure enhance growth and accumulation of citral, total phenols, and flavonoids in *Melissa officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, 158, 112981, 2020.
- ATTIA, M. S.; SALEM, M. S.; ABDELAZIZ, A. M. Endophytic fungi *Aspergillus* spp. reduce fusarial wilt disease severity, enhance growth, metabolism and stimulate the plant defense system in pepper plants. **Biomass conversion and biorefinery**, v. 14, n. 14, p. 16603–16613, 2024.
- AZEEM, M. et al. Drought Stress Amelioration in Maize (*Zea mays* L.) by Inoculation of *Bacillus* spp. Strains under Sterile Soil Conditions. **Agriculture**, v. 12, n. 1, p. 50, 1 jan. 2022.
- BADR, A. et al. Screening for drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) germplasm using germination and seedling traits under simulated drought conditions. **Plants**, v. 9, n. 5, p. 565, 2020.
- BAKHSHI, S.; ESHGHI, S.; BANIHASHEMI, Z. Application of candidate endophytic fungi isolated from extreme desert adapted trees to mitigate the adverse effects of drought stress on maize (*Zea mays* L.). **Plant physiology and biochemistry**, v. 202, n. 107961, p. 107961, 2023.
- BANDURSKA, H. Drought stress responses: Coping strategy and resistance. **Plants**, v. 11, n. 7, p. 922, 2022.
- BARON, N. C.; RIGOBELLO, E. C. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. **Mycology**, v. 13, n. 1, p. 39–55, 2022.
- BEGUM, N. et al. Co-inoculation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and the Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Improve Growth and Photosynthesis in Tobacco Under Drought

Stress by Up-Regulating Antioxidant and Mineral Nutrition Metabolism. **Microbial Ecology**, 26 jul. 2021.

BHADRA, F. et al. Endophytic fungi: a potential source of industrial enzyme producers. **3 biotech**, v. 12, n. 4, p. 86, 2022.

BHATT, B. M.; TRIVEDI, U. B.; PATEL, K. C. Extremophilic Amylases: Microbial Production and Applications. In: **Microorganisms for Sustainability**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 185–205.

BILAL, S. et al. Synergistic association of endophytic fungi enhances *Glycine max* L. resilience to combined abiotic stresses: Heavy metals, high temperature and drought stress. **Industrial crops and products**, v. 143, n. 111931, p. 111931, 2020.

Boletim de Impactos de Extremos de Origem Hidro-Geo-Climático em Atividades Estratégicas para o Brasil – 15/10/2024 ANO 07 No 71. Disponível em: <<https://www.gov.br/cemaden/pt-br/assuntos/monitoramento/boletim-de-impactos/boletim-de-impactos-de-extremos-de-origem-hidro-geo-climatico-em-atividades-estrategicas-para-o-brasil-2013-15-10-2024-ano-07-no-71>>. Acesso em: 14 fev. 2025.

Boletim de Impactos de Extremos de Origem Hidro-Geo-Climático em Atividades Estratégicas para o Brasil – 16/01/2025 ANO 07 Nº 74. Disponível em: <<https://www.gov.br/cemaden/pt-br/assuntos/monitoramento/boletim-de-impactos/boletim-de-impactos-de-extremos-de-origem-hidro-geo-climatico-em-atividades-estrategicas-para-o-brasil-2013-16-01-2025-ano-07-no-74>>. Acesso em: 14 fev. 2025.

BONONI, L. et al. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 2858, 2020.

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

Brazhnikova, Y.V., Shaposhnikov, A.I., Sazanova, A.L. et al. Phosphate Mobilization by Culturable Fungi and Their Capacity to Increase Soil P Availability and Promote Barley Growth. **Curr Microbiol** **79**, 240 (2022).

BYREGOWDA, R. et al. Is endophytic colonization of host plants a method of alleviating drought stress? Conceptualizing the hidden world of endophytes. **International journal of molecular sciences**, v. 23, n. 16, p. 9194, 2022.

Cakmak, I., Horst, N. J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 83, p. 463-468.

Campos, A. D., Silveira, E. M. L. Metodologia para Determinação de Peroxidase e Polifenoloxidase em Plantas. Pelotas: **Embrapa**, 3p, 2003.

Casida, L.E.; Klein, D.A ; Santoro, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, 98:371-376, 1964

CHITTA RANJAN DEB; MUM TATUNG. Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. **South African journal of botany**, v. 165, p. 153–162, 1 fev. 2024.

CHOWDAPPA, S. et al. Detection and characterization of antibacterial siderophores secreted by endophytic fungi from *Cymbidium aloifolium*. **Biomolecules**, v. 10, n. 10, p. 1412, 2020.

Conab - Monitoramento Agrícola. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/monitoramento-agricola>>. Acesso em: 13 sep. 2024.

CUI, H. et al. Trichoderma virens XZ11-1 producing siderophores inhibits the infection of Fusarium oxysporum and promotes plant growth in banana plants. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, 16 jan. 2025.

DA SILVA, G. J. et al. Microbial enzymes and soil health. In: **Plant Growth-Promoting Microbes for Sustainable Biotic and Abiotic Stress Management**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 133–155.

DASILA, K. et al. Endophytic fungi from Himalayan silver birch as potential source of plant growth enhancement and secondary metabolite production. **Brazilian journal of microbiology**, v. 55, n. 1, p. 557–570, 2024.

DATTA, Rahul et al. (Ed.). **Carbon and nitrogen cycling in soil**. Springer Nature, 2019.

DE OLIVEIRA AMARAL, A.; E FERREIRA, A. F. T. A. F.; DA SILVA BENTES, J. L. Fungal endophytic community associated with Hevea spp.: diversity, enzymatic activity, and biocontrol potential. **Brazilian journal of microbiology**, v. 53, n. 2, p. 857–872, 2022.

DEB, C. R.; TATUNG, M. Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. **Suid-Afrikaanse tydskrif vir plantkunde [South African journal of botany]**, v. 165, p. 153–162, 2024.

DEVI, R. et al. A systematic review on endophytic fungi and its role in the commercial applications. **Plants**, v. 257, n. 4, p. 70, 2023.

DHEVAGI, P. et al. Industrially Important Fungal Enzymes: Productions and Applications. In: **Fungal Biology**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 263–309.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28, 30, 350-356, 1956.

DUMANOVIĆ, J. et al. The significance of reactive oxygen species and antioxidant defense system in plants: A concise overview. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 552969, 2020.

DVOŘÁK, P. et al. Signaling toward reactive oxygen species-scavenging enzymes in plants. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 618835, 2020.

ECHEVERRIA, M. et al. Isolation and characterization of dematiaceous endophytic fungi isolated from barley (*Hordeum vulgare* L.) roots and their potential use as phosphate solubilizers. **The Microbe**, v. 3, n. 100058, p. 100058, 2024.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil biology & biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 601–606, 1988.

EL-SAWAH, A. et al. Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Soil Key Enzymes, Plant Growth, Seed Yield, and Qualitative Attributes of Guar. **Agriculture**, v. 11, n. 3, p. 194, 27 fev. 2021.

EMAMI BISTGANI, Z.; BARKER, A. V.; HASHEMI, M. Physiology of medicinal and aromatic plants under drought stress. **The crop journal**, 2024.

ESTÉVEZ-GEFFRIAUD, V. et al. Application of *Trichoderma asperellum* T34 on maize (*Zea mays*) seeds protects against drought stress. **Plants**, v. 252, n. 1, p. 8, 2020.

ETESAMI, H.; GLICK, B. R. Bacterial indole-3-acetic acid: A key regulator for plant growth, plant-microbe interactions, and agricultural adaptive resilience. **Microbiological research**, v. 281, n. 127602, p. 127602, 2024.

ETESAMI, H.; JEONG, B. R.; GLICK, B. R. Contribution of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Phosphate-Solubilizing Bacteria, and Silicon to P Uptake by Plant. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 1 jul. 2021.

GALEANO, R. et al. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* strains: mechanisms to promote soybean growth and support sustainable agroecosystems. **Plant and Soil**, 7 jan. 2025.

GALEANO, R. M. S. et al. *Penicillium chrysogenum* strain 34-P promotes plant growth and improves initial development of maize under saline conditions. **Rhizosphere**, v. 26, n. 100710, p. 100710, 2023.

GARCÍA-TEJERA, O. et al. The pitfalls of water potential for irrigation scheduling. **Agricultural water management**, v. 243, n. 106522, p. 106522, 2021.

GHABOOLI, M.; KABOOSI, E. Alleviation of the adverse effects of drought stress using a desert adapted endophytic fungus and glucose in tomato. **Rhizosphere**, v. 21, n. 100481, p. 100481, 2022.

GHOSH, U. K. et al. Proline, a multifaceted signalling molecule in plant responses to abiotic stress: understanding the physiological mechanisms. **Plant Biology**, v. 24, n. 2, 18 nov. 2021.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indole acetic acid. **Plant Physiology**, n. 1, p. 192–195, 1951.

GUO, J. S. et al. Temporal shifts in iso/anisohydry revealed from daily observations of plant water potential in a dominant desert shrub. **The new phytologist**, v. 225, n. 2, p. 713–726, 2020.

GUO, R. et al. *Trichoderma asperellum* xylanases promote growth and induce resistance in poplar. **Microbiological research**, v. 248, n. 126767, p. 126767, 2021.

GUO, X. et al. Metabolomics Response for Drought Stress Tolerance in Chinese Wheat Genotypes (*Triticum aestivum*). **Plants**, v. 9, n. 4, p. 520, 17 abr. 2020.

HANAKA, A. et al. Plant tolerance to drought stress in the presence of supporting bacteria and fungi: An efficient strategy in horticulture. **Horticulturae**, v. 7, n. 10, p. 390, 2021.

Havir, E.A.; McHale, N.A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. **Plant Physiology**. 84:450-455. 1987

HE, X.-J. et al. Semi-solid-state fermentation of *Polygonum cuspidatum* roots by a novel endophytic fungus *Penicillium rubens* with capabilities of cell wall hydrolysis and polydatin deglycosylation to improve the yield of high-value resveratrol. **Industrial crops and products**, v. 209, n. 117964, p. 117964, 2024.

HOSSEYNI MOGHADDAM, M. S. et al. Desert-adapted fungal endophytes induce salinity and drought stress resistance in model crops. **Plant physiology and biochemistry**, v. 160, p. 225–238, 2021.

HUSNA et al. Heavy metal tolerant endophytic fungi *Aspergillus welwitschiae* improves growth, ceasing metal uptake and strengthening antioxidant system in *Glycine max* L. **Environmental science and pollution research international**, v. 29, n. 11, p. 15501–15515, 2022.

ILYAS, M. et al. Drought tolerance strategies in plants: A mechanistic approach. **Journal of plant growth regulation**, v. 40, n. 3, p. 926–944, 2021.

IQBAL, N. et al. Global prospects of climate-resilient agriculture. In: **Climate-Resilient Agriculture, Vol 1**. Cham: Springer International Publishing, 2023. p. 1–25.

JAHN, L.; HOFMANN, U.; LUDWIG-MÜLLER, J. Indole-3-acetic acid is synthesized by the endophyte *Cyanoderma asteris* via a tryptophan-dependent and -independent way and mediates the interaction with a non-host plant. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 5, p. 2651, 2021.

JAVED, J. et al. Endophytic fungal consortia enhance basal drought-tolerance in *Moringa oleifera* by upregulating the antioxidant enzyme (APX) through heat shock factors. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 9, p. 1669, 2022.

JHA, C. K. et al. Microbial enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase: An elixir for plant under stress. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 115, n. 101664, p. 101664, 2021.

JHA, Y.; YADAV, K. A.; MOHAMED, H. I. Plant growth-promoting bacteria and exogenous phytohormones alleviate the adverse effects of drought stress in pigeon pea plants. **Plant and soil**, 17 jul. 2023.

JÓNATAN, L. et al. Evaluating the agronomic efficiency of alternative phosphorus sources applied in Brazilian tropical soils. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 12 abr. 2024.

KAUR, H. et al. Prospects of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 10, p. 291, 2024.

KAUR, R.; SAXENA, S. *Penicillium citrinum*, a drought-tolerant endophytic fungus isolated from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves with plant growth-promoting abilities. **Current microbiology**, v. 80, n. 5, p. 184, 2023.

KESAWAT, M. S. et al. Regulation of reactive oxygen species during salt stress in plants and their crosstalk with other signaling molecules-current perspectives and future directions. **Plants**, v. 12, n. 4, 2023.

KHAEIM, H. et al. Impact of temperature and water on seed germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.). **Agronomy (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 2, p. 397, 2022.

KHALMURATOVA, I. et al. Diversity and plant growth-promoting effects of fungal endophytes isolated from salt-tolerant plants. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 1680–1687, 2020.

KHOSHMANZAR, E. et al. Effects of *Trichoderma* isolates on tomato growth and inducing its tolerance to water-deficit stress. **International journal of environmental science and technology: IJEST**, v. 17, n. 2, p. 869–878, 2020.

KOUR, D. et al. ACC deaminase producing phytomicrobiomes for amelioration of abiotic stresses in plants for agricultural sustainability. **Journal of plant growth regulation**, 2023.

KUZHUPPILLYMYAL-PRABHAKARANKUTTY, L. et al. Endophytic *Beauveria bassiana* promotes drought tolerance and early flowering in corn. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 47, 2020.

LACAVA, P. T.; MACHADO, P. C.; DE ANDRADE, P. H. M. Phosphate solubilization by endophytes from the tropical plants. In: **Endophytes: Mineral Nutrient Management, Volume 3**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 207–226.

LICHTENTHALER, H. K.; Buschmann, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001.

LIMA, M. S. DE et al. Checklist of the flora in ironstone outcrops at the Urucum Plateau, Corumbá, Mato Grosso do Sul. **Biota neotropica**, v. 19, n. 3, 2019.

LIU, L. et al. Combined application of arbuscular mycorrhizal fungi and exogenous melatonin alleviates drought stress and improves plant growth in tobacco seedlings. **Journal of plant growth regulation**, v. 40, n. 3, p. 1074–1087, 2021.

LIU, X.-Q. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi induce flavonoid synthesis for mitigating oxidative damage of trifoliate orange under water stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 204, p. 105089, 4 out. 2022.

LOPER, J. E. Influence of bacterial sources of indole-3-acetic acid on root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v. 76, n. 4, p. 386, 1986.

LÜ, Z.-W. et al. Isolation of endophytic fungi from *Cotoneaster multiflorus* and screening of drought-tolerant fungi and evaluation of their growth-promoting effects. **Frontiers in microbiology**, v. 14, p. 1267404, 2023.

MANSOOR, S. et al. Reactive oxygen species in plants: From source to sink. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 2, p. 225, 2022.

MARTÍNEZ-SANTOS, E. et al. *In vitro* response of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) to PEG-induced osmotic stress. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 22611, 2021.

MENESES, C. H. S. G. Potencial hídrico induzido por polietilenoglicol-6000 na viabilidade de sementes de algodão. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/623435>>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MISHRA, S.; BHATTACHARJEE, A.; SHARMA, S. An Ecological Insight into the Multifaceted World of Plant-Endophyte Association. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 40, n. 2, p. 127–146, 4 mar. 2021.

MONITORAMENTO DE SECAS E IMPACTOS NO BRASIL – JUNHO/2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/cemaden/pt-br/assuntos/monitoramento/monitoramento-de-seca-para-o-brasil/monitoramento-de-secas-e-impactos-no-brasil-2013-junho-2024>>. Acesso em: 13 sep. 2024.

MOROPANA, T. J. et al. Screening *Aspergillus flavus*, *Talaromyces purpureogenus*, and *Trichoderma koningiopsis* for Plant-Growth-Promoting Traits: A Study on Phosphate Solubilization, IAA Production, and Siderophore Synthesis. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 12, p. 811–811, 22 nov. 2024.

MORSY, M.; CLECKLER, B.; ARMUELLES-MILLICAN, H. Fungal endophytes promote tomato growth and enhance drought and salt tolerance. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 877, 2020.

NADER, A. A. et al. Drought-tolerant bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi mitigate the detrimental effects of drought stress induced by withholding irrigation at critical growth stages of soybean (*Glycine max*, L.). **Microorganisms**, v. 12, n. 6, p. 1123, 2024.

Nakano, Y., Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, 22, 867-880, 1981.

NASIF, S. O. et al. Prospects of endophytic fungi as a natural resource for the sustainability of crop production in the modern era of changing climate. **Symbiosis (Philadelphia, Pa.)**, v. 89, n. 1, p. 1–25, 2023.

NIAZ, K. et al. Drought-tolerant fungal microbes, *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus fumigatus*, elevate phytohormonal and antioxidant responses of maize under drought stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 28 nov. 2024.

NWE, L. L.; CASONATO, S.; JONES, E. E. Endophytic fungal isolates from apple tissue: Latent pathogens lurking within? **Fungal biology**, v. 128, n. 4, p. 1836–1846, 2024.

OGBE, A. A. et al. Growth-promoting characteristics of fungal and bacterial endophytes isolated from a drought-tolerant mint species *Endostemon obtusifolius* (E. meyer. Ex Benth.) N. e. br. **Plants**, v. 12, n. 3, 2023.

OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. **Microbiological research**, v. 235, n. 126439, p. 126439, 2020.

OU, T. et al. Study on the Potential for Stimulating Mulberry Growth and Drought Tolerance of Plant Growth-Promoting Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, p. 4090–4090, 17 fev. 2023.

PIKOVSKAYA, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. **Microbiologiya**, v. 17, p. 362-370, 1948

POVEDA, J. et al. Endophytic fungi as direct plant growth promoters for sustainable agricultural production. **Symbiosis (Philadelphia, Pa.)**, v. 85, n. 1, p. 1–19, 2021

QI, Y. et al. Effects of drought stress induced by hypertonic polyethylene glycol (PEG-6000) on *Passiflora edulis* Sims physiological properties. **Plants**, v. 12, n. 12, 2023.

QUAZI, S. A. J. et al. Role of *Trichoderma asperelloides* and *Trichoderma brevicompactum* in improving drought tolerance in rice. **Plant Stress**, v. 12, n. 100457, p. 100457, 2024.

RAI, S. et al. Iron homeostasis in plants and its crosstalk with copper, zinc, and manganese. **Plant Stress**, v. 1, n. 100008, p. 100008, 2021

RAMADA, M. H. S. et al. Secretome analysis of the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* ALL 42 cultivated in different media supplemented with *Fusarium solani* cell wall or glucose. **Proteomics**, v. 16, n. 3, p. 477–490, 2016.

RAUF, M. et al. Molecular mechanisms of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase producing *Trichoderma asperellum* MAP1 in enhancing wheat tolerance to waterlogging stress. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 614971, 2020.

RAWAT, P. et al. Phosphate-Solubilizing Microorganisms: Mechanism and Their Role in Phosphate Solubilization and Uptake. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 21, 30 set. 2020.

REHMAN, B. et al. ACC deaminase-producing endophytic fungal consortia promotes drought stress tolerance in *M.oleifera* by mitigating ethylene and H₂O₂. *Frontiers in plant science*, v. 13, p. 967672, 2022.

RiSAF - RISCO DE SECA NA AGRICULTURA FAMILIAR AGO./24. Disponível em: <<https://www.gov.br/cemaden/pt-br/assuntos/monitoramento/RiSAF-Risco-da-seca-na-agricultura-familiar/risaf-risco-de-seca-na-agricultura-familiar-ago-24>>. Acesso em: 14 fev. 2025.

ROSS, C. W. *Plant Physiology Laboratory Manual*. Belmont, CA, USA: Wadsworth **Publishing** Company, 1974.

RUAS, R. D. B. et al. Strong genetic structure in *Dyckia excelsa* (Bromeliaceae), an endangered species found on ironstone outcrops in Pantanal, Brazil. **Botanical journal of the Linnean Society. Linnean Society of London**, v. 192, n. 4, p. 691–705, 2020.

SAHU, P. K. et al. ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. **Frontiers in plant science**, v. 13, p. 1042936, 2022.

SALEEM, A. et al. Securing a sustainable future: the climate change threat to agriculture, food security, and sustainable development goals. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, 11 jul. 2024.

SALEEM, H. et al. Culturable endophytic fungal communities associated with cereal crops and their role in plant growth promotion. In: **Sustainable Development and Biodiversity**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 53–77.

Sandhya, V., Ali, S. Z., Grover, M., Reddy, G., Venkateswarlu, B. Effect of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. on compatible solutes, antioxidant status and plant growth of maize under drought stress. **Plant Growth Regulation**, 62, 21–30, 2010. <https://microbenotes.com/ninhydrin-test/>

SARATH, G, DELAMOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BROND, J. V. **Proteolytic enzymes: A practical approach**. New York: Oxford University, 1996.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987

SHAHZAD, A. et al. Nexus on climate change: agriculture and possible solution to cope future climate change stresses. *Environmental science and pollution research international*, v. 28, n. 12, p. 14211–14232, 2021.

SHARMA, S.; DHAR, M. K.; KAUL, S. Antagonistic, plant growth promoting and extracellular hydrolytic enzyme activity of fungal endophytes of *Dioscorea bulbifera* L. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 50, n. 102694, p. 102694, 2023.

SIVAKUMAR, N. et al. Phyllospheric microbiomes: Diversity, ecological significance, and biotechnological applications. In: **Sustainable Development and Biodiversity**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 113–172.

SLAMA, H. B. et al. Potentials of endophytic fungi in the biosynthesis of versatile secondary metabolites and enzymes. **Forests**, v. 12, n. 12, p. 1784, 2021.

SODHI, G. K.; SAXENA, S. Plant growth promotion and abiotic stress mitigation in rice using endophytic fungi: Advances made in the last decade. **Environmental and experimental botany**, v. 209, n. 105312, p. 105312, 2023.

SOLANKI, P. et al. Microbial proteases: ubiquitous enzymes with innumerable uses. **Biotech**, v. 11, n. 10, 8 set. 2021.

SONG, P. et al. Microbial proteases and their applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 14 set. 2023.

SORIANO, B.M.A. Climatologia. In Zoneamento ambiental da Borda Oeste do Pantanal: Maciço do Urucum e Adjacências (J.S.V. Silva ed.). Embrapa, Brasília, p. 69-82, 2000.

SUBRAHMANYAM, G. et al. Diversity, plant growth promoting attributes, and agricultural applications of rhizospheric microbes. In: **Sustainable Development and Biodiversity**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 1–52.

SUJATHA, E.; GUNASWETHA, K.; BRAMHACHARI, P. V. Current perspectives on phosphate-solubilizing endophytic fungi: Ecological significances and biotechnological applications. In: **Sustainable Development and Biodiversity**. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 79–96.

SUN, Y. et al. Response of plants to water stress: A meta-analysis. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 978, 2020.

Sun, Y. I., Oberley, L. W., Li, Y. (1988) A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. **Clinical chemistry**, v. 34, n. 3, p. 497-500.

SYED, A. et al. Metal-tolerant and siderophore producing *Pseudomonas* fluorescence and *Trichoderma* spp. improved the growth, biochemical features and yield attributes of chickpea by lowering Cd uptake. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 4471, 18 mar. 2023.

TADYCH, M.; WHITE, J. F. Endophytic Microbes. Reference Module in Life Sciences, 2019.

TAKAHASI, A.; MEIRELLES, S. T. Ecologia da vegetação herbácea de bancadas lateríticas (cangas) em Corumbá, MS, Brasil. *Hoehnea*, v. 41, p. 515-528, 2014.

TAMARIZ-ANGELES, C. et al. Characterization of siderophore-producing microorganisms associated to plants from high-Andean heavy metal polluted soil from Callejón de Huaylas (Ancash, Perú). **Microbiological Research**, v. 250, p. 126811, 2 jul. 2021.

TANDON, A. et al. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. **Journal of King Saud University. Science**, v. 32, n. 1, p. 791–798, 2020.

THAKOR, R.; MISTRY, H.; BARIYA, H. Efficacy of indole-3-acetic acid-producing PGPFs and their consortium on physiological and biochemical parameters of *Trigonella foenum-graecum* L. **Horticulture, environment and biotechnology**, v. 64, n. 4, p. 533–546, 2023.

TRENTIN, A. B. et al. Rooting for growth: Meta-analyzing the role of Endophytic fungi in plant growth. **Scientia horticultrae**, v. 333, n. 113276, p. 113276, 2024.

VASSILEVA, M. et al. Fungi, P-solubilization, and plant nutrition. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1716, 2022.

VIANA, T. F. C. et al. Cultivable bacterial diversity associated with bromeliad roots from ironstone outcrops in central Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 4, p. 872–880, 2020.

VIEIRA, E. F.; DELERUE-MATOS, C. Exploitation of *Saccharomyces cerevisiae* enzymes in food processing and preparation of nutraceuticals and pharmaceuticals. In: **Microorganisms for Sustainability**. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 41–62.

VITERBO, A. et al. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203: ACC deaminase characterization in *Trichoderma*. **FEMS microbiology letters**, v. 305, n. 1, p. 42–48, 2010.

WANG, X. et al. Identification of endophytic fungi with ACC deaminase-producing isolated from halophyte *Kosteletzkya virginica*. **Plant signaling & behavior**, v. 17, n. 1, p. 2152224, 2022.

Woisky, R. G., Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apiculture Research**, 37 (2), 99-105, 1998.

YEDIDIA, I.; BENHAMOU, N.; CHET, I. Induction of Defense Responses in Cucumber Plants (*Cucumis sativus* L.) by the Biocontrol Agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1061–1070, 1999.

ZHANG, X. et al. Screening of calcium- and iron-targeted phosphorus solubilizing fungi for agriculture production. **Rhizosphere**, v. 26, p. 100689–100689, 22 mar. 2023.

ZHAO, L.; WANG, Y.; KONG, S. Effects of *Trichoderma asperellum* and its siderophores on endogenous auxin in *Arabidopsis thaliana* under iron-deficiency stress. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, v. 23, n. 4, p. 501–509, 2020.

ANEXOS

Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**PATRIMÔNIO GENÉTICO****Comprovante de Cadastro de Acesso****Cadastro nº A5DE22D**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A5DE22D**
 Usuário: **UFMS**
 CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie*Aspergillus sp**Penicillium sp**Chaetomium sp*

Título da Atividade: **Isolamento e identificação de fungos filamentosos para promoção de crescimento vegetal sob condições de déficit hídrico**

Equipe

FABIANA FONSECA ZANOELO **UFMS**

Samanta Monção Silva **UFMS**

Rodrigo Mattos Silva Galeano **UFMS**

Marivaine da Silva Brasil **UFMS**

Giovana Cristina Giannesi **UFMS**

Douglas Chodi Masui **UFMS**

Data do Cadastro: **30/08/2024 11:08:34**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:08** de **30/08/2024**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AE5129A

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AE5129A**
Usuário: **UFMS**
CPF/CNPJ: **15.461.510/0001-33**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Trichoderma longibrachiatum

Trichoderma viride

Trichoderma reesei

Trichoderma sp

Título da Atividade: **Fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* isolados do solo e região rizosférica da soja com potencial para biocontrole e promoção de crescimento vegetal**

Equipe

FABIANA FONSECA ZANOELO	UFMS
Rodrigo Mattos Silva Galeano	UFMS
Giovana Cristina Giannesi	UFMS
Douglas Chodi Masui	UFMS
Clarice Rossatto Marchetti	UFMS
Marivaine da Silva Brasil	UFMS
Ana Lorena de Oliveira Simas	UFMS
Samanta Monção Silva	UFMS
Nelciele Cavalieri de Alencar Guimarães	UFMS
Nathalia Nunes Glienke	UFMS
João Victor Souza Ribeiro	UFMS
Isabela Pavão Vargas	UFMS
Izabella Marques de Assis	UFMS
Hellen Natália Cardoso Malheiro	UFMS

Data do Cadastro: **02/02/2024 12:41:03**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **11:09** de **30/08/2024**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**