

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Caracterização *in vitro* de Linhagens de Fungos
Endofíticos de Raízes de Cana-de-açúcar dos
Gêneros *Periconia* e *Trichoderma***

Luana Corrêa Silva

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE LINHAGENS DE FUNGOS
ENDOFÍTICOS DE RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR DOS GÊNEROS
PERICONIA E *TRICHODERMA***

LUANA CORRÊA SILVA

Sob a Orientação do Professor
Ricardo Luiz Louro Berbara

e Co-orientação do Professor
Orivaldo José Saggin Júnior

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

Seropédica, RJ
Março de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
Com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586c Silva, Luana Corrêa, 1995-
Caracterização *in vitro* de linhagens de fungos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar dos gêneros *Periconia* e *Trichoderma* / Luana Corrêa Silva. – Seropédica, 2022.
104 f. : il.

Orientador: Ricardo Luis Louro Berbara.
Dissertação (Mestrado). – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2022.

1. Endófitos Septados Escuros. 2. Solubilização de fosfato. 3. Produção de auxina. 4. Tolerância metálica. 5. Vinhaça. I. Berbara, Ricardo Luis Louro, 1957-, orient. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA (CIÊNCIAS DO SOLO)



**HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 13 / 2022 - CPGACS
(12.28.01.00.00.27)**

Nº do Protocolo: 23083.013496/2022-28

Seropédica-RJ, 03 de março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE AGRONOMIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO

LUANA CORRÊA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra**, no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, Área de Concentração em Biologia do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03/03/2022.

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 03/03/2022 17:11)
RICARDO LUIZ LOURO BERBARA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
AIUFRRJ (12.28.01.00.00.50)
Matrícula: 387406

(Assinado digitalmente em 03/03/2022 15:39)
JERRI EDSON ZILLI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 927.881.579-91

(Assinado digitalmente em 04/03/2022 10:00)
ELIANE MARIA RIBEIRO DA SILVA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 511.084.027-04

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **13**, ano:
2022, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**, data de emissão:
03/03/2022 e o código de verificação: **7b056cfab5**

A minha mãe Diana do Socorro Serrão,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus!

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo pela oportunidade e conhecimento adquirido nesses anos.

Ao CNPq e a FAPERJ pela concessão da bolsa, o que possibilitou minha dedicação exclusiva na realização deste trabalho.

À minha mãe, Diana do Socorro Serrão Corrêa, e aos meus irmãos Marlon Corrêa Silva e Ayla Corrêa Silva, pelo incentivo, apoio, paciência e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao professor Ricardo Luiz Louro Berbara, pela oportunidade de orientação, confiança e disponibilidade em me auxiliar.

Ao professor Orivaldo José Saggin Júnior por todo apoio, paciência, ensinamentos, altíssima disponibilidade, dedicação e suporte para realização desse projeto.

À minha professora de graduação Camila Pinheiro Nobre por me incentivar a seguir na carreira acadêmica.

Ao técnico Itamar Garcia Ignácio por todos os ensinamentos práticos.

Às minhas amigas Paula Fernanda, Stéfanny Ribeiro e Amanda Sales por me passarem calma e darem apoio.

À Embrapa Agrobiologia, e seus integrantes por tornarem isso tudo possível.

E à todas as outras pessoas cujos nomes não estão aqui, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Luana Corrêa Silva, filha de Diana do Socorro Serrão Corrêa e Marconi de Jesus Chaves Silva, nasceu em São Luís, Maranhão, no dia 22 de novembro de 1995. Concluiu o ensino médio no Colégio Maria Aragão no ano de 2014 em São Luís, Maranhão. Em 2015, ingressou no Curso de Engenharia Agrônoma na Universidade Estadual do Maranhão. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica na área de Microbiologia do solo (2014-2018). Foi monitora na disciplina de Melhoramento Genético Vegetal (2019). Graduiu-se em 2020. No mesmo ano ingressou no curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo na área de Biologia do Solo na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

SILVA, Luana Corrêa. **Caracterização *in vitro* de linhagens de fungos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar dos gêneros *Periconia* e *Trichoderma***. 2022. 104f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do solo). Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2022.

Os fungos endofíticos vivem nos tecidos internos da maioria das espécies de plantas e podem beneficiar as plantas por meio da nutrição, tolerância a estresses e produção de reguladores de crescimento. O objetivo desse trabalho foi caracterizar *in vitro* linhagens de fungos endofíticos obtidas de raízes de cana-de-açúcar, dos gêneros *Periconia* e *Trichoderma*, quanto sua capacidade de solubilizar fosfatos, crescer em diferentes condições de estresse de metais e vinhaça e de produzir ácido indolacético. Os experimentos contaram com 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* (*Pm*) e 60 de *Trichoderma* spp. (*Ts*) da Coleção de Fungos da Embrapa Agrobiologia. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 6 repetições, onde as linhagens foram os tratamentos. As médias das linhagens foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5%. Nos experimentos de solubilização de fosfato usou-se meio Pikovskaya ágar acrescido de fosfato de cálcio à pH 7,0 e fosfato de alumínio a pH 5,0. Nos demais experimentos utilizou-se o meio extrato de malte-ágar (MEA). Nos experimentos de tolerância a metais (cádmio, cobre e zinco) e vinhaça, foram estudados em três níveis, sendo zero e mais dois níveis de excesso baseados em literatura e testes prévios de inibição com algumas linhagens. No experimentos de produção de ácido indolacético (AIA) utilizou-se MEA líquido sendo as colônias separadas por centrifugação e o teor de AIA quantificado por espectrofotometria. Trinta e oito por cento das linhagens de *Pm* e 19% das linhagens de *Ts* estudadas apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, mas apenas a linhagens A358, de *Trichoderma harzianum*, foi capaz de solubilizar fosfato de alumínio. As linhagens de *Pm* A356 e A155 e as de *Ts* e as linhagens A169 e A513 foram as mais eficientes em solubilizar fosfato de cálcio. No nível mais elevado de cádmio as linhagens de *Pm* que apresentaram o maior índice de tolerância (IT) foram A333, A334, A332, A336, A423, A163, A355, A226 e A157 e as de *Ts* foram A404, A406 e A229. No nível mais elevado de cobre, as linhagens de *Pm* que apresentaram o maior IT foram A163 e A164 e as de *Ts* foram A357, A240, A480 e A501. No nível mais elevado de zinco, as linhagens de *Pm* que apresentaram o maior IT foram A163, A158, A161, A162, A373, A372, A315, A314, A330 e A302 e as de *Ts* foram A169 e A240. Para o nível mais elevado de vinhaça as linhagens de *Pm* que apresentaram o maior IT foram A316, A158, A317, A314, A373, A335, A334, A125, A356, A259, A126, A338 e A423 e as de *Ts* foram A169 e A342. As linhagens de *Pm* que produziram maior quantidade de AIA por unidade de massa de micélio foram A257 e A226 e as de *Ts* foram A361, A401, A360, A359, A357, A358, A512 e A377. Tanto as linhagens de *Pm*, quanto as de *Ts* apresentaram grande tolerância ao excesso de vinhaça sugerindo adaptação dos fungos endofíticos de cana-de-açúcar a esse resíduo aplicado às lavouras. As linhagens de *Pm* apresentam maior tolerância aos estresses causados pelo excesso de metais (cádmio, cobre e zinco) e vinhaça que as linhagens de *Ts*.

Palavras-chave: Endófitos Septados Escuros. Solubilização de fosfato. Produção de auxina. Tolerância metálica. Vinhaça.

ABSTRACT

SILVA, Luana Corrêa. **In vitro characterization of endophytic fungal strains from sugarcane roots of the genera *Periconia* and *Trichoderma***. 2022. 104p. Dissertation (Master in Agronomy, Soil Science). Institute of Agronomy, Federal Rural University of Rio de Janeiro, RJ, 2022.

Endophytic fungi live in the internal tissues of most plant species and can benefit plants through nutrition, stress tolerance, and production of growth regulators. The objective of this work was to characterize in vitro strains of endophytic fungi obtained from sugarcane roots, of the genera *Periconia* and *Trichoderma*, regarding their ability to solubilize phosphates, grow under different conditions of metal and vinasse stress and to produce indole acetic acid. . The experiments included 57 lines of *Periconia macrospinoso* (Pm) and 60 of *Trichoderma* spp. (Ts) from the Embrapa Agrobiologia Fungi Collection. The experiment was in a completely randomized design (DIC) with 6 replications, where the lines were the treatments. The means of the lines were grouped by the Scott-Knott test at 5%. In the phosphate solubilization experiments, Pikovskaya agar medium was used with calcium phosphate at pH 7.0 and aluminum phosphate at pH 5.0. In the other experiments, the malt-agar extract (MEA) medium was used. In the experiments of tolerance to metals (cadmium, copper and zinc) and vinasse, they were studied at three levels, zero and two more levels of excess based on literature and previous inhibition tests with some strains. In the experiments for the production of indoleacetic acid (AIA) liquid MEA was used, the colonies were separated by centrifugation and the AIA content was quantified by spectrophotometry. Thirty-eight percent of the Pm strains and 19% of the Ts strains studied were able to solubilize calcium phosphate, but only the A358 strain, from *Trichoderma harzianum*, was able to solubilize aluminum phosphate. The Pm strains A356 and A155 and the Ts strains and the strains A169 and A513 were the most efficient in solubilizing calcium phosphate. At the highest level of cadmium, the Pm strains that showed the highest tolerance index (TI) were A333, A334, A332, A336, A423, A163, A355, A226 and A157 and those of Ts were A404, A406 and A229. At the highest level of copper, the Pm strains that presented the highest TI were A163 and A164 and those of Ts were A357, A240, A480 and A501. At the highest level of zinc, the Pm strains that presented the highest TI were A163, A158, A161, A162, A373, A372, A315, A314, A330 and A302 and those of Ts were A169 and A240. For the highest level of vinasse, the Pm lines that presented the highest TI were A316, A158, A317, A314, A373, A335, A334, A125, A356, A259, A126, A338 and A423 and those of Ts were A169 and A342 . The Pm strains that produced the highest amount of AIA per unit mass of mycelium were A257 and A226 and those of Ts were A361, A401, A360, A359, A357, A358, A512 and A377. Both Pm and Ts strains showed great tolerance to excess vinasse, suggesting adaptation of sugarcane endophytic fungi to this residue applied to crops. Pm strains show greater tolerance to stresses caused by excess metals (cadmium, copper and zinc) and vinasse than Ts strains.

Keywords: Dark Septate Endophytes. Phosphate solubilization. Auxin production. Metal tolerance. Vinasse.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Placa com meio MEA repicada pré-experimento para retirada de discos de 8 mm da colônia fúngica para inoculação das parcelas do experimento (Na foto é a placa mais inferior com cor mais escura). A foto mostra a linhagem A308 de *Trichoderma harzianum*, cujos os discos de colônia foram retirados e repicados para as placas superiores que compunham o experimento de solubilização de fosfato de cálcio. Autor da foto: SILVA, L. C. (2021). 13
- Figura 2.** *Aspergillus niger* em bulbo de cebola com sintomas de mofo preto (A); Plaqueamento de diluição seriada para isolamento (B); Crescimento de colônias monospóricas (C); linhagens monospóricas de *Aspergillus niger* isoladas e repicadas em meio PVK mostrando halo de solubilização escuro em torno da colônia (D); e linhagens isoladas de *A. niger*: A521, A522, A523, A524, A525, A526, A527, A528, A529, A530, A531, A532 (E). Autor: SILVA, L. C. (2021). 16
- Figura 3.** Índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinosa* e de *Trichoderma* spp para cada nível de Cd (Efeito principal para nível de Cd na análise de variância). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre níveis de Cd pelo teste de Scott Knott 5%. 48
- Figura 4.** Índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinosa* (I) ver pg. 58) e de *Trichoderma* spp (II) para cada nível de Cu (Efeito principal para nível de Cu na análise de variância). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre níveis de Cu pelo teste de Scott Knott 5%. 59
- Figura 5.** Índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinosa* (I) ver pg. 66) e de *Trichoderma* spp (II) para cada nível de Zn (Efeito principal para nível de Zn na análise de variância). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre níveis de Zn pelo teste de Scott Knott 5%. 67
- Figura 6.** Índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinosa* e de *Trichoderma* spp para cada nível de vinhaça (Efeito principal para nível de vinhaça na análise de variância). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre níveis de vinhaça pelo teste de Scott Knott 5%. 75
- Figura 7.** Aparência e desenvolvimento de colônia de linhagens de *Periconia macrospinosa*, e *Trichoderma* spp. em meio Extrato de Malte-Agar (MEA) com três níveis de cádmio especificados abaixo da identificação da linhagem em mg.L⁻¹ de Cd no meio. Fotos exemplificando a linhagem A447 de *Periconia macrospinosa* e a linhagem A459 de *Trichoderma virens*. Autor da foto: SILVA, L. C. (2021). 87
- Figura 8.** Aparência e desenvolvimento de colônia de linhagens de *Periconia macrospinosa*, e *Trichoderma* spp. em meio Extrato de Malte-Agar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L⁻¹ de Cu no meio. Fotos exemplificando a linhagem A336 de *Periconia macrospinosa* e a linhagem A468 de *Trichoderma asperellum*. Autor da foto: SILVA, L. C. (2021). 88
- Figura 9.** Aparência e desenvolvimento de colônia de linhagens de *Periconia macrospinosa*, e *Trichoderma* spp. em meio Extrato de Malte-Agar (MEA) com três níveis de zinco especificados abaixo da identificação da linhagem em mg.L⁻¹ de Zn no meio. Fotos exemplificando a linhagem A236 de *Periconia macrospinosa* e a linhagem A167 de *Trichoderma hamatum*. Autor da foto: SILVA, L. C. (2021). 89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens de <i>Periconia macrospinosa</i> isoladas de raízes de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp), coletadas em diferentes municípios do estado de São Paulo, com o respectivo clima (Köeppen) e bioma do local de coleta. Código de cadastro no SISGEN A86D7CF.....	9
Tabela 2. Linhagens do gênero <i>Trichoderma</i> isoladas de raízes de cana-de-açúcar (<i>Saccharum</i> spp), coletadas em diferentes municípios do estado de São Paulo, com os respectivos clima (Köeppen) e bioma do local de coleta. Código de cadastro no SISGEN A86D7CF.....	10
Tabela 3. Lista de linhagens faltantes nos experimentos conduzidos, por não apresentarem crescimento na repicagem pré-experimento.	12
Tabela 4. Experimentos de tolerância de linhagens de <i>Periconia</i> e <i>Trichoderma</i> ao excesso de metais, com seus respectivos níveis de metais, doses de regente para induzi-los e tempo de condução do experimento.	17
Tabela 5. Caracterização da condutividade elétrica e ajuste de pH dos tratamentos utilizados nos experimentos de tolerância ao excesso de vinhaça.	18
Tabela 6. Curva padrão de ácido indolacético (AIA) preparada com o meio extrato de malte líquido incubado sem a presença de fungos, com respectivos volumes pipetados para poços da microplacas de 96 poços.	19
Tabela 7. Diâmetro médio (DM) e velocidade de crescimento (VC) das colônias de diferentes linhagens de <i>Periconia macrospinosa</i> após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK) com fosfato de cálcio. Médias em ordem decrescente.	21
Tabela 8. Diâmetro médio (DM) e velocidade de crescimento (VC) das colônias de diferentes linhagens de <i>Trichoderma spp</i> após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK) com fosfato de cálcio. Médias em ordem decrescente.	23
Tabela 9. Linhagens de <i>Periconia</i> e <i>Trichoderma</i> quanto a presença (marcada com X) ou ausência de halo translúcido indicando a solubilização de fosfato de cálcio após 48 e 72 horas de crescimento dos fungos em meio PVK.....	25
Tabela 10. Diâmetro médio do halo de solubilização (DH) e índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio de diferentes linhagens de <i>Periconia macrospinosa</i> , após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK). Médias em ordem decrescente.....	28
Tabela 11. Diâmetro médio do halo de solubilização (DH) e índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio de diferentes linhagens de <i>Trichoderma spp.</i> , após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK). Médias em ordem decrescente.	30
Tabela 12. Diâmetro médio da colônia (DM), velocidade de crescimento (VC), diâmetro médio do halo de solubilização (DH) e índice de solubilização (IS) de fosfato de alumínio de diferentes linhagens de <i>Periconia macrospinosa</i> após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK). Médias em ordem decrescente.	33
Tabela 13. Diâmetro médio da colônia (DM), velocidade de crescimento (VC), diâmetro médio do halo de solubilização (DH) e índice de solubilização (IS) de fosfato de alumínio de diferentes linhagens de <i>Trichoderma spp.</i> após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK). Médias em ordem decrescente.	35
Tabela 14. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de <i>Periconia macrospinosa</i> após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 400 e 500 mg.L ⁻¹ de cádmio. Médias em ordem decrescente.....	40
Tabela 15. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de <i>Trichoderma spp.</i> após 48 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 200 e 300 mg.L ⁻¹ de cádmio. Médias em ordem decrescente.	42

Tabela 16. Índice de tolerância ao cádmio após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte- ágar (MEA) com 400 e 500 mg.L ⁻¹ de cádmio (Experimento com linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i>) ou após 48 horas de crescimento em MEA com 200 e 300 mg.L ⁻¹ de cádmio (Experimento com linhagens de <i>Trichoderma</i> spp.). Médias em ordem decrescente.	45
Tabela 17. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i> após 120 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L ⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.....	49
Tabela 18. Peso do micélio fresco (PMF) e peso do micélio seco (PMS) de colônias de diferentes linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i> após 120 horas de crescimento em meio extrato de malte- ágar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L ⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.	51
Tabela 19. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. após 48 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L ⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.	53
Tabela 20. Peso do micélio fresco (PMF) e peso do micélio seco (PMS) de colônias de diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. após 48 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L ⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.....	55
Tabela 21. Índice de tolerância ao cobre após 120 horas de crescimento (Experimento com linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i>) ou 48 horas de crescimento (Experimento com linhagens de <i>Trichoderma</i> spp.) em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 300 e 1000 mg.L ⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.....	56
Tabela 22. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i> após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 400 e 600 mg.L ⁻¹ de zinco. Médias em ordem decrescente.....	60
Tabela 23. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. após 48 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 300 e 400 mg.L ⁻¹ de zinco. Médias em ordem decrescente.	62
Tabela 24. Índice de tolerância ao zinco após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte- ágar (MEA) com 400 e 600 mg.L ⁻¹ de zinco (Experimento com linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i>) ou após 48 horas de crescimento em MEA com 300 e 400 mg.L ⁻¹ de zinco (Experimento com linhagens de <i>Trichoderma</i> spp.). Médias em ordem decrescente.	65
Tabela 25. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i> após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 400 e 800 mL.L ⁻¹ de vinhaça. Médias em ordem decrescente.	68
Tabela 26. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. após 24 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 400 e 800 mL.L ⁻¹ de vinhaça. Médias em ordem decrescente.	70
Tabela 27. Índice de tolerância a vinhaça após 96 horas de crescimento (Experimento com linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i>) ou 24 horas de crescimento (Experimento com linhagens de <i>Trichoderma</i> spp.) em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 400 e 800 mL.L ⁻¹ de vinhaça. Médias em ordem decrescente.	73
Tabela 28. Concentração de ácido indolacético (AIA) no meio de cultura, massa fresca de micélio e quantidade de AIA produzido pelo micélio de linhagens de <i>Periconia macrospinoso</i> após 120 h de crescimento em extrato de malte líquido suplementado com L-triptofano. Médias em ordem decrescente.	76
Tabela 29. Concentração de ácido indolacético (AIA) no meio de cultura, massa fresca de micélio e quantidade de AIA produzido pelo micélio de linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. após 120 h de crescimento em extrato de malte líquido suplementado com L-triptofano. Médias em ordem decrescente.....	79

Tabela 30. Velocidade de crescimento (VC) em mm.dia ⁻¹ de linhagens de <i>Periconia macrospinosa</i> após 96 h de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) em diferentes experimentos. Médias ordenadas pela VC média dos experimentos.	81
Tabela 31. Velocidade de crescimento (VC) em mm.dia ⁻¹ de linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. após 48 h (24 h no experimento de vinhaça) de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) em diferentes experimentos. Médias ordenadas pela VC média dos experimentos.	83
Tabela 32. Velocidade de crescimento (VC) em mm.dia ⁻¹ de linhagens de <i>Periconia macrospinosa</i> após 96 h de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) suplementado com a dosagem mais elevada de cádmio, cobre, zinco ou vinhaça em diferentes experimentos. Médias ordenadas pela VC média dos experimentos.	84
Tabela 33. Velocidade de crescimento (VC) em mm.dia ⁻¹ de linhagens de <i>Trichoderma</i> spp. após 48 h (24 h no experimento de vinhaça) de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) suplementado com a dosagem mais elevada de cádmio, cobre, zinco ou vinhaça em diferentes experimentos. Médias ordenadas pela VC média dos experimentos.	86

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Cana-de-Açúcar	2
2.2 Microrganismos Endofíticos e Rizosféricos	2
2.2.1 Fungos endófitos	3
2.3 Fatores que Afetam a Produção de Cana-de-Açúcar e que Podem Interagir com a Presença de Fungos Endofíticos	3
2.3.1 Uso da vinhaça	3
2.3.2 Excesso de metais potencialmente tóxicos	6
2.3.3 Produção do regulador de crescimento ácido indolacético (AIA)	7
2.3.4 Solubilização de fosfatos.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
3.1 Condições Experimentais Gerais a Todos os Experimentos	9
3.1.1 Material biológico	9
3.1.2 Local dos experimentos	13
3.1.3 Delineamento dos experimentos	13
3.1.4 Análises estatísticas.....	13
3.2 Condições Experimentais Específicas por Tipo de Experimento	14
3.2.1 Experimentos de solubilização de fosfatos	14
3.2.2 Experimento de tolerância a excesso de metais	17
3.2.3 Experimentos de tolerância ao excesso de vinhaça.....	18
3.2.4 Determinação da produção de ácido indolacético (AIA).....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Solubilização de Fosfato de Cálcio.....	20
4.2 Solubilização de Fosfato de Alumínio.....	32
4.3 Experimento de Tolerancia a Metais	38
4.3.1 Tolerância ao excesso de cádmio.....	39
4.3.2 Tolerância ao excesso de cobre.....	48
4.3.3 Tolerância ao excesso de zinco	60
4.4 Tolerância ao Excesso de Vinhaça.....	67
4.5 Produção do Regulador de Crescimento Ácido Indolacético (AIA).....	75
4.6 Análise Geral dos Experimentos	81
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar possui uma elevada importância econômica para o mundo e, principalmente, para o Brasil, devido à produção de diversos derivados, entre os mais comuns, o açúcar, álcool e energia. A produção da cana-de-açúcar é regida por uma política nacional que promove uma expansão sustentável da cultura, levando em consideração os critérios econômicos, ambientais e sociais das regiões. Para o aumento sustentável da produtividade da cana-de-açúcar são necessárias estratégias para a conservação do solo e seus atributos, onde tem-se destacado a importância dos atributos biológicos, que implica na utilização da complexa microbiota, composta por bactérias, arqueias, protozoários, fungos, nemátodos e artrópodes, tanto internos como externos ao tecido vegetal, em benefício da agricultura.

Os microrganismos presentes na rizosfera podem disponibilizar nutrientes essenciais ao desenvolvimento vegetal, principalmente aqueles que encontram-se em formas não assimiláveis às plantas, mas que depois de metabolizados pelos microrganismos podem se tornar disponíveis às plantas. Dentre os microrganismos benéficos às plantas pode-se destacar bactérias e fungos endófitos ou endofíticos, ou seja, que vivem internamente nos tecidos das plantas, ao menos durante um período de seu ciclo de vida. Entre os fungos endofíticos, vários estão envolvidos na nutrição mineral das plantas, atuando principalmente na solubilização de fosfato (HONG-YUAN et al., 2015; EL-GHANDOUR et al., 2018) e/ou absorção de fósforo (ZHU et al., 2018), além daqueles que produzem sideróforos (HAMAYUN et al., 2009), moléculas similares aos hormônios de crescimento vegetal (HAMAYUN et al., 2009; AZEVEDO, 2014), ou ainda que aumentam a tolerância a excesso de metais (AZEVEDO, 2014), tendo um efeito de estimulação da fitorremediação de áreas contaminadas (AZEVEDO, 2014).

A cultura da cana-de-açúcar, além de sua importância econômica, possui naturalmente numerosos endófitos fúngicos, podendo ser fonte de bioprospecção de endófitos promotores do crescimento e nutrição vegetal, ou aliviadores de estresses, da própria cana-de-açúcar ou de outras culturas. Linhagens de fungos endofíticos obtidas de raízes de cana-de-açúcar podem ser selecionadas e utilizadas como inoculante para aumentar a produtividade e sustentabilidade da produção da cana e de outras culturas. Dentro de isolados fúngicos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar, destacam-se a presença dos gêneros *Periconia*, reconhecidamente um gênero de “Dark Septate Endophytes” (DSE), e de *Trichoderma*, reconhecidamente um gênero de promotores de crescimento e de controle biológico (GRÜNIG et al., 2008; MANDYAM; JUMPPONEN, 2015; FORS et al., 2020). Devido ao grande número de linhagens desses gêneros obtidas em trabalho de isolamento de raízes de cana-de-açúcar (FORS et al., 2020), antes de testá-las inoculando plantas, faz-se necessário uma caracterização *in vitro* prévia das linhagens para ser possível uma seleção das linhagens de maior potencial para serem avaliadas como promotoras de crescimento de plantas ou aliviadoras de estresse, sem que seja necessário testar todas as linhagens junto a uma planta. Logo, o objetivo desse trabalho foi caracterizar *in vitro* linhagens de fungos endofíticos obtidas de raízes de cana-de-açúcar, dos gêneros *Periconia* e *Trichoderma*, quanto sua capacidade de solubilização de fosfatos, crescimento em diferentes condições de estresse e produção de ácido indolacético.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cana-de-Açúcar

A cana é uma planta alógama, da família Poaceae, pertencente ao gênero *Saccharum*, onde atualmente compreende seis espécies: *Saccharum officinarum* L.; *S. robustum* Brandes e Jeswietex Grassl; *S. barberi* Jeswiet; *S. sinense* Roxb; *S. spontaneum* L. e *S. edule* Hassk. (MATSUOKA et al., 1999). As variedades cultivadas atualmente são híbridos multiespecíficos dessas seis espécies, comumente designados *Saccharum* spp. A planta apresenta metabolismo fotossintético C4 e possui grande potencial de armazenamento de sacarose nos tecidos dos colmos (RIPOLI; RIPOLI, 2006). A sua estrutura morfológica compreende um desenvolvimento em forma de touceira, caule do tipo colmo, produção de inflorescência, rizoma e raiz fasciculada típicas da família poaceae (SILVA; SILVA, 2012).

A cultura da cana-de-açúcar possui uma elevada importância econômica para o mundo e, principalmente, para o Brasil, devido à produção de diversos derivados, entre os mais comuns, o açúcar, álcool e energia elétrica (SILVA, 2013). Segundo dados da CONAB (2021), o Brasil registrou uma área plantada de 8.264.430 ha, uma produção de 568.430.220 toneladas com uma produtividade de 68,78 t.ha⁻¹. Na região Sudeste concentra-se mais de 60% do plantio de cana, tendo em 2021 uma área plantada de 5.155.690 ha, uma produção de 356.722.500 toneladas com uma produtividade de 69,19 t.ha⁻¹.

O Brasil ocupa a posição de maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, desse modo a cultura possui uma grande importância para o agronegócio brasileiro. De acordo com dados da CONAB (2021), dentre os estados produtores, São Paulo lidera a produção e área plantada da cultura, com mais de 50% da produção nacional. O índice de colheita mecanizada neste estado saiu de 47,6% na safra 2008/09 para 96,9% na safra 2021/22 (CONAB, 2021). E com relação a área destinada ao setor sucroalcooleiro, depois de São Paulo os estados que seguem em área plantada e produção são Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul. (CONAB, 2021).

Na região centro-sul do Brasil, o sistema de plantio da cana é realizado de duas maneiras. Na primeira forma, o cultivo da cana-planta tem duração de um ano e meio, e o plantio ocorre entre janeiro e março, sendo que este favorece mais o desenvolvimento da planta. Na segunda forma, o cultivo da cana-planta dura um ano e acontece o plantio entre os meses de outubro e novembro. Em algumas regiões é possível o plantio no inverno (abril a setembro), o que garante ter corte de cana durante o ano todo (ALFONSI et al., 1987; CASAGRANDE, 1991; AGUIAR et al., 2014).

A produção da cana-de-açúcar é regida por uma política nacional que se norteia em uma expansão sustentável da cultura, levando em consideração os critérios econômicos, ambientais e sociais (MAPA, 2015). Seguindo o critério ambiental, o Decreto-Lei do Estado de São Paulo, nº 42.056/9, dispõe sobre a proibição da queimada na colheita e adoção do corte mecanizado, no qual resulta em menor custo de cultivo, melhoria na eficiência do uso da água e, principalmente, na melhora da conservação do solo e preservação da fauna e microbiota, melhorias essas que contribuem acentuadamente para o aumento sustentável da produtividade (LEAL et al., 2008).

2.2 Microrganismos Endofíticos e Rizoféricos

As plantas terrestres geralmente desenvolvem-se associadas a uma complexa microbiota tanto interna (endófitos ou endofíticos), como externa ao tecido vegetal na parte aérea (filosfera) e nas raízes (rizosfera). A zona mais próxima às raízes da planta, rizosfera, é considerada um dos ecossistemas mais complexos e é habitado por bactérias, fungos, oomicetos, nemátodos, protozoários, algas, vírus, arqueias e artrópodes (PEIFFER et al., 2013).

Os microrganismos presentes endofiticamente nas raízes e/ou na rizosfera podem disponibilizar nutrientes essenciais ao desenvolvimento vegetal por solubilização ou absorção. No caso de solubilização, nutrientes que encontram-se em formas não assimiláveis às plantas, depois de metabolizados pelos microrganismos tornam-se disponíveis e podem ser assimilados pelas plantas (PEIFFER et al., 2013). A planta pode moldar o microbioma da rizosfera ao seu favor, selecionando microrganismos com características benéficas ao seu crescimento e saúde, através da produção de exsudados que as raízes liberam e estimulam grupos específicos da biota do solo (BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012).

2.2.1 Fungos endófitos

Os fungos endófitos ou endofíticos vivem nos tecidos internos da maioria das espécies de plantas já estudadas, ao menos durante um período de seu ciclo de vida, sem causar patogenicidade (HYDE; SOYTONG, 2008). Assim, os fungos endofíticos geralmente estão envolvidos na produção de efeitos benéficos às plantas, e são conhecidos por contribuírem no desenvolvimento das plantas, auxiliando uma melhor adaptação às condições de estresses bióticos e abióticos (CARD et al., 2016; POTSHANGBAM et al., 2017), podendo auxiliar na fitorremediação de áreas contaminadas com excesso de metais e outros poluentes (FIGUEIRA et al., 2001).

Muitos desses fungos endofíticos também estão envolvidos na nutrição mineral de plantas onde atuam na solubilização, absorção e quelação de nutrientes. Destacam-se os papéis de solubilização e absorção de fósforo, além da produção de sideróforos. Fungos endofítico são ainda relacionados a produção de vários hormônios de crescimento vegetal, como AIA (ácido indolacético), outras auxinas, giberelinas e etileno (HAMAYUN et al., 2009).

Outro papel dos fungos endofíticos que tem recebido enfoque em literatura está relacionado à sua capacidade de proteger a planta contra patógenos através de estratégias como competição por colonização e nutrientes, produção de antibióticos, metabólitos secundários de defesa e a própria indução de resistência na planta hospedeira (CLARKE et al., 2006; OWNLEY et al., 2010). Além da defesa da planta, os metabólitos secundários produzidos por fungos têm aplicações farmacêuticas como anticancerígenos, antimicrobianos, anti-inflamatório entre outros produtos industriais (TANASOVA; STURLA 2012; PANT et al. 2014).

2.3 Fatores que Afetam a Produção de Cana-de-Açúcar e que Podem Interagir com a Presença de Fungos Endofíticos

2.3.1 Uso da vinhaça

Dentro do sistema de produção etanol de cana-de-açúcar, o principal resíduo líquido produzido pelas usinas é a vinhaça, também conhecida por restilo ou vinhoto (RESENDE et al., 2006). A vinhaça é constituída basicamente por água, minerais inorgânicos, sólidos orgânicos suspensos e poluentes como melanoidina e fenóis (EBELING, 2008; BATISTA, 2021).

A vinhaça apresenta uma expressiva demanda química e bioquímica por oxigênio, além de expressar efeito corrosivo devido ao seu pH ácido, que varia de acordo com as condições de cultivo e da indústria da cana (CORTEZ et al., 2014; UNICA et al., 2016; SADEGHI et al., 2016). Esses fatores a tornam altamente poluente de mananciais hídricos.

Assim, embora o descarte da vinhaça no solo tenha seu lado prejudicial, é a alternativa que causa menos impacto ambiental, desde que as aplicações sejam inferiores a 300 m³ ha⁻¹, sendo o ideal recomendado de acordo com a análise do solo (MORINI et al., 2017). A vinhaça tem impactos sob a condutividade hidráulica em solos, onde em solos com textura média a

aplicação da vinhaça pode aumentar essa condutividade hidráulica, porém em solos de textura argilosa pode ocorrer a diminuição da percolação de água no perfil do solo (FONTANETTI, C.S.; BUENO, O.C., 2017).

Além de ser uma forma de descarte de resíduo industrial aceitável, a aplicação da vinhaça ao solo apresenta benefícios nutricionais como o aporte de matéria orgânica ao solo e contribuição na reposição de cátions nutrientes como K, Ca e Mg (CAIXETA et al., 2011). O potássio é o nutriente em maior quantidade e relevância na vinhaça (PRADO et al., 2014). Na medida em que a vinhaça é aplicada via fertirrigação seguindo as recomendações de análise do solo, ela se equipara a uma adubação, pois a aplicação de 150 m³ ha⁻¹ de vinhaça equivale a uma adubação com 61 kg ha⁻¹ de N, 343 kg ha⁻¹ de K e 108 kg ha⁻¹ de Ca (PENATTI, 2013). Inclusive, o uso da vinhaça pode em certas situações substituir a adubação mineral da cana-planta e cana-soca (FRANCO et al., 2008).

A aplicação da vinhaça na fertirrigação deve seguir o volume padrão com base em uma análise química do solo e sua quantidade não deverá exceder o volume recomendado, afinal a aplicação incorreta e excessiva desse resíduo pode causar poluição ambiental, como o acúmulo de contaminantes e sais no solo, o que torna o ambiente insalubre e o solo salino e instável (SOUZA et al., 2015). Na norma técnica 4.231 da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) do Estado de São Paulo, estabelecem-se os limites máximos de volume aplicado da vinhaça, em média 150 m³ ha⁻¹. Esses limites são baseados na recomendação de adubação dos solos agrícolas, a qual é calculada pela capacidade de troca catiônica (CTC) dos solos, teores de potássio dos solos e quantidade média de extração desse nutriente pela cultura (CETESB, 2006).

De acordo com a CETESB (2015), para a determinação da aplicação da vinhaça deve-se levar em consideração a CTC, o teor de K e a necessidade da cultura desse nutriente, onde a aplicação da concentração máxima de potássio no solo não poderá exceder 5% da CTC. Quando esse limite for atingido, a aplicação de vinhaça ficará restrita à reposição desse nutriente em função da extração média pela cultura, que no caso da cana é de 185 kg ha⁻¹ de K₂O.

A dosagem máxima de vinhaça a ser aplicada no tratamento de solos agrícolas em cultura de cana-de-açúcar será determinada pela equação medida em m³ ha⁻¹ de vinhaça:

$$\text{Dosagem} = \frac{[(0,05 \times \text{CTC} - \text{ks}) \times 3744 + 185]}{\text{kvi}} \quad (1)$$

Onde: 0,05 = 5% da CTC, capacidade de troca catiônica, medida em cmol_c dm⁻³, dada pela análise química do solo, utilizando metodologia de análise do solo do Instituto Agrônomo - IAC. A constante (ks) é a concentração de potássio no solo, dado em cmol_c dm⁻³, à profundidade de 0-0,80 m. A constante “3744” é para transformar os resultados da análise de fertilidade, expressos em cmol_c dm⁻³ ou meq 100 cm⁻³, para kg de potássio em um volume de 1 (um) hectare por 0,80 metros de profundidade. E o valor (185) é a massa, em kg, de K₂O extraído pela cultura da cana por hectare. Por fim o (kvi) é a concentração de potássio na vinhaça expressa em kg m⁻³ de K₂O.

No manejo da cana-de-açúcar a aplicação da vinhaça produzida pelas indústrias sucroalcooleiras provocam diversas alterações nos atributos físico-químicos e biológicos do solo. As alterações na física do solo ocorrem de acordo com o tipo de solo, onde a vinhaça pode funcionar como dispersante ou floculante das partículas, provocando alterações na estrutura, e modificando a distribuição granulométrica, permeabilidade do solo, plasticidade e densidade (FONTANETTI; BUENO, 2017).

As alterações provocadas pela vinhaça na química do solo podem ser verificadas pelo aumento das seguintes características: disponibilidade de alguns nutrientes; potencial redox da solução intersticial; teores de sais; concentração de matéria orgânica; capacidade de troca

catiônica; capacidade de retenção de água; concentração de metais tóxicos, como cádmio, chumbo, cobre, cromo e níquel, e concentração de amônia (SANTOS et al., 2009; FONTANETTI; BUENO, 2017). O uso de forma contínua da vinhaça nos mesmos solos pode resultar na saturação de cátions, em especial o potássio (JUNQUEIRA et al., 2009; BARBOSA et al., 2012). Quando ocorre o excesso de potássio na solução do solo desencadeia um efeito inibitório na absorção de cálcio e magnésio, e como consequência desse desequilíbrio catiônico ocorre o aumento da condutividade elétrica e da pressão osmótica da solução do solo, ou salinização (PRADO, 2008). Dentre essas alterações biológicas causadas pela aplicação da vinhaça no solo, destaca-se o aumento da comunidade microbiana (CAMARGO, 1954). Segundo Santos et al. (2009) a população de microrganismos celulolíticos, como fungos, bactérias e actinomicetos, aumentaram com o emprego da vinhaça na fertirrigação.

Camargo (1954), em seu estudo da comunidade microbiana do solo tratado com vinhaça, observou que houve uma predominância dos fungos *Neurospora* ssp., *Aspergillus* ssp., *Penicillium* ssp., *Mucor* ssp. e *Streptomyces* ssp., entre outros não identificados, em relação aos demais componentes da microbiota do solo. Em outro estudo de fertirrigação a base de vinhaça, verificou-se que a dosagem de 200 m³ ha⁻¹ foi a que promoveu um maior número de unidades formadoras de colônias (UFCs) de fungos, no qual resultou no aumento da população de fungos quando comparado a de bactérias, e esse aumento se deu a partir dos 30 dias de incubação, e com maior número de UFCs de fungos após 120 dias (SANTOS et al., 2009).

A aplicação da vinhaça estimula visivelmente a população de fungos do solo, especialmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, onde foram observados após a incubação, diferenças significativas entre o tratamento controle e o solo que recebeu a vinhaça (NEVES; LIMA; LIMA; DOBEREINER, 1983). Esse estudo mostrou também que o número de actinomicetos do solo foi reduzido nos primeiros dias de incubação, quando comparado ao controle sem vinhaça. Do mesmo modo, a população de *Azospirillum* spp. aumentou durante a incubação de solo com vinhaça e conseqüentemente houve um aumento do potencial de fixação de nitrogênio no solo (SANTOS et al., 2009).

O estímulo da aplicação da vinhaça aos fungos é atribuído à adição de matéria orgânica complexa e à redução do pH do solo. O aumento da população microbiana pela aplicação da vinhaça deve-se ao aporte de substrato orgânico, mas já foi sugerido também ser pela elevação geral da fertilidade do solo (ALMEIDA, 1953), e também pelo desequilíbrio das comunidades microbianas do solo (SANTOS et al., 2009).

Cardozo e Araújo (2011), ao estudarem a vinhaça em meio de cultura para multiplicação de *Bacillus subtilis*, observaram que a mesma acrescida ao meio de cultura na concentração de 25% (onde o *Bacillus subtilis* cresceu em suspensão aquosa na concentração equivalente a 50 m³.ha⁻¹ de vinhaça se aplicada em campo) promoveu um melhor desempenho do crescimento de *B. subtilis* quando comparado com o meio padrão caldo nutriente sem a vinhaça. Esse resultado reafirma que a vinhaça é fonte de substrato orgânico para o crescimento microbiano e pode ser utilizada como parte do meio de cultura para a produção massal de *B. subtilis*, pois contém concentrações consideráveis de material orgânico e inorgânico solúveis e disponíveis para o crescimento bacteriano (SHI; ZHU, 2007). A diluição da vinhaça no meio é justificada para abaixar as concentrações de ácidos alifáticos, aldeídos e álcoois, que são tóxicos e podem interferir no desenvolvimento dos microrganismos no meio de cultura (COUALLIER et al., 2006).

Outros trabalhos usando a vinhaça em meio de cultura demonstraram que existe a possibilidade de multiplicar microrganismos como as microalgas. Estas responderam bem ao incremento de doses de vinhaça, entretanto, ao chegar próximo da dose de 50% do meio de cultura, houve redução da biomassa de microalgas (RAMIREZ et al., 2014). Em experimento com leveduras constataram que a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* se desenvolve bem em vinhaça bruta sem diluição (CAZETTA et al., 2005).

A vinhaça pode possuir diversas substâncias, inclusive resíduos do esgoto da área industrial, os quais podem ter efeito antibiótico, antioxidante e fitotóxico, podem interferir nas propriedades físico, química e biológicas do solo, havendo a necessidade de tratamento desse resíduo antes da aplicação adequada no ambiente (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Desta forma, inclusive microrganismos benéficos aos vegetais podem ser influenciados, particularmente quando a aplicação de vinhaça é excessiva, como costuma ocorrer nos canaviais mais próximos à unidade industrial de processamento da cana-de-açúcar.

2.3.2 Excesso de metais potencialmente tóxicos

O excesso de metais potencialmente tóxicos acumulados no solo podem ser entrave para a produtividade e também para o estabelecimento de uma flora microbiana benéfica nas raízes. O aumento dos teores desses metais com potencial poluidor de solos em áreas agrícolas são resultado da deposição da poluição atmosférica, uso de fertilizantes, corretivos, agrotóxicos que os contenham (NÚÑEZ et al, 1999), água de irrigação, mesmo que com pequenas concentrações de metais (RAMALHO et al., 1996), adição ao solo de resíduos orgânicos (MAZUR, 1997) e inorgânicos (AMARAL SOBRINHO et al., 1999), particularmente os oriundos de indústrias ou áreas urbanas.

Como a aplicação dos resíduos da agroindústria sucroalcooleira constitui em uma prática agrícola bem generalizada, é comum a adição ao solo de diversos efluentes líquidos, especialmente vinhaça e água residuária da área industrial, e também rejeitos sólidos, como a torta de filtro (POLO et al., 1988). Segundo Bolsanello; Vieira (1980), a vinhaça da região de Campos dos Goitacazes-RJ possuía além da matéria orgânica, altos teores de Zn, Mn e Cu. Já a torta de filtro na região de Piracicaba-SP possuía elevados teores de Fe, Mn, Zn e Cu (CERRI et al., 1988).

Com a aplicação de todos esses resíduos nos solos, com o passar do tempo ocorre a elevação dos teores de elementos metálicos, podendo atingir níveis tóxicos (RAMALHO,1996). Muitos metais são essenciais ao metabolismo celular, como é o caso do cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe), onde atuam como co-fatores de diversas enzimas em diversas reações bioquímicas. Os metais não essenciais para planta como o cádmio (Cd), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), prata (Ag) e níquel (Ni) tem propriedades químicas semelhante aos essenciais e são também absorvidos pelos vegetais e microrganismos. O excesso de metais, essenciais ou não, geralmente é tóxico para as plantas e microrganismos, devido sua alta reatividade (GOLDSBROUGH, 1998).

Entretanto, as plantas e os microrganismos geralmente promovem um efeito de remediação da poluição de metais que se baseia em mecanismos de tolerância que podem reduzir de forma direta ou indireta a acumulação de metais no solo (COBBETT et al., 2002). A biorremediação usa microrganismos e plantas para captura e promoção de tolerância à poluentes. A toxicidade por metais nos solos é preocupante devido as plantas e microrganismos serem o mais afetados (GADD, 1990). Contudo esses organismos dispõem de mecanismos distintos que atuam simultaneamente, a bioacumulação e a bio-adsorção, que resulta na remoção dos metais de uma área (KAPOOR et al., 1995).

Diferentes microrganismos podem ser utilizados para a biorremediação, mas os fungos apresentam uma alta eficiência devido ao seu rápido crescimento e multiplicação, e por serem de mais fácil manipulação e produção de grande quantidade de enzimas (DHILLON et al., 2012; ALGHUTHAYMI et al., 2015). O gênero *Trichoderma* spp. abrange uma gama de espécies que realizam a adsorção de partículas metálicas como titânio, cobre, zinco, prata, entre outros (MEYER; MAZARO; SILVA, 2019).

No caso da fitorremediação, a cana-de-açúcar é uma planta que apresenta uma boa capacidade fitorremediadora devido suas características fisiológicas e morfológicas, como a

rusticidade e a alta produção de biomassa, a qual pode ser retirada do ambiente contaminado. Além disso, a cana possui genes que codificam peptídeos quelantes de metais, os quais foram identificados no projeto genoma da cana-de-açúcar da SUCEST (FIGUEIRA et al., 2001). O uso de microrganismos endofíticos benéficos também tolerantes a esses metais pesados pode auxiliar esse efeito fitorremediador da cana-de-açúcar.

2.3.3 Produção do regulador de crescimento ácido indolacético (AIA)

A interação entre fungos endofíticos e planta se baseia na premissa da planta fornecer ao fungo acesso aos compostos energéticos advindos da fotossíntese, e do fungo dentro do seu processo de colonização do tecido vegetal, interferir na nutrição e metabolismo da planta, modificar a síntese proteica, resultando em um processo de adaptação e aumento de tolerância a condições estressantes e de promoção do crescimento vegetal (OELMÜLLER et al., 2009; GILL et al., 2016).

Assim, os fungos endofíticos podem ajudar no processo de adaptação e tolerância a estresses ambientais, como o hídrico e salinidade (FREIRE et al, 2014), por meio da produção de reguladores de crescimento, enzimas e compostos diversos, como os metabólitos secundários (AZEVEDO, 2014).

Silva (2016) ao estudar diversas espécies endofíticas observou uma boa produção de ácido indolacético (AIA) e de compostos antifúngicos *in vitro*. A detecção de AIA produzido por plantas e microrganismos pode ser realizada por métodos colorimétricos (DEVAY et al. 1968; LOPER; SCHROTH, 1986). A determinação da capacidade de microrganismos produzirem certos reguladores de crescimento, como AIA, é importante para a identificação e caracterização desses microrganismos, sendo uma boa variável indicadora do papel fisiológico e dos sinais ecológicos emitidos por eles no meio ambiente (SURICO et al., 1984).

Dentre os grupos de microrganismos, as bactérias rizosféricas, ou rizobactérias, em sua maioria possuem alta capacidade de produzir reguladores de crescimento, como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (ZAHIR et al., 2003). Em especial, o gênero *Azospirillum* é conhecido por produzir reguladores de crescimento, como giberelinas (JANZEN et al., 1992), citocininas (TIEN et al., 1979) e auxinas (MASCARUA-EZPARZA et al., 1988; Omay et al., 1993).

Entre os fungos, embora essa capacidade seja inferior que das bactérias, eles também são responsáveis pela produção de reguladores de crescimento, sendo as pesquisas voltadas a determinação especialmente da produção de AIA. Silva (2016) ao avaliar fungos endofíticos de clones de guaranazeiro (*Paullinia cupana* Mart.), obteve um total de 17 isolados produtores de AIA. Outros fungos, como as espécies *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Trichoderma harzianum* e *T. asperellum* são conhecidos pela síntese de AIA em testes *in vitro* (HOYOS-CARVAJAL et al., 2009, TSAVKELOVA et al., 2012).

No caso do gênero *Trichoderma*, algumas de suas espécies produzem giberelinas e auxinas como o AIA (HERMOSA et al., 2012), que facilitam o desenvolvimento de raízes laterais. Portanto, para sua colonização radicular, o fungo aumenta o crescimento e desenvolvimento tanto das raízes como da área foliar, e isso permite às plantas uma melhor absorção de nutrientes e, inclusive, suportar estresses abióticos como veranicos (HARMAN et al., 2004).

Logo, a avaliação de reguladores de crescimento produzidos por fungos endofíticos *in vitro* possui a vantagem de ser uma avaliação rápida da capacidade estimulatória do crescimento vegetal desse fungos, permitindo a seleção de possíveis agentes promotores de crescimento e biocontrole com maior rapidez (BUBANZ, 2018).

2.3.4 Solubilização de fosfatos

Durante a promoção da nutrição e crescimento das plantas, os microrganismos utilizam diferentes mecanismos, entre eles, a solubilização de nutrientes como, fosfato, ferro, cobre, manganês e zinco. (HARMAN et al., 2004; LUCON, 2014).

Entre os nutrientes mais demandados pelas plantas, o fósforo (P) em geral é muito pouco disponível para a absorção no solo. Mesmo quando aplicado na forma de fertilizante solúvel, cerca de 80% do P aplicado se torna indisponível para absorção pelas plantas, devido aos processos de sorção (absorção e adsorção), precipitação ou imobilização no solo (ROBERTS; JOHNSTON, 2015; ZHU et al., 2018).

Muitos são os microrganismos com capacidade de solubilizar fosfatos que estão precipitados ou imobilizados no solo, rizosfera e dentro dos tecidos das plantas (HONG-YUAN et al., 2015; EL-GHANDOUR et al., 2018). Os microrganismos que solubilizam fosfatos vem sendo estudados para solubilizar fosfatos complexos *in vitro*, geralmente pela redução no pH do meio (GYANESHWAR et al., 2002).

Na natureza, os microrganismos solubilizadores de fosfato possuem uma importância muito grande no ciclo do P, por participarem dos principais processos que envolvem esse nutriente no solo, como a dissolução e precipitação, a sorção e desorção e a mineralização e imobilização. Desse modo eles atuam como disponibilizadores de fósforo para as plantas (KUCEY, 1987; CEPEDA et al., 2005; RICHARDSON et al., 2009).

Dentro de uma grande diversidade de microrganismos, os fungos têm recebido destaque como solubilizadores de fosfato devido possuírem uma maior habilidade de acidificação do meio que as bactérias (NAHAS, 2002). A capacidade de solubilização de fosfatos é associada à habilidade de produção de ácidos orgânicos ou polissacarídeos extracelulares pelos microrganismos (KIM et al., 1997; OMAR, 1998; SOUCHIE et al., 2007), assim como a produção de enzimas fosfatases, que promovem a hidrólise do fosfato orgânico, o qual é convertido para uma forma solúvel de fosfato inorgânico (LEITÃO et al., 2010).

Alguns gêneros de fungos filamentosos como, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sclerotium* e *Talaromyces* têm sido objetos de estudo frequentes como solubilizadores de fosfato (CHUN- CHAO et al., 2007; PANDEY et al., 2008; SHARMA et al., 2013; ZHU et al., 2018).

Fungos do gênero *Trichoderma*, que atuam na relação planta e nutrientes, resultando na promoção de crescimento da planta, também tem capacidade de solubilizar fosfatos e micronutrientes (ALTOMARE et al., 1999; MENDOZA MENDOZA et al., 2018). Segundo Silva (2014), ao estudar fungos endofíticos solubilizadores de fosfato de cálcio e fosfato de ferro, há um bom desempenho na solubilização de fosfatos por alguns gêneros como *Penicillium*, *Fusarium*, *Bionectria* e *Periconia*. Portanto, as linhagens estudadas no presente trabalho, dos gêneros *Periconia* e *Trichoderma*, têm potencial solubilizador de fosfato, justificando suas avaliações neste sentido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições Experimentais Gerais a Todos os Experimentos

3.1.1 Material biológico

Os experimentos *in vitro* foram realizados com linhagens de fungos endofíticos dos gêneros *Periconia* e *Trichoderma*, isoladas de raízes de cana-de-açúcar, que fazem parte da Coleção de Fungos da Embrapa Agrobiologia (COFMEA) pertencente ao Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD). A COFMEA possui 57 linhagens do gênero *Periconia* (Tabela 1) e 60 linhagens do gênero *Trichoderma* (Tabela 2), totalizando 117 linhagens que foram isoladas e identificadas por Fors (2020).

Tabela 1. Linhagens de *Periconia macrospinoso* isoladas de raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), coletadas em diferentes municípios do estado de São Paulo, com o respectivo clima (Köppen) e bioma do local de coleta. Código de cadastro no SISGEN A86D7CF.

Linhagem	Município	Clima	Bioma
A111	João Ramalho	Cfa	Mata Atlântica
A113	Quatá	Cfa	Mata Atlântica
A115	Quatá	Cfa	Mata Atlântica
A124	Quatá	Cfa	Mata Atlântica
A125	Quatá	Cfa	Mata Atlântica
A126	Quatá	Cfa	Mata Atlântica
A154	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A155	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A156	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A157	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A158	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A159	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A160	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A161	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A162	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A163	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A164	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A189	Lençóis Paulista	Cfa	Cerrado
A190	Lençóis Paulista	Cfa	Cerrado
A191	Lençóis Paulista	Cfa	Cerrado
A224	Piracicaba	Cfa	Mata Atlântica
A225	Piracicaba	Cfa	Mata Atlântica
A226	Piracicaba	Cfa	Mata Atlântica
A235	Pirassununga	Cwa	Cerrado
A236	Pirassununga	Cwa	Cerrado
A237	Pirassununga	Cwa	Cerrado

Continua...

Continuação da Tabela 1.

Linhagem	Município	Clima	Bioma
A238	Pirassununga	Cwa	Cerrado
A257	Santa Lúcia	Cfa	Cerrado
A258	Santa Lúcia	Cfa	Cerrado
A259	Santa Lúcia	Cfa	Cerrado
A260	Santa Lúcia	Cfa	Cerrado
A302	Motuca	Aw	Cerrado
A314	Ribeirão Preto	Aw	Cerrado
A315	Ribeirão Preto	Aw	Cerrado
A316	Ribeirão Preto	Aw	Cerrado
A317	Ribeirão Preto	Aw	Cerrado
A318	Ribeirão Preto	Aw	Cerrado
A327	Igarapava	Aw	Cerrado
A328	Igarapava	Aw	Cerrado
A329	Igarapava	Aw	Cerrado
A330	Igarapava	Aw	Cerrado
A331	Igarapava	Aw	Cerrado
A332	Igarapava	Aw	Cerrado
A333	Igarapava	Aw	Cerrado
A334	Igarapava	Aw	Cerrado
A335	Igarapava	Aw	Cerrado
A336	Igarapava	Aw	Cerrado
A337	Igarapava	Aw	Cerrado
A338	Igarapava	Aw	Cerrado
A355	Igarapava	Aw	Cerrado
A356	Igarapava	Aw	Cerrado
A372	Severínia	Aw	Mata Atlântica
A373	Severínia	Aw	Mata Atlântica
A423	Valparaíso	Aw	Mata Atlântica
A424	Valparaíso	Aw	Mata Atlântica
A447	Valparaíso	Aw	Mata Atlântica
A499	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica

Tabela 2. Linhagens do gênero *Trichoderma* isoladas de raízes de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp), coletadas em diferentes municípios do estado de São Paulo, com os respectivos clima (Köppen) e bioma do local de coleta. Código de cadastro no SISGEN A86D7CF.

Linhagem	Espécie	Município	Clima	Bioma
A135	<i>T. sp. 2</i>	Barra Bonita	Cfa	Mata Atlântica
A149	<i>T. sp. 2</i>	Barra Bonita	Cfa	Mata Atlântica
A167	<i>T. hamatum</i>	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A168	<i>T. hamatum</i>	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A169	<i>T. sp. 1</i>	Macatuba	Cfa	Mata Atlântica
A193	<i>T. harzianum</i>	Lençóis Paulista	Cfa	Cerrado

Continua...

Continuação da Tabela 2.

Linhagem	Espécie	Município	Clima	Bioma
A196	<i>T. hamatum</i>	João Ramalho	Cfa	Mata Atlântica
A229	<i>T. hamatum</i>	Piracicaba	Cfa	Mata Atlântica
A240	<i>T. asperellum</i>	Pirassununga	Cwa	Cerrado
A247	<i>T. virens</i>	Porto Ferreira	Cwa	Mata Atlântica
A263	<i>T. sp. 1</i>	Santa Lúcia	Cfa	Cerrado
A282	<i>T. harzianum</i>	Santa Lúcia	Cfa	Cerrado
A306	<i>T. harzianum</i>	Motuca	Aw	Cerrado
A307	<i>T. harzianum</i>	Motuca	Aw	Cerrado
A308	<i>T. harzianum</i>	Motuca	Aw	Cerrado
A319	<i>T. harzianum</i>	Ribeirão Preto	Aw	Cerrado
A320	<i>T. sp. 2</i>	Ribeirão Preto	Aw	Cerrado
A341	<i>T. virens</i>	Igarapava	Aw	Cerrado
A342	<i>T. sp. 2</i>	Igarapava	Aw	Cerrado
A357	<i>T. asperellum</i>	Igarapava	Aw	Cerrado
A358	<i>T. harzianum</i>	Igarapava	Aw	Cerrado
A359	<i>T. harzianum</i>	Igarapava	Aw	Cerrado
A360	<i>T. harzianum</i>	Igarapava	Aw	Cerrado
A361	<i>T. sp. 2</i>	Igarapava	Aw	Cerrado
A377	<i>T. harzianum</i>	Severínia	Aw	Mata Atlântica
A399	<i>T. asperellum</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A400	<i>T. harzianum</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A401	<i>T. harzianum</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A402	<i>T. harzianum</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A403	<i>T. harzianum</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A404	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A405	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A406	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A407	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A408	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A409	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A410	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A411	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A412	<i>T. virens</i>	Barretos	Aw	Mata Atlântica
A426	<i>T. harzianum</i>	Valparaíso	Aw	Mata Atlântica
A458	<i>T. virens</i>	Valparaíso	Aw	Mata Atlântica
A459	<i>T. virens</i>	Valparaíso	Aw	Mata Atlântica
A460	<i>T. virens</i>	Valparaíso	Aw	Mata Atlântica
A461	<i>T. virens</i>	Valparaíso	Aw	Mata Atlântica
A466	<i>T. asperellum</i>	Presidente Epitácio	Aw	Mata Atlântica
A467	<i>T. asperellum</i>	Presidente Epitácio	Aw	Mata Atlântica
A468	<i>T. asperellum</i>	Presidente Epitácio	Aw	Mata Atlântica

Continua...

Continuação da Tabela 2.

Linhagem	Espécie	Município	Clima	Bioma
A480	<i>T. asperellum</i>	Presidente Epitácio	Aw	Mata Atlântica
A481	<i>T. asperellum</i>	Presidente Epitácio	Aw	Mata Atlântica
A482	<i>T. asperellum</i>	Presidente Epitácio	Aw	Mata Atlântica
A483	<i>T. asperellum</i>	Presidente Epitácio	Aw	Mata Atlântica
A501	<i>T. sp. 2</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica
A508	<i>T. harzianum</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica
A509	<i>T. harzianum</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica
A510	<i>T. harzianum</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica
A511	<i>T. harzianum</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica
A512	<i>T. harzianum</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica
A513	<i>T. harzianum</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica
A514	<i>T. harzianum</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica
A515	<i>T. sp. 2</i>	Ipaussu	Cfa	Mata Atlântica

A partir de colônias preservadas pelo método Castellani na COFMEA, todas as linhagens de *Periconia* e *Trichoderma* foram inicialmente repicadas em meio extrato de malte-ágar (MEA) (Extrato de malte 20 g L⁻¹; Dextrose 20 g L⁻¹; Peptona 1 g L⁻¹; Ágar 15 g L⁻¹ e pH ajustado para 6,0), e incubadas a 28 °C no escuro.

Entre 3 e 4 dias antes da implantação de cada experimento, as linhagens foram novamente repicadas para seu uso em pleno crescimento nos experimentos. Algumas linhagens não cresceram nessa repicagem pré-experimento e não foram inseridas em um ou outro experimento, conforme listado na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de linhagens faltantes nos experimentos conduzidos, por não apresentarem crescimento na repicagem pré-experimento.

Experimentos	Linhagens de <i>Trichoderma</i>	Linhagens de <i>Periconia</i>
Solubilização de fosfato de cálcio	A460 e A510	A124 e A329
Solubilização de fosfato de alumínio	A466 e A467	—
Tolerância a excesso de cobre	A466 e A467	—
Tolerância a excesso de cádmio	A407, A466 e A467	—
Tolerância a excesso de zinco	A407, A466 e A467	—
Tolerância a excesso de vinhaça	A466 e A467	—
Produção de ácido indolacético	A461, A466 e A467	—

No processo de implantação dos experimentos foram retirados discos de micélio com 8 mm de diâmetro da borda da colônia de cada linhagem e usados para inocular as parcelas dos experimentos (Figura 1).

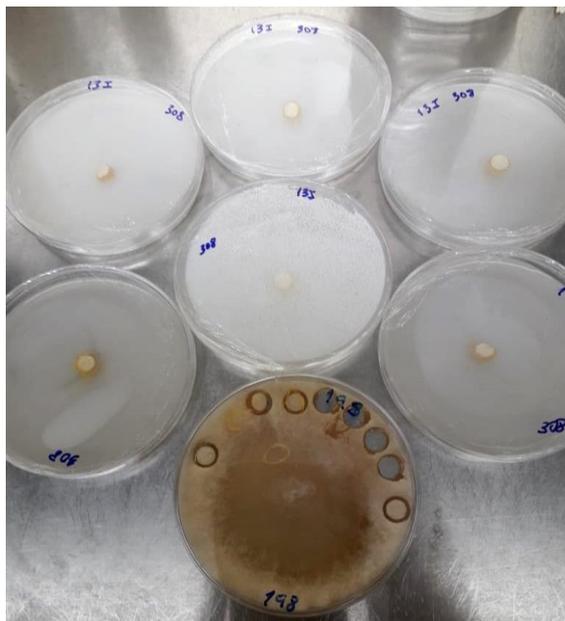


Figura 1. Placa com meio MEA repicada pré-experimento para retirada de discos de 8 mm da colônia fúngica para inoculação das parcelas do experimento (Na foto é a placa mais inferior com cor mais escura). A foto mostra a linhagem A308 de *Trichoderma harzianum*, cujos os discos de colônia foram retirados e repicados para as placas superiores que compunham o experimento de solubilização de fosfato de cálcio. Autor da foto: SILVA, L. C. (2021).

3.1.2 Local dos experimentos

Todos os bioensaios foram realizados no Laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia (-22,760782° -43,680594°, altitude 26 m), no município de Seropédica-RJ.

3.1.3 Delineamento dos experimentos

Os experimentos foram sempre conduzidos separadamente dentro dos gêneros *Periconia* ou *Trichoderma*, sendo que todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC).

Os experimentos que envolviam testes de estresse ou toxidez, utilizando doses crescentes de diferentes metais ou vinhaça, foram conduzidos utilizando um arranjo fatorial que combinava as linhagens fúngicas de um dos gêneros com três doses ou níveis de tratamentos de estresse ou toxidez. Os experimentos que envolviam testes de capacidade de cada linhagem para solubilização de fosfatos ou produção de hormônios possuíam fator único (linhagens fúngicas de um dos gêneros).

Todos os experimentos foram conduzidos com 6 repetições, cuja unidade experimental (parcela) foi uma placa de Petri descartável utilizando meio sólido ou um tubo Falcon estéril quando o meio foi líquido.

3.1.4 Análises estatísticas

Os dados de todos os experimentos foram checados quanto a normalidade utilizando o teste W de Shapiro-Wilk e foram submetidos a análise de variância seguida da comparação das médias pelo teste de Scott Knott 5%, ou por análise de regressão, utilizando o programa Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011).

3.2 Condições Experimentais Específicas por Tipo de Experimento

3.2.1 Experimentos de solubilização de fosfatos

Os experimentos de solubilização de fosfatos foram feitos em placas Petri utilizando o meio sólido Pikovskaya ágar (PVK), que conteve por litro: 0,5 g de extrato de levedura, 10 g de dextrose, 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,2 g de KCl, 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,0001 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 15 g de ágar, sendo as fontes de fósforo e cálcio supridas pelos tratamentos de fosfatos. Nos experimentos com fosfato de cálcio foram acrescentados ao meio PVK 5 g de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ por litro de meio e o pH foi ajustado para 7,0. Nos experimentos com fosfato de alumínio foram adicionados 3,93 g de AlPO_4 e 5,37 g de CaCl_2 por litro de meio PVK e o pH foi ajustado para 5,0.

As placas foram incubadas a 28 °C por 3 dias (72 horas). Foram tomadas duas medidas, transversalmente opostas, do diâmetro da colônia e do halo de solubilização (quando presente). O halo de solubilização foi observado como uma área translúcida ao redor da colônia. Essas medidas foram mensuradas após 48 horas e 72 horas de crescimento, com o auxílio de um paquímetro digital (NOPPARAT; JATUPORNPIPAT; RITTIBOON, 2009). A partir das duas medidas opostas do diâmetro foi calculado o diâmetro médio da colônia e do halo de solubilização, medidas as quais foram utilizadas para calcular o índice de solubilização (IS) de cada isolado por meio da fórmula (PREMONO et al., 1996).

$$\text{IS} = \frac{\phi \text{ médio Halo} + \phi \text{ médio da colônia}}{\phi \text{ médio da Colônia}} \quad (2)$$

Onde, ϕ significa “Diâmetro”.

O índice de solubilização (IS) foi comparado a classificação de Berraquero et al. (1976), a qual classifica-se em $\text{IS} < 2$ cm: baixo índice de solubilização; IS com valores entre 2 cm e 4 cm: médio índice de solubilização e $\text{IS} > 4$ cm: elevado índice de solubilização.

a) Isolamento de fungo solubilizador para controle positivo do experimento

Para a condução dos experimentos de solubilização de fosfatos havia a necessidade de um controle positivo conhecidamente solubilizador de fosfatos. Baseados em dados de literatura foi isolado o fungo *Aspergillus niger* presente em bulbos de cebola, o qual é frequentemente relatado ser produtor de ácido cítrico e solubilizador de fosfatos (BARROSO-NAHAS, 2013; MENDES et al., 2013; DILENDRA et al., 2014; CHOLKE et al., 2019).

Para isso, foi comprado em supermercado um bulbo de cebola (*Allium cepa* L.) com sintomas de mofo preto entre as escamas da túnica externa. O bulbo de cebola foi desinfetado superficialmente com álcool 70% e, dentro da capela de biossegurança, foi escamado delicadamente expondo a presença do mofo preto (Figura 2A). Em seguida, com auxílio de uma alça de platina flambada, parte dos conídios da superfície da cebola foram transferidos para o meio MEA. Quando a colônia quase cobriu a placa, foram retirados da borda 10 discos do meio com micélio colocados em um tubo de ensaio com 10 mL de água destilada estéril e agitado em vortex por 20 segundos, em seguida pipetou-se 1 mL desse concentrado e colocou em outro tubo com 9 mL de água destilada estéril formando a diluição 10^{-1} e assim foi agitado novamente e retirado 1 mL e passado para outro tubo de 9 mL de água destilada formando a diluição 10^{-2} , fazendo-se as diluições em série até 10^{-6} . De cada diluição foram pipetados 100 μL e inoculados por espalhamento com alça de Drigalski em placas contendo MEA, em triplicadas para cada

diluição (Figura 2B). Após 24h de crescimento das diluições plaqueadas, observou-se pontuações isoladas de crescimento fúngico, que foram consideradas colônias monospóricas (Figura 2C). Essas foram imediatamente repicadas para placas com meio MEA estéril para obtenção de isolados monospóricos do fungo *Aspergillus niger*. A classificação dos isolados foi confirmada morfológicamente a partir das lâminas para microscopia, e após a confirmação, os isolados foram armazenados em Castellani e depositados na Coleção de Fungos da Embrapa Agrobiologia (COFMEA). Foram depositadas 12 linhagens de *Aspergillus niger* na COFMEA recebendo os códigos de A521-A532. A capacidade de solubilização dessas linhagens foi testada em meio PVK-fosfato de cálcio (Figura 2D) e a linhagem A521 (C1_101) foi escolhida como testemunha positiva na condução dos experimentos de solubilização de fosfatos por apresentar o maior halo de solubilização.

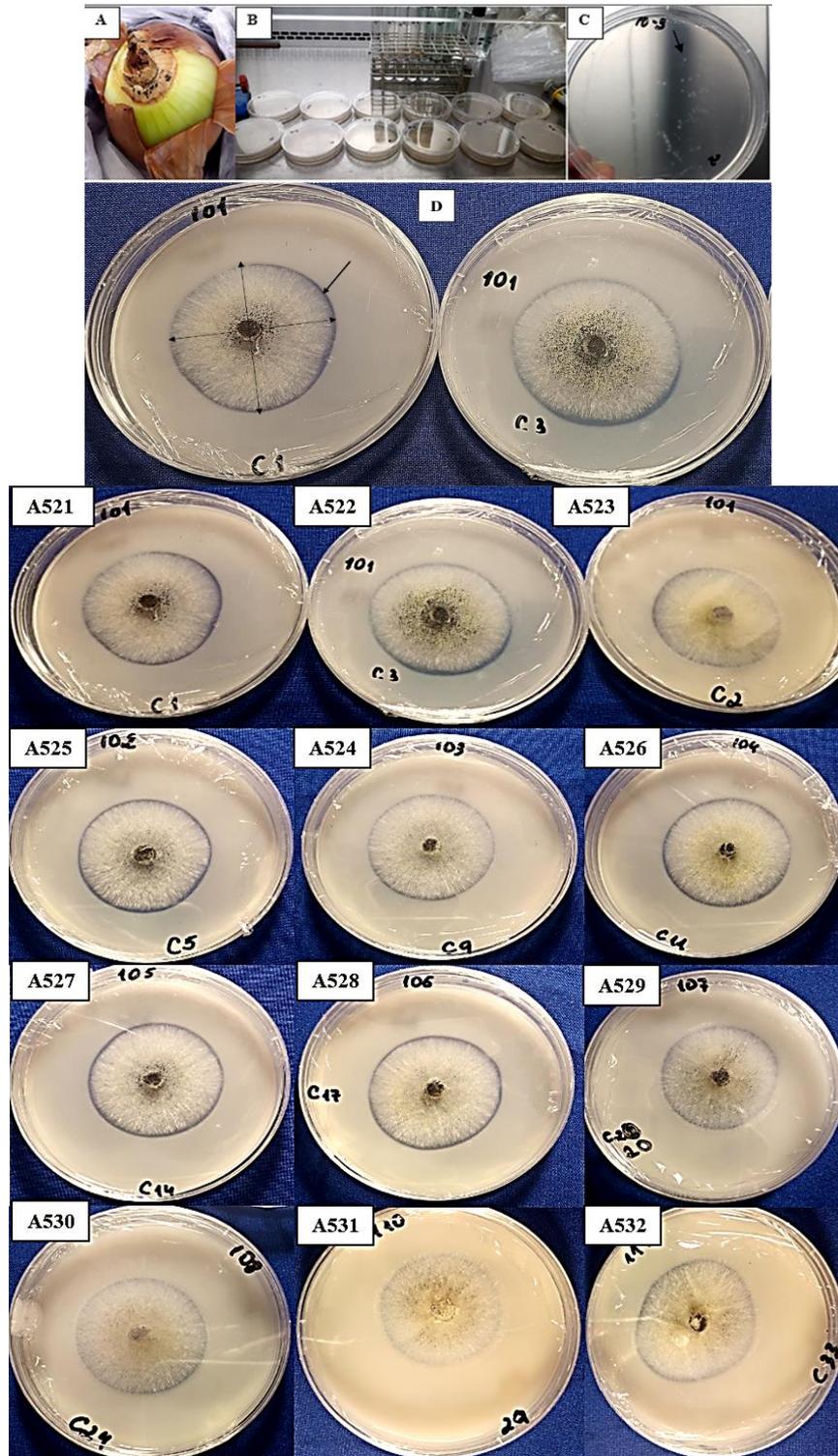


Figura 2. *Aspergillus niger* em bulbo de cebola com sintomas de mofo preto (A); Plaqueamento de diluição seriada para isolamento (B); Crescimento de colônias monospóricas (C); linhagens monospóricas de *Aspergillus niger* isoladas e repicadas em meio PVK mostrando halo de solubilização escuro em torno da colônia (D); e linhagens isoladas de *A. niger*: A521, A522, A523, A524, A525, A526, A527, A528, A529, A530, A531, A532 (E). Autor: SILVA, L. C. (2021).

3.2.2 Experimento de tolerância a excesso de metais

Foram estudadas a tolerância das linhagens ao excesso de três metais, cobre, cádmio e zinco, adicionando doses de CuSO_4 , CdSO_4 e ZnO , respectivamente, ao meio MEA.

Soluções estoques dos três reagentes foram preparadas e utilizadas para estabelecer três níveis de metais nos meios de cultura. Os níveis foram estabelecidos baseando-se dados de literatura de limites de tolerância de fungos a metais e em testes iniciais observando a inibição de crescimento de algumas linhagens de *Periconia* e *Trichoderma*. Foram utilizadas as concentrações de metais e tempos de condução nos experimentos descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Experimentos de tolerância de linhagens de *Periconia* e *Trichoderma* ao excesso de metais, com seus respectivos níveis de metais, doses de regente para induzi-los e tempo de condução do experimento.

Experimento	Níveis estudados	Doses do reagente	Tempo de condução
Linhagens x Metal	mg L ⁻¹ de MEA	g L ⁻¹ de MEA	Horas
<i>Periconia</i> x Cu	0, 300 e 1000 de Cu	0, 1,178 e 3,929 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	120
<i>Trichoderma</i> x Cu	0, 300 e 1000 de Cu	0, 1,178 e 3,929 de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	48
<i>Periconia</i> x Cd	0, 400 e 500 de Cd	0, 0,912 e 1,141 de $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	96
<i>Trichoderma</i> x Cd	0, 200 e 300 de Cd	0, 0,4564 e 0,6846 de $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	48
<i>Periconia</i> x Zn	0, 400 e 600 de Zn	0, 1,742 e 2,628 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	96
<i>Trichoderma</i> x Zn	0, 300 e 400 de Zn	0, 1,314, 1,742 de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	48

O tratamento controle foi composto do nível 0 de aplicação de metais, havendo apenas a presença do metal já presente no meio MEA. O segundo nível foi acima do limite aceitável para solos ou substratos, onde já se verificava alguma inibição de crescimento fúngico. O terceiro nível foi um nível já relatado em literatura ser tóxico para fungos ou que as colônias apresentavam bastante inibição.

Após o tempo de condução dos experimentos, o crescimento das colônias foi estimado pela medida do diâmetro destas tomando-se duas medidas transversalmente opostas com o auxílio de um paquímetro digital. Por meio destas duas medidas foram estimados o diâmetro médio da colônia e a superfície da colônia, considerando essa uma elipse. A partir do tempo de condução do experimento e do diâmetro médio da colônia, subtraindo-se o diâmetro inicial do disco de inoculação (8 mm), calculou-se a velocidade de crescimento da colônia em mm por dia.

No experimento de cobre, a biomassa fúngica foi separada do meio por centrifugação e foi determinada. Para isso, após a medida dos diâmetros das colônias, essas foram cortadas do meio e passadas para tubos de vidros com água e em seguida aquecido em micro-ondas, para dissolver o meio de cultura. A massa micelial foi separada por centrifugação (5000 rpm por 5 minutos) e tomado o peso úmido (Fresco) e, após secagem em estufa a 65°C até obter peso constante, o peso seco do micélio. Nos demais experimentos não foi feita essa avaliação devido ser muito laboriosa e o resultado pouco concordante com a avaliação do crescimento por medida do diâmetro da colônia.

Para o cálculo do índice de tolerância (IT) ao metal usou-se a seguinte fórmula (OLADIPO et al., 2018):

$$IT = \frac{\phi \text{ médio colônia com acréscimo de metal}}{\phi \text{ médio da Colônia controle}} \quad (3)$$

Onde, ϕ significa “Diâmetro”.

O índice de tolerância (IT) foi comparado pela classificação descrita em Oladipo et al. (2018) onde, IT entre 0,00–0,39: tolerância muito baixa ao metal; IT entre 0,40–0,59: baixa tolerância ao metal; IT entre 0,60–0,79: tolerância moderada ao metal; IT entre 0,80–0,99: alta tolerância ao metal e IT \geq 1,00: tolerância é muito alta ao metal.

3.2.3 Experimentos de tolerância ao excesso de vinhaça

A vinhaça utilizada no experimento continha apenas o mosto fermentado e destilado, sem a adição de outros resíduos. Possuía pH 4,08; condutividade elétrica de 11,22 mS; um teor de Sólidos Totais de 9,35 g.L⁻¹ e um teor de nitrogênio de 205,05 mg.L⁻¹.

Para os experimentos de tolerância ao excesso de vinhaça foram utilizado meio extrato de malte-ágar (MEA) acrescido desta vinhaça nas proporções descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização da condutividade elétrica e ajuste de pH dos tratamentos utilizados nos experimentos de tolerância ao excesso de vinhaça.

Tratamentos (proporção de vinhaça por litro de meio)	Condutividade (mS)	pH
Extrato de malte Ágar (0%)	4,06	6,00
Extrato de malte Ágar + 400 mL L ⁻¹ de vinhaça (40%)	4,25	6,00
Extrato de malte Ágar + 800 mL L ⁻¹ de vinhaça (80%)	5,60	6,00

As linhagens fúngicas foram testadas em três concentrações de vinhaça, sendo 0, 400 e 800 mL por litro de meio MEA, sendo que as duas últimas doses equivalem em volume a aplicação de 800 m³ e 1600 m³ de vinhaça por hectare. Para a mistura do meio MEA com a vinhaça, os reagentes equivalentes a um litro de meio foram diluídos no volume de água que faltava para completar o volume da vinhaça ao litro. O meio foi então misturado às dosagens de vinhaça e feito o ajuste do pH para 6,0 antes da autoclavagem. Os experimentos foram inoculados com as linhagens a partir de discos de 8 mm de diâmetro retirados da margem de colônias em crescimento em meio MEA. Os discos foram transferidos para placas Petri descartáveis contendo a mistura vinhaça-MEA. As placas foram incubadas no escuro a 28 °C, por 96 horas para as linhagens de *Periconia* e por 24 horas para as linhagens de *Trichoderma*. O tempo de incubação foi escolhido de maneira que houvesse contraste suficientemente entre as dosagens de vinhaça e antes que o crescimento do micélio cobrisse a placa inteira. Após o tempo de incubação foram tomadas duas medidas do diâmetro das colônias, tal como descrito nos experimentos com excesso de metais para a avaliação do crescimento.

2.3.4 Determinação da produção de ácido indolacético (AIA)

Os experimentos de caracterização das linhagens fúngicas quanto a produção de AIA foram conduzidos em tubos tipo Falcon contendo 20 mL de meio MEA líquido (sem ágar). As linhagens foram inoculadas a partir de discos de 8 mm de diâmetro retirados da margem de colônias em crescimento em meio MEA sólido. Os tubos foram incubados no escuro a 27 °C,

160 rpm por 120 h. Após a incubação o micélio foi separado do meio de cultura por centrifugação (5000 rpm por 5 minutos), seco e pesado para ser usado nos cálculos. Foram tomadas alíquotas do meio sobrenadante para análise conforme modificação da metodologia de Sarwar e Kremer (1995) descrita a seguir. De cada tubo centrifugado foram tomadas três alíquotas de 150 μL do sobrenadante (triplicata) e dispensados em microplacas de 96 poços. Em seguida em cada poço foi adicionado 100 μL do reagente de Salkowski (5 mL HClO_4 - ácido perclórico + 100 μL de FeCl_3 0,5 M), deixando reagir no escuro por 30 min para o desenvolvimento de cor rosa, e em seguida a absorbância foi lida a 536 nm usando um espectrofotômetro. Paralelamente às amostras, também foi lido uma curva de calibração com as seguintes concentrações de AIA: 0; 1,5; 3; 4,5; 6; 9 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta curva foi preparada a partir de uma solução estoque de AIA (750 $\mu\text{g mL}^{-1}$) diluída no próprio meio MEA líquido, que havia sido incubado junto ao experimento sem a presença do fungo (testemunha não inoculada), centrifugado no mesmo tempo e rotação usado para separar os micélios. A tabela 6 mostra as diluições para preparo da curva padrão de AIA. A curva padrão também foi feita em triplicada de cada concentração.

Tabela 6. Curva padrão de ácido indolacético (AIA) preparada com o meio extrato de malte líquido incubado sem a presença de fungos, com respectivos volumes pipetados para poços da microplacas de 96 poços.

Concentração na curva	Solução estoque de AIA 750 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Meio MEA, testemunha não inoculada, centrifugado	Reagente de Salkowski
$\mu\text{g mL}^{-1}$	μL	μL	μL
0,0	0	150	100
1,5	2	148	100
3,0	4	146	100
4,5	6	144	100
6,0	8	142	100
9,0	12	138	100
15,0	20	130	100

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Solubilização de Fosfato de Cálcio

Um total de 113 linhagens de *Trichoderma* e *Periconia* foram testadas e todas mostraram crescimento micelial em meio PVK suplementado com fosfato de cálcio, pH 7,0, o qual tem sua eficiência comprovada em literatura quando comparado com outros meios de cultura indicados para a seleção de fungos solubilizadores de fosfatos, como os meios AYG, NBRIP e NBRIY. (PRADHAN; SUKLA, 2005; RAWAT; TEWARI, 2011; WANG et al., 2020).

O crescimento das colônias das 55 linhagens de *Periconia macrospinosa* no meio PVK sólido é apresentado na Tabela 7 com as médias em ordem decrescente. Pode-se observar que as colônias do isolado de *A. niger*, testemunha positiva de capacidade de solubilização, apresentaram maior diâmetro médio e velocidade de crescimento que as linhagens de *P. macrospinosa*. Excluindo-se essa testemunha, pode-se observar que o teste de Scott Knott a 5% separou as médias das linhagens de *P. macrospinosa* formando de 5 a 6 grupos de crescimento, onde cada grupo foi seguido por letras distintas.

Na avaliação feita 48 horas após a inoculação, as linhagens A333 e A257 apresentaram crescimento superior às demais linhagens. Essas linhagens foram seguidas pelo crescimento das linhagens A191, A226, A236, A335, A337, A499 como segundo maior grupo de crescimento. O teste de Scott Knott 5% separou ainda mais 3 grupos de crescimento inferiores ao grupo anterior, sendo que o grupo de menor crescimento, ou de crescimento mais lento, foi composto pelas linhagens A125, A126, A155, A162, A235, A314, A316, A327, A330, A332, A338 e A356 (Tabela 7). A velocidade de crescimento nas primeiras 48 horas reflete exatamente o resultado do diâmetro da colônia neste período, pois o tamanho inicial das colônias foi idêntico para todos os tratamentos.

Após 72 horas, as colônias mostraram variação na velocidade de crescimento em relação ao observado nas 48 horas, apresentando velocidade de crescimento em média, 2,5 vezes mais rápida nestas últimas 24 horas do que nas primeiras 48 horas. Às 72 horas, a maioria das linhagens de *P. macrospinosa* conseguem ter velocidade de crescimento superior ao observado em literatura em para a espécie de fungo DSE *Harpophora oryzae*, que foi de 6,43 mm.dia⁻¹ em meio Batata Dextrose Agar (BDA) sob uma temperatura de 25 °C (YUAN et al., 2010).

Como esse aumento da velocidade de crescimento não foi igual em todas as linhagens, houve variação na composição dos grupos de crescimento separados pelo teste de Scott Knott 5%. Desta forma, após 72 h da inoculação as linhagens A161 e A333 apresentaram o maior crescimento que as demais linhagens, seguidas de um segundo grupo crescimento composto pelas linhagens A190, A226, A236 e A258. No grupo de menor crescimento mantiveram-se as linhagens A162, A235, A327, A330 (Tabela 7).

Tabela 7. Diâmetro médio (DM) e velocidade de crescimento (VC) das colônias de diferentes linhagens de *Periconia macrospinoso* após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK) com fosfato de cálcio. Médias em ordem decrescente.

48 horas				72 horas			
Linhagem	DM (mm)	Linhagem	VC (mm.dia ⁻¹)	Linhagem	DM (mm)	Linhagem	VC (mm.dia ⁻¹)
<i>A. niger</i>	31,25 a	<i>A. niger</i>	11,63 a	<i>A. niger</i>	47,80 a	<i>A. niger</i>	16,55 a
A333	19,81 b	A333	5,90 b	A161	29,35 b	A338	14,16 b
A257	19,01 b	A257	5,51 b	A333	28,73 b	A161	13,80 b
A236	17,77 c	A236	4,88 c	A226	27,02 c	A237	12,23 c
A226	17,75 c	A226	4,88 c	A258	27,01 c	A154	12,02 c
A337	17,75 c	A337	4,88 c	A190	26,93 c	A258	11,17 c
A335	17,53 c	A335	4,77 c	A236	26,67 c	A317	10,72 c
A191	17,45 c	A191	4,73 c	A335	26,38 d	A314	10,70 c
A499	17,10 c	A499	4,55 c	A315	26,16 d	A126	10,34 c
A260	16,70 d	A260	4,35 d	A317	26,08 d	A334	10,33 c
A190	16,62 d	A190	4,31 d	A337	26,07 d	A190	10,32 c
A156	16,57 d	A156	4,28 d	A338	26,06 d	A238	10,08 c
A189	16,42 d	A189	4,21 d	A237	26,05 d	A315	9,80 c
A224	16,39 d	A224	4,19 d	A154	25,67 d	A316	9,63 d
A315	16,35 d	A315	4,18 d	A257	25,56 d	A424	9,56 d
A424	15,90 d	A424	3,95 d	A424	25,46 d	A125	9,46 d
A160	15,86 d	A160	3,93 d	A156	25,29 d	A302	9,44 d
A258	15,84 d	A258	3,92 d	A334	25,00 d	A115	9,44 d
A328	15,71 d	A328	3,86 d	A159	24,65 d	A318	9,28 d
A159	15,62 d	A159	3,81 d	A318	24,63 d	A226	9,27 d
A161	15,55 d	A161	3,78 d	A224	24,33 d	A159	9,03 d
A111	15,53 d	A111	3,76 d	A191	24,16 d	A331	9,00 d
A317	15,36 d	A317	3,68 d	A328	23,96 d	A333	8,92 d
A318	15,34 d	A318	3,67 d	A372	23,54 e	A236	8,90 d
A372	15,15 d	A372	3,58 d	A238	23,38 e	A335	8,85 d
A158	15,10 d	A158	3,55 d	A189	23,33 e	A373	8,84 d
A355	14,90 d	A355	3,45 d	A158	23,18 e	A156	8,73 d
A423	14,85 d	A423	3,43 d	A260	23,17 e	A332	8,72 d
A334	14,67 d	A334	3,33 d	A314	23,02 e	A225	8,69 d
A336	14,38 e	A336	3,19 e	A160	22,99 e	A157	8,52 d
A259	14,31 e	A259	3,15 e	A355	22,98 e	A372	8,39 d
A447	14,24 e	A447	3,12 e	A115	22,79 e	A163	8,37 d
A113	14,24 e	A113	3,12 e	A225	22,75 e	A337	8,32 d

Continua...

Continuação da Tabela 7.

48 horas				72 horas			
Linagem	DM (mm)	Linagem	VC (mm.dia ⁻¹)	Linagem	DM (mm)	Linagem	VC (mm.dia ⁻¹)
A164	14,21 e	A164	3,11 e	A302	22,59 e	A328	8,25 d
A225	14,06 e	A225	3,03 e	A111	22,46 e	A158	8,08 d
A237	13,82 e	A237	2,91 e	A331	22,29 e	A355	8,08 d
A154	13,65 e	A154	2,82 e	A164	22,27 e	A164	8,06 d
A115	13,35 e	A115	2,68 e	A447	22,03 e	A224	7,94 d
A238	13,30 e	A238	2,65 e	A373	21,91 f	A155	7,89 d
A331	13,28 e	A331	2,64 e	A113	21,76 f	A447	7,79 d
A302	13,15 e	A302	2,58 e	A499	21,67 f	A113	7,53 d
A157	13,08 e	A157	2,54 e	A157	21,60 f	A160	7,13 e
A373	13,07 e	A373	2,54 e	A259	21,35 f	A259	7,04 e
A163	12,91 e	A163	2,45 e	A163	21,28 f	A330	7,02 e
A162	12,52 f	A162	2,26 f	A126	21,09 f	A111	6,93 e
A314	12,32 f	A314	2,16 f	A423	20,93 f	A189	6,91 e
A155	12,09 f	A155	2,05 f	A336	20,88 f	A191	6,71 e
A327	11,95 f	A327	1,97 f	A316	20,55 f	A257	6,54 e
A338	11,90 f	A338	1,95 f	A125	20,54 f	A336	6,50 e
A332	11,49 f	A332	1,74 f	A332	20,20 f	A260	6,48 e
A330	11,37 f	A330	1,69 f	A155	19,98 f	A423	6,07 e
A125	11,08 f	A125	1,54 f	A330	18,39 g	A356	5,88 e
A316	10,92 f	A316	1,46 f	A356	16,56 g	A235	5,66 e
A235	10,76 f	A235	1,38 f	A162	16,54 g	A499	4,56 f
A126	10,74 f	A126	1,37 f	A235	16,42 g	A162	4,02 f
A356	10,68 f	A356	1,34 f	A327	15,69 g	A327	3,74 f

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

O diâmetro médio e a velocidade de crescimento das colônias das linhagens de *Trichoderma* spp. é apresentado na Tabela 8. Nas primeiras 48 horas verifica-se que as colônias do isolado de *A. niger*, testemunha positiva da solubilização, apresentaram maior diâmetro médio e velocidade de crescimento que a maioria das linhagens de *Trichoderma* spp. Apenas as colônias das linhagens A308 e A511 apresentaram o diâmetro médio e velocidade de crescimento iguais as de *A. niger* e superiores às das demais linhagens de *Trichoderma* spp., apresentando diâmetro superior a 30 mm e velocidade acima de 11 mm dia⁻¹. O teste de Scott Knott 5% separou ainda mais 5 grupos de crescimento inferiores ao grupo anterior, sendo o grupo seguinte, composto pelas linhagens A240, A282, A306, A307, A320, A360, A361, A377, A409, A468, A481, A483, A512, A514, cujo diâmetro de colônia variou de 24 a 28 mm. O grupo de menor crescimento e com crescimento mais lento foi composto pelas linhagens A167, A168, A169, A359, A406, A458, A459, A461, A509, A513 com diâmetro médio da colônia variando entre 8 e 11 mm e velocidade variando de 0,27 a 1,59 mm dia⁻¹ (Tabela 8).

Após 72 horas da inoculação, a velocidade de crescimento das colônias de *Trichoderma* spp. aumentou em média mais de 5 vezes. Entretanto, a velocidade de crescimento da testemunha positiva *A. niger* não aumentou, continuando no mesmo ritmo das primeiras 48 horas. Desta forma a velocidade de crescimento de *A. niger* somente não foi superada pela

linhagem A513, e foi superior apenas às das linhagens A169 e A458, as quais embora tenham aumentado bastante a velocidade, seu crescimento continuou muito lento, (2,64 e 0,70 mm dia⁻¹, respectivamente). Isto evidencia que as linhagens de *Trichoderma spp.* têm grande variabilidade na velocidade de crescimento da colônia, mas em geral apresentam rápido crescimento após 48h.

Após 72 horas, as linhagens de *Trichoderma spp.* que se destacaram pelo maior crescimento foram A149, A306, A307, A308, A360, A361, A377, A481, A511, A512, A514 e A515, apresentando diâmetro da colônia entre 66 e 75 mm. Destas apenas A149 e A515 ainda não figuravam como as de maior crescimento após as primeiras 48 horas. O menor diâmetro manteve-se com as linhagens A169 e A458 com diâmetros de colônia de 11,24 e 9,81 mm, respectivamente.

Tabela 8. Diâmetro médio (DM) e velocidade de crescimento (VC) das colônias de diferentes linhagens de *Trichoderma spp* após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK) com fosfato de cálcio. Médias em ordem decrescente.

		48 horas				72 horas					
Linhagem	DM (mm)	Linhagem	VC (mm.dia ⁻¹)	Linhagem	DM (mm)	Linhagem	VC (mm.dia ⁻¹)	Linhagem	VC (mm.dia ⁻¹)		
<i>A. niger</i>	32,51	a	<i>A. niger</i>	12,25	a	A511	75,17	a	A509	55,95	a
A308	32,35	a	A308	12,17	a	A149	73,39	a	A149	52,82	a
A511	30,02	a	A511	11,01	a	A514	71,73	a	A515	46,45	b
A307	28,13	b	A307	10,07	b	A377	71,02	a	A360	46,01	b
A409	27,68	b	A409	9,84	b	A306	70,65	a	A511	45,15	b
A514	27,66	b	A514	9,83	b	A360	70,47	a	A401	44,20	b
A468	27,61	b	A468	9,80	b	A361	69,34	a	A306	44,15	b
A361	27,60	b	A361	9,80	b	A512	68,45	a	A377	44,15	b
A282	27,51	b	A282	9,76	b	A481	67,83	a	A514	44,07	b
A481	27,35	b	A481	9,68	b	A307	67,70	a	A508	42,26	c
A483	27,23	b	A483	9,62	b	A308	67,65	a	A361	41,73	c
A512	27,12	b	A512	9,56	b	A515	66,73	a	A512	41,33	c
A377	26,88	b	A377	9,44	b	A509	64,48	b	A403	41,13	c
A306	26,50	b	A306	9,25	b	A403	63,11	b	A481	40,48	c
A240	25,62	b	A240	8,81	b	A401	62,42	b	A307	39,57	c
A320	24,61	b	A320	8,30	b	A508	61,94	b	A247	39,47	c
A360	24,46	b	A360	8,23	b	A247	61,90	b	A501	37,75	d
A412	23,26	c	A412	7,63	c	A407	60,08	c	A467	37,35	d
A407	23,20	c	A407	7,60	c	A409	60,02	c	A407	36,88	d
A399	23,13	c	A399	7,56	c	A320	58,30	c	A135	36,61	d
A411	22,61	c	A411	7,30	c	A411	58,16	c	A426	35,96	d
A247	22,44	c	A247	7,22	c	A501	57,91	c	A411	35,55	d
A229	21,99	c	A229	7,00	c	A467	56,75	c	A308	35,30	d
A403	21,98	c	A403	6,99	c	A412	56,40	c	A319	34,58	d
A196	21,66	c	A196	6,83	c	A135	56,00	c	A320	33,69	e

Continua...

Continuação da Tabela 8.

		48 horas				72 horas					
Linhagem	DM (mm)	Linhagem	VC (mm.dia ⁻¹)	Linhagem	DM (mm)	Linhagem	VC (mm.dia ⁻¹)	Linhagem	VC (mm.dia ⁻¹)		
A405	21,14	c	A405	6,57	c	A426	54,81	d	A480	33,18	e
A342	20,62	d	A342	6,31	d	A468	54,50	d	A412	33,15	e
A149	20,57	d	A149	6,28	d	A196	54,46	d	A263	32,98	e
A358	20,48	d	A358	6,24	d	A483	54,17	d	A196	32,80	e
A466	20,41	d	A466	6,20	d	A229	53,90	d	A359	32,73	e
A515	20,28	d	A515	6,14	d	A282	53,73	d	A409	32,34	e
A501	20,16	d	A501	6,08	d	A480	53,00	d	A406	32,15	e
A480	19,82	d	A480	5,91	d	A466	52,35	d	A466	31,94	e
A508	19,68	d	A508	5,84	d	A263	52,17	d	A229	31,90	e
A467	19,39	d	A467	5,70	d	A240	51,87	d	A400	31,56	e
A135	19,39	d	A135	5,70	d	A399	51,31	d	A193	31,25	e
A263	19,19	d	A263	5,60	d	A319	50,62	d	A482	31,21	e
A402	19,14	d	A402	5,57	d	A193	50,16	d	A167	30,52	e
A482	18,91	d	A482	5,45	d	A482	50,11	d	A357	29,00	f
A193	18,91	d	A193	5,45	d	A400	48,41	d	A410	28,60	f
A426	18,85	d	A426	5,42	d	A342	47,02	e	A399	28,18	f
A401	18,22	e	A401	5,11	e	A402	46,62	e	A402	27,48	f
A408	17,50	e	A408	4,75	e	A357	46,49	e	A483	26,94	f
A357	17,48	e	A357	4,74	e	A410	44,95	e	A468	26,89	f
A404	17,43	e	A404	4,71	e	A405	43,93	e	A342	26,40	f
A341	17,35	e	A341	4,68	e	A406	43,23	e	A240	26,25	f
A400	16,85	e	A400	4,42	e	A359	42,88	e	A282	26,22	f
A410	16,35	e	A410	4,17	e	<i>A. niger</i>	42,79	e	A404	24,34	f
A319	16,04	e	A319	4,02	e	A404	41,76	f	A405	22,79	g
A513	11,19	f	A513	1,59	f	A167	40,42	f	A408	22,06	g
A406	11,08	f	A406	1,54	f	A408	39,55	f	A461	21,92	g
A168	11,04	f	A168	1,52	f	A358	38,50	f	A459	20,69	g
A359	10,15	f	A359	1,08	f	A341	36,27	f	A341	18,91	h
A167	9,90	f	A167	0,95	f	A461	31,72	g	A358	18,01	h
A461	9,80	f	A461	0,90	f	A459	29,79	g	A168	16,35	h
A458	9,11	f	A458	0,56	f	A168	27,39	h	A513	12,64	i
A459	9,10	f	A459	0,55	f	A513	23,83	h	<i>A. niger</i>	10,28	i
A169	8,60	f	A169	0,30	f	A169	11,24	i	A169	2,64	j
A509	8,53	f	A509	0,27	f	A458	9,81	i	A458	0,70	j

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

Das 113 linhagens de fungo endofíticos da cana-de-açúcar (55 do gênero *Periconia* e 58 do gênero *Trichoderma*) avaliadas, apenas 32 linhagens solubilizaram o fosfato de cálcio após 72h de crescimento, com maior representatividade dentro das linhagens de *Periconia*, representando cerca de 65% dos linhagens solubilizadoras de fosfato de cálcio (Tabela 9).

A caracterização das linhagens de fungos quanto a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio auxilia na escolha de linhagens com potencial desejado para promover o crescimento de plantas. Mendes et. al. (2014) sugerem que o uso de linhagens solubilizadoras de fosfatos

auxilia no manejo do fósforo no solo, permitindo a assimilação de fontes de fosfatos pouco solúveis, como o fosfato de rocha, ou a recuperação do fósforo fixado em partículas do solo, e trazendo o fósforo para dentro da dinâmica da ciclagem de nutrientes, a qual complementa as necessidades nutricionais das culturas.

Fungos comumente relatados como eficazes solubilizadores de fosfato incluem espécies de *Aspergillus candidus*, *A. niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus rugulosus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium* spp, *Pseudeurotium* spp. e *Trichoderma* spp. (ASERI et al., 2009; MURALEEDHARAN et al., 2010). Sendo que no presente estudo, as linhagens de *Periconia macrospinoso* se sobressaíram em relação as de *Trichoderma* spp. quanto a solubilização de fosfato de cálcio.

Atualmente o uso de microrganismos solubilizadores de fosfato têm sido considerado como uma abordagem alternativa para fornecer fertilizantes fosfatados pouco solúveis que promovam crescimento da planta. Existe uma grande variedade de solubilizadores, dentre eles recebem destaque os fungos dos gêneros *Aspergillus* (LI et al. 2016) e *Penicillium* (EFTHYMIU et al. 2018) e as bactérias *Pseudomonas* (LINU et al. 2019), *Burkholderia* (HSU et al. 2015), *Acinetobacter* e *Bacillus* (ALMONEAFY et al. 2014), os quais que são capazes de transformar os fosfatos insolúveis em formas solúveis no solo por acidificação, quelação e reações de troca. Certamente esse mecanismo de alteração de pH foi utilizado pelas linhagens testadas formando o halo de solubilização verificado.

Tabela 9. Linhagens de *Periconia* e *Trichoderma* quanto a presença (marcada com X) ou ausência de halo translúcido indicando a solubilização de fosfato de cálcio após 48 e 72 horas de crescimento dos fungos em meio PVK.

Linhagens de <i>Periconia</i>	48H	72H	Linhagens de <i>Trichoderma</i>	48H	72H
A111			A135		
A113			A149		
A115			A167		
A125			A168		
A126			A169		X
A154	X	X	A193		
A155	X	X	A196		
A156	X	X	A229		
A157	X	X	A240		
A158	X	X	A247		
A159			A263		X
A160			A282		
A161			A306		
A162	X	X	A307		
A163			A308		
A164			A319		X
A189			A320		
A190			A341		
A191			A342		
A224		X	A357		

Continua...

Continuação da **Tabela 9.**

Linhagens de <i>Periconia</i>	48H	72H	Linhagens de <i>Trichoderma</i>	48H	72H
A225			A358		
A226			A359		
A235	X	X	A360		
A236			A361		
A237			A377		
A238	X	X	A399		X
A257	X	X	A400		
A258			A401		X
A259			A402		
A260	X	X	A403		
A302			A404		
A314			A405		
A315			A406	X	X
A316	X	X	A407		
A317	X	X	A408		
A318			A409		
A327	X	X	A410		
A329			A411		
A330		X	A412		X
A331			A426		
A332			A458		
A333			A459		
A334			A460		
A335			A461		
A336	X	X	A468		
A337	X	X	A480		
A338			A481		
A355			A482		
A356	X	X	A483		
A372			A501	X	X
A373	X	X	A508		
A423	X	X	A509		
A424			A510		
A447			A511		X
A499			A512		
			A513		X
			A514		X
			A515		
Total/gênero:	18	21		2	11
Total:			32		

Dezoito linhagens de *Periconia macrospinoso* e apenas duas linhagens de *Trichoderma* apresentaram alta precocidade de solubilização, apresentando halo as 48 horas após a inoculação. Ao final de 72 horas haviam halos em 21 linhagens de *Periconia macrospinoso* e em 11 de *Trichoderma* spp, indicando uma solubilização mais tardia em *Trichoderma* spp. Possivelmente essa precocidade de solubilização de *Periconia macrospinoso* em relação a *Trichoderma* spp. se deva a diferenças de quantidade e composição dos ácidos liberados ao meio.

A testemunha positiva *A. niger* apresentou o maior halo translúcido de solubilização tanto às 48 horas da inoculação, quanto às 72 horas, superior a todos as linhagens de *Periconia macrospinoso* (Tabela 10). Entretanto, como o cálculo do índice de solubilização, que reflete a eficiência de solubilização, leva em consideração o tamanho da colônia, houveram linhagens de *P. macrospinoso* mais eficientes em solubilizar que *A. niger*, como foi o caso das linhagens A155 e A356 que apresentaram o índice de solubilização superior ao controle positivo.

O índice de solubilização de fosfato de cálcio das linhagens de *Periconia macrospinoso* após a incubação por 48 horas foram maiores nas linhagens A155 (IS=2,09) e A356 (IS=2,16), cuja magnitude caracteriza IS mediano de acordo com Berraquero et al. (1976). O controle *A. niger* (IS=1,87) apresentou IS classificado como baixo. A espécie *Aspergillus niger* é conhecida como solubilizadora de fosfato de cálcio (BAGOLUN et al., 2021). Esses autores relatam que a capacidade solubilizadora de *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus* no meio sólido PVK ágar suplementado com fosfato de cálcio, onde *A. niger* obteve o mais alto índice de solubilização (IS=1,72), índice este equivalente ao obtido no presente trabalho. As linhagens A235 (IS=1,91), A316 (IS=1,97) e A327 (IS=1,93) não diferiram do índice de solubilização do controle positivo às 48 horas. Em 72 horas de crescimento, a linhagem A356 (IS=2,02) manteve-se como a de maior eficiência solubilizadora de fosfato, ainda superior ao controle *A. niger* (IS=1,88).

Essa linhagem de maior eficiência solubilizadora (A356) apresentou uma redução no IS entre 48 e 72 horas, e isso pode ser relacionado com a redução da acidificação do meio com o tempo, pois fato similar é observado em meio PVK líquido, no qual o aumento inicial na concentração de fosfato solúvel no meio é seguido por uma redução gradual no decorrer do experimento (NAUTYIAL, 1999; KAPRI; TEWARI, 2010; OLIVEIRA et al., 2012). Embora essa redução na concentração de fosfato solúvel no meio, pode ser correlacionada com o sequestro do nutriente pelo micélio do fungo, o qual somente retorna disponível pra as plantas após a lise das paredes do micélio com a senescência do fungo (KAPRI; TEWARI, 2010).

Os estudos de solubilização de fosfatos insolúveis envolvendo os fungos DSE são escassos na literatura. Vergara et al. (2019) relataram que nenhum de seus isolados fúngicos de DSE produziu halo de solubilização no meio GL. Contudo, isolados fúngicos dos gêneros *Rhizopus*, *Penicillium* e *Aspergillus*, pertencentes a outros grupos fúngicos têm sido bastante estudados como solubilizadores de fosfato de cálcio (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), logo podem ser usados como parâmetro de comparação com a presente pesquisa com DSE.

A capacidade variável das linhagens em solubilizar fosfato pode ser explicada como consequência da variedade e da quantidade de ácidos orgânicos que são produzidos diferentemente pelos isolados fúngicos (WHITELAW et al., 1999), que dependendo do gênero, espécie, e dentro desta, os seus respectivos isolados (NARSIAN; PATEL, 2000). Essa capacidade de solubilização diferenciada foi confirmada no presente trabalho.

Todas as linhagens seguidas de índice de solubilização (IS) igual a 1 não solubilizaram o fosfato de cálcio em meio Pikovskaya ágar (PVK) durante o intervalo de tempo avaliado (Tabela 10). Existe a possibilidade destas linhagens ainda apresentarem solubilização em outras condições/cultivos, pois alterações na capacidade de solubilização de fosfato de isolados podem ocorrer ao longo de sucessivos ciclos de cultivo, levando à perda ou ao aumento da capacidade (ILLMER; SCHINNER, 1995). O aumento ou a perda da capacidade de solubilização de fosfato

estão relacionados à adaptação dos isolados a diferentes condições de disponibilidade de fósforo no meio de cultivo.

Tabela 10. Diâmetro médio do halo de solubilização (DH) e índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio de diferentes linhagens de *Periconia macrospinoso*, após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK). Médias em ordem decrescente.

48 horas				72 horas							
Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS	Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS				
<i>A. niger</i>	27,29	a	A356	2,16	a	<i>A. niger</i>	42,22	a	A356	2,02	a
A155	13,14	b	A155	2,09	a	A356	16,22	b	<i>A. niger</i>	1,88	b
A356	12,02	b	A316	1,97	b	A155	15,01	b	A327	1,83	c
A327	11,08	c	A327	1,93	b	A327	13,05	c	A155	1,75	d
A423	10,84	c	A235	1,91	b	A316	13,00	c	A235	1,75	d
A260	10,58	c	<i>A. niger</i>	1,87	b	A260	12,78	c	A162	1,70	d
A336	10,44	c	A157	1,76	c	A423	12,74	c	A316	1,63	f
A316	10,25	d	A423	1,74	c	A336	12,44	c	A336	1,63	f
A257	9,78	d	A336	1,73	c	A235	12,32	c	A423	1,63	f
A235	9,71	d	A162	1,71	c	A257	11,97	d	A260	1,55	g
A317	9,67	d	A154	1,70	c	A317	11,65	d	A157	1,55	g
A154	9,57	d	A317	1,66	c	A157	11,55	d	A330	1,53	g
A157	9,51	d	A260	1,64	c	A158	11,46	d	A158	1,50	h
A158	9,46	d	A158	1,63	c	A162	11,42	d	A257	1,48	h
A337	9,34	d	A238	1,59	d	A238	11,08	d	A238	1,48	h
A156	8,97	e	A156	1,54	d	A154	10,91	d	A317	1,45	h
A162	8,82	e	A337	1,53	d	A337	10,69	d	A154	1,42	i
A238	7,88	e	A257	1,53	d	A156	9,78	e	A337	1,41	i
A258	1,71	f	A258	1,12	e	A258	9,65	e	A224	1,39	i
A224	1,46	f	A224	1,08	e	A330	9,61	e	A156	1,39	i
A111	0,00	f	A111	1,00	e	A224	9,51	e	A258	1,36	i
A113	0,00	f	A113	1,00	e	A111	0,00	f	A111	1,00	j
A115	0,00	f	A115	1,00	e	A113	0,00	f	A113	1,00	j
A125	0,00	f	A125	1,00	e	A115	0,00	f	A115	1,00	j
A126	0,00	f	A126	1,00	e	A125	0,00	f	A125	1,00	j
A159	0,00	f	A159	1,00	e	A126	0,00	f	A126	1,00	j
A160	0,00	f	A160	1,00	e	A159	0,00	f	A159	1,00	j
A161	0,00	f	A161	1,00	e	A160	0,00	f	A160	1,00	j
A163	0,00	f	A163	1,00	e	A161	0,00	f	A161	1,00	j
A164	0,00	f	A164	1,00	e	A163	0,00	f	A163	1,00	j
A189	0,00	f	A189	1,00	e	A164	0,00	f	A164	1,00	j
A190	0,00	f	A190	1,00	e	A189	0,00	f	A189	1,00	j
A191	0,00	f	A191	1,00	e	A190	0,00	f	A190	1,00	j

Continua...

Continuação da Tabela 10.

Linhagem	48 horas				72 horas						
	DH médio (mm)	Linhagem	IS	Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS				
A225	0,00	f	A225	1,00	e	A191	0,00	f	A191	1,00	j
A226	0,00	f	A226	1,00	e	A225	0,00	f	A225	1,00	j
A236	0,00	f	A236	1,00	e	A226	0,00	f	A226	1,00	j
A237	0,00	f	A237	1,00	e	A236	0,00	f	A236	1,00	j
A259	0,00	f	A259	1,00	e	A237	0,00	f	A237	1,00	j
A302	0,00	f	A302	1,00	e	A259	0,00	f	A259	1,00	j
A314	0,00	f	A314	1,00	e	A302	0,00	f	A302	1,00	j
A315	0,00	f	A315	1,00	e	A314	0,00	f	A314	1,00	j
A318	0,00	f	A318	1,00	e	A315	0,00	f	A315	1,00	j
A328	0,00	f	A328	1,00	e	A318	0,00	f	A318	1,00	j
A330	0,00	f	A330	1,00	e	A328	0,00	f	A328	1,00	j
A331	0,00	f	A331	1,00	e	A331	0,00	f	A331	1,00	j
A332	0,00	f	A332	1,00	e	A332	0,00	f	A332	1,00	j
A333	0,00	f	A333	1,00	e	A333	0,00	f	A333	1,00	j
A334	0,00	f	A334	1,00	e	A334	0,00	f	A334	1,00	j
A335	0,00	f	A335	1,00	e	A335	0,00	f	A335	1,00	j
A338	0,00	f	A338	1,00	e	A338	0,00	f	A338	1,00	j
A355	0,00	f	A355	1,00	e	A355	0,00	f	A355	1,00	j
A372	0,00	f	A372	1,00	e	A372	0,00	f	A372	1,00	j
A373	0,00	f	A373	1,00	e	A373	0,00	f	A373	1,00	j
A424	0,00	f	A424	1,00	e	A424	0,00	f	A424	1,00	j
A447	0,00	f	A447	1,00	e	A447	0,00	f	A447	1,00	j
A499	0,00	f	A499	1,00	e	A499	0,00	f	A499	1,00	j

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

As linhagens de *Periconia macrospinoso* que solubilizaram fosfato podem ainda ser classificadas como precoces, cujo início da solubilização se dá até 72 horas (HARA; OLIVEIRA, 2004). Os resultados obtidos corroboram com Farias et al. (2016) de que a espécie *Periconia macrospinoso* FUN502A isolada de *Anacardium othonianum* Rizzini apresentou elevado potencial de solubilização de fosfato de cálcio em meio GYP (glicose, extrato de levedura e peptona).

A solubilização obtida em meio PVK na presente pesquisa pode ser relacionada ao uso de glicose como fonte de carbono, pois Barroso; Nahas (2008) ao estudarem solubilização de fosfato de ferro por isolados de *Aspergillus niger* com diferentes fontes de carbono acrescidas ao meio, verificaram maior eficiência de solubilização do fosfato onde a fonte foi glicose. Há outros relatos de que a fonte de carbono utilizada nos testes de solubilização de fosfatos *in vitro* influencia a atividade solubilizadora de algumas bactérias e fungos (SILVA FILHO; VIDOR, 2000; TORRES-JÚNIOR et al., 2014). As diferentes fontes nitrogênio usadas no meio podem também interferir na capacidade de solubilização de fosfato. Por exemplo, ácido glutâmico causa maiores estímulos ao *Aspergillus niger* solubilizar fosfato de ferro (BARROSO; NAHAS, 2008).

No experimento com as linhagens de *Trichoderma* spp., a testemunha positiva da solubilização *A. niger*, apresentou tanto às 48 horas da inoculação, quanto às 72 horas, o maior

halo translúcido, superior a todas as linhagens de *Trichoderma* spp. e conseqüentemente o maior índice de solubilização (Tabela 11). O desempenho de *A. niger* no meio PVK neste experimento foi similar ao obtido no experimento com as linhagens de *Periconia macrospinoso* (Tabela 10), mostrando consistência dos dados. Entretanto, o desempenho de solubilização desta testemunha foi bem superior aos das linhagens de *Trichoderma* spp. Isto pode ser explicado pelo fato de que *A. niger* produz ácidos orgânicos que são altamente ionizáveis e pode causar a solubilização do fosfato de cálcio (PRADHAN; SUKLA, 2005). Estudos realizados por Yasser et al. (2014) e Seshadri et al. (2004) também mostraram que *A. niger* solubiliza grandes quantidades de fosfato de cálcio. Hefnawy et al. (2009) mostraram que *A. niger* formou um diâmetro de halo mais amplo em Ágar Pikovskaya suplementado com fosfato de cálcio do que *A. flavus* e *A. fumigatus*.

As 48 horas da inoculação, apenas duas linhagens de *Trichoderma* spp. apresentaram halo de solubilização, sendo elas A501 (IS=1,61) que apresentou o maior índice de solubilização, pouco inferior a testemunha *A. niger* (IS=1,81) e seguida pela linhagem A406 (IS=1,17) apresentando baixa atividade solubilizadora no fosfato de cálcio, com um IS muito próximo a 1, ou seja, no limite da colônia (Tabela 11).

Após a incubação de 72 horas, 12 linhagens de *Trichoderma* spp. promoveram halo translúcido de solubilização (de um total de 58 linhagens – 20%), sendo elas A169, A263, A319, A399, A401, A406, A412, A426, A501, A511, A513, A514. Destas, a linhagem A169 (IS=1,96) não diferiu o índice de solubilização da testemunha *A. niger* (IS=2,03), sendo mais eficiente na solubilização que as demais *Trichoderma* spp. A linhagem A513 (IS=1,70) é de *T. harzianum* e foi a segunda mais eficiente superando as demais, corroborando o relato de que cepas de *T. harzianum* tem capacidade de solubilização (ALORI et al., 2017). As linhagens com menor índice de solubilização foram A511 (IS=1,15), A514 (IS=1,12) e A426 (IS=1,09) bem abaixo do (IS) do controle *A. niger*, sendo que essa última não apresentou solubilização diferente das que não apresentaram halo (Tabela 11). Os IS de fosfato encontrados neste trabalho (1,17-1,96), no meio de PVK ágar, estão na faixa observada para fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* isolados a partir de rizosfera de *Cicer arietinum* (YADAV et al., 2011).

Tabela 11. Diâmetro médio do halo de solubilização (DH) e índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio de diferentes linhagens de *Trichoderma* spp., após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK). Médias em ordem decrescente.

48 horas				72 horas			
Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS	Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS
<i>A. niger</i>	26,21 a	<i>A. niger</i>	1,81 a	<i>A. niger</i>	44,08 a	<i>A. niger</i>	2,03 a
A501	12,28 b	A501	1,61 b	A501	15,78 b	A169	1,96 a
A406	1,45 c	A406	1,17 c	A401	12,76 c	A513	1,70 b
A135	0,00 c	A135	1,00 d	A406	12,40 c	A406	1,29 c
A149	0,00 c	A149	1,00 d	A399	12,16 c	A501	1,27 c
A167	0,00 c	A167	1,00 d	A412	11,77 c	A399	1,24 c
A168	0,00 c	A168	1,00 d	A511	11,52 c	A319	1,22 c
A169	0,00 c	A169	1,00 d	A319	10,92 d	A412	1,21 c
A193	0,00 c	A193	1,00 d	A263	10,86 d	A263	1,21 c
A196	0,00 c	A196	1,00 d	A169	10,55 d	A401	1,20 c
A229	0,00 c	A229	1,00 d	A513	10,45 d	A511	1,15 d
A240	0,00 c	A240	1,00 d	A514	8,34 e	A514	1,12 d

Continua...

Continuação da Tabela 11.

48 horas				72 horas			
Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS	Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS
A247	0,00 c	A247	1,00 d	A426	4,15 f	A426	1,09 e
A263	0,00 c	A263	1,00 d	A135	0,00 g	A135	1,00 e
A282	0,00 c	A282	1,00 d	A149	0,00 g	A149	1,00 e
A306	0,00 c	A306	1,00 d	A167	0,00 g	A167	1,00 e
A307	0,00 c	A307	1,00 d	A168	0,00 g	A168	1,00 e
A308	0,00 c	A308	1,00 d	A193	0,00 g	A193	1,00 e
A319	0,00 c	A319	1,00 d	A196	0,00 g	A196	1,00 e
A320	0,00 c	A320	1,00 d	A229	0,00 g	A229	1,00 e
A341	0,00 c	A341	1,00 d	A240	0,00 g	A240	1,00 e
A342	0,00 c	A342	1,00 d	A247	0,00 g	A247	1,00 e
A357	0,00 c	A357	1,00 d	A282	0,00 g	A282	1,00 e
A358	0,00 c	A358	1,00 d	A306	0,00 g	A306	1,00 e
A359	0,00 c	A359	1,00 d	A307	0,00 g	A307	1,00 e
A360	0,00 c	A360	1,00 d	A308	0,00 g	A308	1,00 e
A361	0,00 c	A361	1,00 d	A320	0,00 g	A320	1,00 e
A377	0,00 c	A377	1,00 d	A341	0,00 g	A341	1,00 e
A399	0,00 c	A399	1,00 d	A342	0,00 g	A342	1,00 e
A400	0,00 c	A400	1,00 d	A357	0,00 g	A357	1,00 e
A401	0,00 c	A401	1,00 d	A358	0,00 g	A358	1,00 e
A402	0,00 c	A402	1,00 d	A359	0,00 g	A359	1,00 e
A403	0,00 c	A403	1,00 d	A360	0,00 g	A360	1,00 e
A404	0,00 c	A404	1,00 d	A361	0,00 g	A361	1,00 e
A405	0,00 c	A405	1,00 d	A377	0,00 g	A377	1,00 e
A407	0,00 c	A407	1,00 d	A400	0,00 g	A400	1,00 e
A408	0,00 c	A408	1,00 d	A402	0,00 g	A402	1,00 e
A409	0,00 c	A409	1,00 d	A403	0,00 g	A403	1,00 e
A410	0,00 c	A410	1,00 d	A404	0,00 g	A404	1,00 e
A411	0,00 c	A411	1,00 d	A405	0,00 g	A405	1,00 e
A412	0,00 c	A412	1,00 d	A407	0,00 g	A407	1,00 e
A426	0,00 c	A426	1,00 d	A408	0,00 g	A408	1,00 e
A458	0,00 c	A458	1,00 d	A409	0,00 g	A409	1,00 e
A459	0,00 c	A459	1,00 d	A410	0,00 g	A410	1,00 e
A461	0,00 c	A461	1,00 d	A411	0,00 g	A411	1,00 e
A466	0,00 c	A466	1,00 d	A458	0,00 g	A458	1,00 e
A467	0,00 c	A467	1,00 d	A459	0,00 g	A459	1,00 e
A468	0,00 c	A468	1,00 d	A461	0,00 g	A461	1,00 e
A480	0,00 c	A480	1,00 d	A466	0,00 g	A466	1,00 e
A481	0,00 c	A481	1,00 d	A467	0,00 g	A467	1,00 e

Continua...

Continuação da Tabela 11.

48 horas				72 horas			
Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS	Linhagem	DH médio (mm)	Linhagem	IS
A482	0,00 c	A482	1,00 d	A468	0,00 g	A468	1,00 e
A483	0,00 c	A483	1,00 d	A480	0,00 g	A480	1,00 e
A508	0,00 c	A508	1,00 d	A481	0,00 g	A481	1,00 e
A509	0,00 c	A509	1,00 d	A482	0,00 g	A482	1,00 e
A511	0,00 c	A511	1,00 d	A483	0,00 g	A483	1,00 e
A512	0,00 c	A512	1,00 d	A508	0,00 g	A508	1,00 e
A513	0,00 c	A513	1,00 d	A509	0,00 g	A509	1,00 e
A514	0,00 c	A514	1,00 d	A512	0,00 g	A512	1,00 e
A515	0,00 c	A515	1,00 d	A515	0,00 g	A515	1,00 e

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

O IS de linhagens fúngicas pode variar de acordo com o local do qual os linhagens são isoladas, como também das espécies vegetais que mantinham associação, como foi observado por Mahamuni et al. (2012) que obtiveram IS para diferentes cepas de fungos isolados da cana-de-açúcar e da beterraba sacarina que variaram de 1,13 a 1,59. Outro estudo com fungos isolados da rizosfera do milho relataram IS que variou de 1,53 a 1,80 (ALAM et al., 2002).

A presente pesquisa corrobora com Carvajal et al. (2009) que relataram o potencial solubilizador de fosfato de 20% dos 101 isolados de *Trichoderma* spp. por eles avaliados. Da sustentação também aos resultados de Badawi et al. (2011) que observaram que *Trichoderma harzianum* possui maior habilidade de solubilizar fosfatos, em comparação com *Bradyrhizobium* spp. e *Serratia marscescens*.

A seleção de fungos endófitos promissores na solubilização de fosfato é importante na busca de estratégia que auxiliem no uso eficiente do fosfato no solo, afinal cerca de 15 milhões de toneladas de fertilizantes fosfatados são aplicados em todo o mundo todos os anos, dos quais aproximadamente 80% são fixados em formas insolúveis no solo (GYANESHWAR et al., 2002). O fósforo solúvel aplicado ao solo em geral é rapidamente transformado em formas insolúveis principalmente pela ligação com íons metálicos, como cálcio, alumínio e ferro (SATI; PANT, 2018).

4.2 Solubilização de Fosfato de Alumínio

Um total de 115 linhagens de fungos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar, sendo 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* e 58 linhagens de *Trichoderma* spp. foram avaliadas quanto ao crescimento micelial e formação de halo translúcido de solubilização em meio PVK acrescido de $AlPO_4$ e $CaCl_2$ com ajuste para pH 5,0. Deste total, apenas uma linhagem de *Trichoderma harzianum* (A358) apresentou halo de solubilização, apresentando um índice de solubilização (IS = 2,01) superior ao da testemunha positiva de *A. niger* (IS=2,00) (Tabela 12 e Tabela 13).

Tabela 12. Diâmetro médio da colônia (DM), velocidade de crescimento (VC), diâmetro médio do halo de solubilização (DH) e índice de solubilização (IS) de fosfato de alumínio de diferentes linhagens de *Periconia macrospinosa* após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK). Médias em ordem decrescente.

48 horas				72 horas					
Linh.	DM (mm)	Linh.	DM (mm)	Linh.	VC (mm.dia ⁻¹)	Linh.	DH médio (mm)	Linh.	IS
A163	17,08 a	A163	20,33 a	<i>A. niger</i>	4,56 a	<i>A. niger</i>	18,78 a	<i>A. niger</i>	2,00 a
A335	16,28 a	A335	19,37 a	A163	3,25 b	A327	0,00 b	A327	1,00 b
A334	15,86 a	A334	18,87 a	A335	3,10 b	A318	0,00 b	A318	1,00 b
A333	15,83 a	A333	18,84 a	A334	3,01 b	A317	0,00 b	A317	1,00 b
A315	15,37 a	<i>A. niger</i>	18,75 a	A333	3,01 b	A328	0,00 b	A328	1,00 b
A332	15,17 a	A315	18,28 a	A315	2,92 b	A331	0,00 b	A331	1,00 b
<i>A. niger</i>	14,19 b	A332	18,05 a	A332	2,88 b	A330	0,00 b	A330	1,00 b
A260	13,94 b	A260	16,59 b	A260	2,65 c	A329	0,00 b	A329	1,00 b
A159	13,74 c	A159	16,35 b	A159	2,61 c	A260	0,00 b	A260	1,00 b
A499	13,32 c	A161	15,39 b	A161	2,46 c	A259	0,00 b	A259	1,00 b
A161	12,93 c	A158	14,97 c	A158	2,39 c	A258	0,00 b	A258	1,00 b
A158	12,58 c	A328	14,93 c	A328	2,39 c	A302	0,00 b	A302	1,00 b
A328	12,54 c	A338	14,73 c	A338	2,35 c	A316	0,00 b	A316	1,00 b
A338	12,38 c	A189	14,55 c	A189	2,33 c	A315	0,00 b	A315	1,00 b
A189	12,23 c	A499	14,52 c	A160	2,32 c	A314	0,00 b	A314	1,00 b
A160	12,20 c	A160	14,52 c	A156	2,30 c	A332	0,00 b	A332	1,00 b
A156	12,08 c	A156	14,37 c	A329	2,29 c	A373	0,00 b	A373	1,00 b
A329	12,04 c	A329	14,33 c	A327	2,28 c	A372	0,00 b	A372	1,00 b
A327	11,98 c	A327	14,26 c	A155	2,28 c	A356	0,00 b	A356	1,00 b
A155	11,96 c	A155	14,24 c	A318	2,27 c	A423	0,00 b	A423	1,00 b
A318	11,91 c	A318	14,17 c	A302	2,25 c	A499	0,00 b	A499	1,00 b
A302	11,79 c	A302	14,04 c	A317	2,24 c	A447	0,00 b	A447	1,00 b
A317	11,75 c	A317	13,98 c	A314	2,23 c	A424	0,00 b	A424	1,00 b
A314	11,69 c	A314	13,91 c	A157	2,21 c	A335	0,00 b	A335	1,00 b
A157	11,61 c	A157	13,82 c	A224	2,19 c	A334	0,00 b	A334	1,00 b
A224	11,50 c	A224	13,69 c	A258	2,15 c	A333	0,00 b	A333	1,00 b
A258	11,28 d	A258	13,42 d	A154	2,14 c	A336	0,00 b	A336	1,00 b
A154	11,22 d	A154	13,36 d	A238	2,13 c	A355	0,00 b	A355	1,00 b
A238	11,16 d	A238	13,28 d	A423	2,08 d	A338	0,00 b	A338	1,00 b
A424	11,02 d	A226	12,86 d	A226	2,06 d	A337	0,00 b	A337	1,00 b
A226	10,80 d	A191	12,55 d	A191	2,01 d	A157	0,00 b	A157	1,00 b
A191	10,55 d	A257	12,49 d	A257	2,00 d	A156	0,00 b	A156	1,00 b
A257	10,50 d	A424	12,45 d	A190	1,97 d	A155	0,00 b	A155	1,00 b
A190	10,37 d	A190	12,34 d	A259	1,96 d	A158	0,00 b	A158	1,00 b
A259	10,31 d	A423	12,32 d	A372	1,94 d	A161	0,00 b	A161	1,00 b
A423	10,25 d	A259	12,28 d	A113	1,87 d	A160	0,00 b	A160	1,00 b
A372	10,20 d	A372	12,14 d	A330	1,84 d	A159	0,00 b	A159	1,00 b
A447	9,90 d	A113	11,67 d	A356	1,80 e	A115	0,00 b	A115	1,00 b
A113	9,80 d	A330	11,52 d	A225	1,79 e	A113	0,00 b	A113	1,00 b
A330	9,68 d	A356	11,25 e	A115	1,76 e	A111	0,00 b	A111	1,00 b
A373	9,45 e	A225	11,16 e	A125	1,73 e	A124	0,00 b	A124	1,00 b
A356	9,45 e	A115	11,01 e	A111	1,71 e	A154	0,00 b	A154	1,00 b
A225	9,38 e	A125	10,82 e	A124	1,71 e	A126	0,00 b	A126	1,00 b
A115	9,25 e	A447	10,79 e	A336	1,70 e	A125	0,00 b	A125	1,00 b
A125	9,10 e	A111	10,71 e	A331	1,69 e	A235	0,00 b	A235	1,00 b
A111	9,00 e	A124	10,66 e	A126	1,68 e	A226	0,00 b	A226	1,00 b
A124	8,95 e	A331	10,62 e	A236	1,66 e	A225	0,00 b	A225	1,00 b

Continua...

Continuação da Tabela 12.

48 horas				72 horas					
Linh.	DM (mm)	Linh.	DM (mm)	Linh.	VC (mm.dia ⁻¹)	Linh.	DH médio (mm)	Linh.	IS
A331	8,92 e	A336	10,60 e	A237	1,65 e	A236	0,00 b	A236	1,00 b
A336	8,91 e	A126	10,56 e	A162	1,59 e	A257	0,00 b	A257	1,00 b
A126	8,88 e	A236	10,37 e	A164	1,55 e	A238	0,00 b	A238	1,00 b
A236	8,72 e	A237	10,34 e	A235	1,53 e	A237	0,00 b	A237	1,00 b
A316	8,69 e	A373	10,10 e	A337	1,52 e	A164	0,00 b	A164	1,00 b
A237	8,69 e	A162	9,91 e	A355	1,52 e	A163	0,00 b	A163	1,00 b
A162	8,33 e	A316	9,83 e	A424	1,44 e	A162	0,00 b	A162	1,00 b
A164	8,13 e	A164	9,68 e	A499	1,21 f	A189	0,00 b	A189	1,00 b
A235	8,03 e	A235	9,56 e	A316	1,15 f	A224	0,00 b	A224	1,00 b
A355	8,00 e	A355	9,52 e	A447	0,89 g	A191	0,00 b	A191	1,00 b
A337	8,00 e	A337	9,52 e	A373	0,65 g	A190	0,00 b	A190	1,00 b

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

Nas primeiras 48 horas após a inoculação do experimento, as linhagens A163, A315, A332, A333, A334 e A335 de *Periconia macrospinoso* apresentaram maior diâmetro médio de colônia que a testemunha *A. niger*, a qual não diferiu o crescimento em diâmetro da linhagem A260, configurando *A. niger* e A260 como um segundo grupo de maior crescimento. O teste de Scott Knott 5% separou as linhagens de *P. macrospinoso* formando ainda outros 3 grupos de crescimento, além dos dois já mencionados. O grupo de menor crescimento, ou de crescimento mais lento, foi composto pelas linhagens A111, A124, A125, A126, A162, A164, A225, A235, A236, A237, A316, A331, A336, A337, A355, A356 e A373 (Tabela 12).

Após 72 horas, as colônias mostraram variação na velocidade de crescimento em relação ao observado nas 48 horas. Com essas 24 horas adicionais *A. niger* passa a apresentar o maior diâmetro médio de colônia, mostrando uma velocidade de crescimento superior às linhagens de *Periconia*. Como existe essa variação de velocidade de crescimento no período compreendido entre 48 e 72 horas, ocorre pequena variação na composição dos 5 grupos de crescimento separados pelo teste de Scott Knott 5%. sendo que *A. niger* passa a figurar o grupo de maior crescimento. A159 e A161 passam a figurar no segundo grupo de crescimento, junto com A260. E no grupo de menor crescimento mantiveram-se as linhagens observadas nas 48 horas, com acréscimo da linhagem A447 (Tabela 12).

A testemunha positiva da solubilização *A. niger* não apresentou halo após 48 horas da inoculação, porém após 72 horas este foi observado sendo superior a todas as linhagens de *Periconia macrospinoso*, as quais não foram capazes de produzir halos translúcidos visíveis de solubilização no meio utilizado, que indicasse a capacidade de solubilização do fosfato de alumínio. Embora nenhum isolado de *Periconia macrospinoso* tenha apresentado halo em meio sólido PVK com fosfato de alumínio não se pode afirmar que não teriam a capacidade de solubilização de fosfato de alumínio, pois em literatura há relato de *Periconia macrospinoso* solubilizando fosfato de alumínio em meio líquido, resultando na solubilização de 0,6 mg.L⁻¹ de fosfato de alumínio (FARIA et al., 2016). Situação similar foi considerada por Souchie et al. (2005) quando as respostas de solubilização de AlPO₄ e apatita de Araxá em meio sólido tinham sido quase inexistentes, os autores não consideraram que os isolados utilizados não tinham capacidade de solubilizá-los, pois os mesmos demonstraram capacidade de solubilização dessa fontes de fosfato em meio de cultura líquido.

Além disso, as baixas taxas de solubilização quando os isolados são cultivados em meio de cultura com AlPO₄ podem ser explicadas que, pelo mecanismo mais comum de acidificação do meio, as linhagens poderiam estar promovendo uma maior estabilização do AlPO₄, em vez de o estar solubilizando (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999).

O índice de solubilização de fosfato de alumínio do *A. niger* (IS=2,00), único superior a 1,00, indica sua capacidade de solubilização de fosfato de alumínio mesmo no meio PVK

sólido e ácido, evidenciando uma boa escolha da testemunha positiva de solubilização. A capacidade de solubilização de fosfato de alumínio é relatado principalmente para isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (BANIK; DEY, 1982). Existe uma baixa incidência de microrganismos solubilizadores de fosfatos de cálcio que também solubilizam fosfatos de alumínio ou de ferro (TORO et al., 1996). Existem diferenças na capacidade e no potencial de solubilização dos microrganismos, onde determinado microrganismo pode solubilizar apenas fosfato de cálcio, enquanto outros ainda solubilizam também fosfato de alumínio e fosfato de ferro, e ainda deve ser levado em consideração que os isolados podem solubilizar esses fosfatos em diferentes intensidades (BANIK; DEY, 1982; DOYLE et al., 1990; SOUCHIE et al., 2005).

Tabela 13. Diâmetro médio da colônia (DM), velocidade de crescimento (VC), diâmetro médio do halo de solubilização (DH) e índice de solubilização (IS) de fosfato de alumínio de diferentes linhagens de *Trichoderma* spp. após a incubação por 48 e 72 horas em meio Pikovskaya ágar (PVK). Médias em ordem decrescente.

48 horas				72 horas				Dh médio (mm)	Linh.	IS	
Linh.	DM (mm)	Linh.	VC (mm.dia ⁻¹)	Linh.	DM (mm)	Linh.	VC (mm.dia ⁻¹)				
A402	34,83 a	A402	13,42 a	A514	78,77 a	A514	51,11 a	A358	44,22 a	A358	2,01 a
A461	31,60 b	A461	11,80 b	A515	78,74 a	A515	51,06 a	<i>A. niger</i>	18,78 b	<i>A. niger</i>	2,00 b
A263	31,17 b	A263	11,59 b	A512	69,52 b	A512	45,78 b	A412	0,00 c	A412	1,00 c
A515	27,68 c	A515	9,84 c	A511	69,22 b	A511	45,37 b	A411	0,00 c	A411	1,00 c
A514	27,66 c	A514	9,83 c	A306	68,52 b	A306	44,06 b	A410	0,00 c	A410	1,00 c
A149	27,04 c	A149	9,52 c	A263	66,64 c	A357	42,94 b	A426	0,00 c	A426	1,00 c
A480	26,89 c	A480	9,44 c	A402	63,87 c	A483	41,30 c	A460	0,00 c	A460	1,00 c
A193	26,42 c	A193	9,21 c	A307	63,16 c	A307	40,82 c	A459	0,00 c	A459	1,00 c
A196	26,25 c	A196	9,13 c	A308	63,10 c	A359	40,05 c	A458	0,00 c	A458	1,00 c
A412	25,75 c	A412	8,88 c	A483	63,04 c	A308	38,25 d	A405	0,00 c	A405	1,00 c
A240	25,58 c	A240	8,79 c	A357	62,90 c	A360	36,67 d	A404	0,00 c	A404	1,00 c
A308	24,85 d	A308	8,43 d	A149	61,13 c	A263	35,47 d	A403	0,00 c	A403	1,00 c
A306	24,47 d	A306	8,23 d	A196	60,92 c	A406	35,32 d	A406	0,00 c	A406	1,00 c
A358	24,20 d	A358	8,10 d	A480	60,84 c	A320	35,27 d	A409	0,00 c	A409	1,00 c
A410	24,14 d	A410	8,07 d	A359	60,52 c	A400	35,12 d	A408	0,00 c	A408	1,00 c
A405	23,91 d	A405	7,96 d	A193	60,14 c	A459	35,11 d	A407	0,00 c	A407	1,00 c
A247	23,89 d	A247	7,95 d	A412	58,72 c	A510	35,09 d	A461	0,00 c	A461	1,00 c
A511	23,85 d	A511	7,93 d	A240	58,06 d	A399	34,99 d	A511	0,00 c	A511	1,00 c
A409	23,79 d	A409	7,89 d	A405	56,95 d	A196	34,68 d	A510	0,00 c	A510	1,00 c
A512	23,74 d	A512	7,87 d	A410	56,86 d	A377	34,22 d	A509	0,00 c	A509	1,00 c
A411	23,67 d	A411	7,84 d	A459	56,59 d	A229	34,19 d	A512	0,00 c	A512	1,00 c
A135	23,42 d	A135	7,71 d	A360	56,24 d	A482	34,16 d	A515	0,00 c	A515	1,00 c
A468	22,71 e	A468	7,36 e	A409	56,17 d	A149	34,10 d	A514	0,00 c	A514	1,00 c
A404	22,63 e	A404	7,31 e	A247	56,15 d	A480	33,96 d	A513	0,00 c	A513	1,00 c

Continua...

Continuação da Tabela 13.

48 horas				72 horas							
Linh.	DM (mm)	Linh.	VC (mm.dia ⁻¹)	Linh.	DM (mm)	Linh.	VC (mm.dia ⁻¹)	Linh.	DHmédio (mm)	Linh.	IS
A307	22,35 e	A307	7,17 e	A468	54,57 d	A501	33,89 d	A481	0,00 c	A481	1,00 c
A460	22,15 e	A460	7,08 e	A320	54,40 d	A508	33,73 d	A480	0,00 c	A480	1,00 c
A483	21,75 e	A483	6,87 e	A229	53,89 e	A193	33,73 d	A468	0,00 c	A468	1,00 c
A459	21,49 e	A459	6,74 e	A510	53,86 e	A361	33,72 d	A482	0,00 c	A482	1,00 c
A401	21,23 e	A401	6,62 e	A411	53,81 e	A509	33,32 d	A508	0,00 c	A508	1,00 c
A403	20,74 f	A403	6,37 f	A403	53,17 e	A405	33,04 d	A501	0,00 c	A501	1,00 c
A359	20,47 f	A359	6,24 f	A406	52,90 e	A412	32,97 d	A483	0,00 c	A483	1,00 c
A357	19,96 f	A357	5,98 f	A135	52,34 e	A410	32,73 d	A247	0,00 c	A247	1,00 c
A167	19,81 f	A167	5,91 f	A482	52,30 e	A240	32,48 d	A240	0,00 c	A240	1,00 c
A229	19,70 f	A229	5,85 f	A501	52,29 e	A403	32,43 d	A229	0,00 c	A229	1,00 c
A481	19,65 f	A481	5,83 f	A508	51,89 e	A409	32,38 d	A263	0,00 c	A263	1,00 c
A360	19,57 f	A360	5,78 f	A509	51,85 e	A247	32,26 d	A307	0,00 c	A307	1,00 c
A320	19,13 f	A320	5,57 f	A460	51,77 e	A468	31,86 e	A306	0,00 c	A306	1,00 c
A510	18,77 f	A510	5,39 f	A377	51,53 e	A282	31,41 e	A282	0,00 c	A282	1,00 c
A509	18,54 g	A509	5,27 g	A399	51,23 e	A481	30,69 e	A167	0,00 c	A167	1,00 c
A501	18,40 g	A501	5,20 g	A404	51,20 e	A513	30,17 e	A149	0,00 c	A149	1,00 c
A408	18,39 g	A408	5,19 g	A400	51,12 e	A411	30,14 e	A135	0,00 c	A135	1,00 c
A508	18,16 g	A508	5,08 g	A361	50,96 e	A460	29,62 e	A168	0,00 c	A168	1,00 c
A482	18,14 g	A482	5,07 g	A481	50,34 e	A408	29,38 e	A196	0,00 c	A196	1,00 c
A282	17,74 g	A282	4,87 g	A461	50,26 e	A402	29,04 e	A193	0,00 c	A193	1,00 c
A168	17,62 g	A168	4,81 g	A282	49,15 f	A135	28,93 e	A169	0,00 c	A169	1,00 c
A406	17,59 g	A406	4,79 g	A408	47,77 f	A404	28,58 e	A308	0,00 c	A308	1,00 c
A377	17,31 g	A377	4,66 g	A513	46,47 f	A342	28,39 e	A377	0,00 c	A377	1,00 c
A361	17,24 g	A361	4,62 g	A167	45,11 f	A167	25,30 f	A361	0,00 c	A361	1,00 c
A169	16,72 h	A169	4,36 h	A401	44,42 f	A401	23,19 f	A360	0,00 c	A360	1,00 c
A513	16,30 h	A513	4,15 h	A358	43,91 f	A168	22,95 f	A399	0,00 c	A399	1,00 c
A399	16,24 h	A399	4,12 h	A342	42,81 f	A407	22,65 f	A402	0,00 c	A402	1,00 c
A400	16,01 h	A400	4,00 h	A168	40,58 g	A341	21,60 g	A401	0,00 c	A401	1,00 c
A407	14,69 i	A407	3,35 i	A407	37,34 g	A169	20,06 g	A400	0,00 c	A400	1,00 c
A342	14,42 i	A342	3,21 i	A169	36,77 g	A358	19,71 g	A341	0,00 c	A341	1,00 c
<i>A. niger</i>	14,19 i	<i>A. niger</i>	3,10 i	A341	31,78 h	A461	18,66 h	A320	0,00 c	A320	1,00 c
A319	12,16 j	A319	2,08 j	A426	23,97 i	A458	15,65 i	A319	0,00 c	A319	1,00 c
A341	10,19 k	A341	1,09 k	A458	23,77 i	A426	14,18 i	A342	0,00 c	A342	1,00 c
A426	9,79 k	A426	0,90 k	<i>A. niger</i>	18,75 j	<i>A. niger</i>	4,56 j	A359	0,00 c	A359	1,00 c
A458	8,12 k	A458	0,06 k	A319	12,28 k	A319	0,12 k	A357	0,00 c	A357	1,00 c

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

Em relação ao experimento com as linhagens de *Trichoderma* spp., observou-se que nas primeiras 48 horas o isolado A402 apresentou maior diâmetro médio e a maior velocidade de crescimento que todos os demais tratamentos de linhagens. Já após 72 horas, as linhagens A514 e A515 é que apresentavam o maior crescimento e a maior velocidade de crescimento que os demais tratamentos. O isolado A402 desceu para o terceiro grupo de maior diâmetro médio. O

teste de Scott Knott 5% separou as linhagens em 11 grupos de crescimento em diâmetro médio e velocidade de crescimento da colônia, tanto as 48 horas, quanto as 72 horas. Os dois últimos grupos de menor diâmetro e de crescimento mais lento foram compostos pelas linhagens A319, A341, A426 e A458 as 48 horas e pelas linhagens *A. niger* e A319 as 72 horas. Isso indica um crescimento lento de *A. niger* no meio PVK + AlPO_4 + CaCl_2 , pH 5,0, quando comparado à maioria das linhagens de *Trichoderma* spp. Esse comportamento foi contrário ao sugerido por Silva Filho; Vidor (2000) que relatam que a solubilização de P pelos fungos tendem a favorecer as espécies que têm alta agressividade de crescimento, ou seja, fungos com maior velocidade de crescimento. O bom crescimento das linhagens de *Trichoderma* spp. no meio PVK+ AlPO_4 + CaCl_2 , pH 5,0 é corroborado pelo observado com o isolado FSA378a de *Trichoderma harzianum*, que apresentou diâmetro médio de 50,67 cm em meio PVK, após 7 dias de inoculação (GOMEZJURADO, 2011).

Considerando o P um elemento essencial a vida (KEYSER; MUNNS, 1979), o crescimento elevado das linhagens de *Trichoderma* spp. nesse meio pode ser apenas explicado por uma capacidade de utilização do fósforo do fosfato de alumínio, ou por uma exigência muito baixa de fósforo, suprimindo a necessidade dos fungos pelos possíveis resíduos de P disponíveis na glicose, no ágar do meio PVK, no disco de meio MEA inoculado ou ainda nas reservas do micélio inoculado.

A testemunha positiva da solubilização *A. niger* não apresentou halo às 48 horas da inoculação, mas apresentou às 72 horas com $\text{IS}=2,00$, superado apenas pela linhagem A358 de *Trichoderma harzianum*, que foi a única linhagem endofítica de cana-de-açúcar a solubilizar fosfato de alumínio. Isso reforça a observação de Banik; Dey (1982) que os isolados de *Aspergillus niger* solubilizaram quantidades maiores de fosfato de cálcio do que de fosfato de alumínio.

O isolado de A358 (*Trichoderma harzianum*), que solubilizou o fosfato de alumínio (Tabela 13), não solubilizou o fosfato de cálcio (Tabela 11). Isto pode indicar que essa linhagem tem capacidade de produzir bases orgânicas, que solubilizariam o fosfato de alumínio por elevação do pH, o que precisaria ser comprovado com estudos posteriores. Vários mecanismos já foram detectados entre muitos microrganismos para conversão de P insolúvel em uma forma disponível (REYES et al., 2002). A zona clara ou halo translúcido formado devido a solubilização de fosfatos insolúveis em geral é associada a acidificação do meio pela extrusão de prótons ou secreção de ácidos orgânicos (BARDIYA; GAUR 1974; DARMAL et al., 1989). Os microrganismos liberam ácidos orgânicos como o cítrico, oxálico, málico, succínico e fumárico, fornecendo íons de H^+ e um ânion complexador de metal, mediando a liberação de fosfato e espécies de metal de fontes insolúveis (GADD 1999; BAKRI, 2019). Segundo Ayer; Gadd (1997) certos fungos são capazes de imobilizar e liberar P apenas pela complexação e precipitação de metal insolúvel. Há relatos de maior atividade de fosfatases alcalina por cepas bacterianas solubilizadoras de fosfato de alumínio, e de maior atividade de fosfatases ácidas por linhagens de fungos, onde a relação atividade das fosfatases foi proporcional a quantidade de fosfato de alumínio solubilizado (OLIVEIRA et al., 2008).

Essa diversidade das linhagens de *Trichoderma* spp. pode ser atribuída ao isolamento que não foi baseado na capacidade de solubilização de fosfato de cálcio, e sim um isolamento para recuperar a máxima diversidade de fungos endofíticos das raízes da cana-de-açúcar (FORS, 2020). Em trabalhos com microrganismos solubilizadores, em geral o isolamento das linhagens é feito a partir do crescimento e formação do halo de solubilização em meio de cultura com fosfato de cálcio (WANG et al., 2020), e posteriormente esses isolados são testados nos fosfatos de alumínio e de ferro. Essa ordenação nos procedimentos de isolamento pode levar à seletividade de microrganismos capazes de solubilizar fosfato de cálcio em desfavor daqueles capazes de solubilizar fosfato de alumínio e de ferro (SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

Vitorino et al. (2012) estudando fungos endofíticos de *Hyptis marrubioides* Epling (Lamiaceae) sem a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, mas que solubilizavam fosfato de alumínio, sugeriram que as plantas nativas do Cerrado, adaptadas a solos ácidos, nos quais o P encontra-se complexado com ferro e alumínio, podem ser as responsáveis por esta característica funcional de seus fungos endofíticos, de solubilizar fosfato de ferro ou de alumínio.

Corroborando com o presente estudo, há outros relatos que em um mesmo gênero existam indivíduos com resultado inverso quanto a solubilização de fosfato de alumínio e de cálcio, como os de Souchie et al. (2005) com fosfato de alumínio e apatita, e também com diferenças entre linhagens dentro da mesma espécie, como *Aspergillus niger* e *Penicillium simplicissim* (CARVALHO et al., 1969; ILLMER; SCHINNER, 1995).

Das 32 linhagens, entre as 113 linhagens de endofíticos de cana-de-açúcar testadas no presente estudo, que tinham capacidade de promover halo translúcido de solubilização em fosfato cálcio (Tabela 9) caiu o número para apenas 1 linhagem com capacidade de solubilizar fosfato de alumínio (Tabelas 12 e 13). Essa redução em número, refletindo ser uma característica mais rara, é corroborada pelo estudo de Silva Filho; Vidor (2000), onde a maioria (56 isolados) dos isolados de *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Penicillium* formaram halo de solubilização com fosfato de cálcio, apenas cinco isolados formaram halo com fosfato de alumínio e nenhum foi capaz de solubilizar fosfato de ferro.

Vários pesquisadores relataram que isolados que não produziram nenhum halo de solubilização visível em placas de ágar acabaram solubilizando várias formas de fósforo insolúvel em meios líquidos (SOUCHIE et al, 2005; VITORINO et al., 2012). Souchie et al. (2005) mostram que a não-solubilização de $AlPO_4$ em meio GL sólido se deve mais ao estado físico do meio ou à sua distinta composição em relação ao meio líquido, do que à incapacidade dos isolados de solubilizar esse fosfato. Os autores sugerem que a inclusão de outros fosfatos de menor solubilidade no meio sólido pode exigir uma maior capacidade de solubilização dos fungos e bactérias solubilizadores de fosfato (SOUCHIE et al., 2005).

4.3 Experimento de Tolerância a Metais

Para os experimentos de tolerância ao excesso de cádmio, cobre e zinco, foram adotados três concentrações de cada metal que variaram de acordo com o metal usado e a capacidade dos gêneros em crescer no meio acrescido de metal. As tabelas iniciais são de caracterização do diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC), das diferentes linhagens de *Periconia macrospinoso* e em seguida *Trichoderma*, após crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com concentrações partindo do zero ao mais alto nível tolerado do metal. Seguidas das tabelas do índice de tolerância das linhagens de *Periconia macrospinoso* e em seguida *Trichoderma*, com a classificação de sua tolerância ao metal, ao fim das tabelas, de acordo com as classes propostas por Oladipo et al. (2018).

Não foi apresentado os valores de velocidade de crescimento das colônias, pois na primeira estimativa da velocidade de crescimento da colônia refletiu exatamente o comportamento do diâmetro médio da colônia, inclusive com o teste de Scott Knott separando os mesmos grupos de crescimento. Fato esse atribuído às colônias iniciarem todas com o mesmo diâmetro de 8 mm do disco de colônia inoculado.

Como a velocidade de crescimento da colônia é uma variável importante, servindo para a comparação entre trabalhos de diferentes autores, ou entre diferentes experimentos, ela não foi omitida do presente trabalho e o leitor poderá verificar seus valores nos diferentes experimentos de excesso de poluentes na tabela 30 para *Periconia macrospinoso* e na tabela 31 para *Trichoderma* spp..

4.3.1 Tolerância ao excesso de cádmio

Foram estudadas quanto a tolerância ao excesso de cádmio 114 linhagens de fungos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar, sendo 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* e 57 linhagens de *Trichoderma* spp., utilizando o meio Extrato de Malte Ágar (MEA) com ajuste para pH 6,0 e três níveis de cádmio.

O crescimento das colônias das 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* nos três níveis de cádmio é apresentado na tabela 14. Ao observar o controle sem cádmio (dose 0) a linhagem A331 apresentou o maior diâmetro médio e maior velocidade de crescimento da colônia que as demais linhagens de *Periconia macrospinoso*. Na superfície de colônia além da linhagem A331, destaca-se também a linhagem A335, onde ambas foram superiores em relação as demais linhagens. Entretanto, na presença de cádmio (doses 400 e 500 mg L⁻¹), essas duas linhagens de maior crescimento na dose 0 ficam no grupo de menor crescimento, marcado com a letra 'g' no teste de Scott Knott 5%. Portanto, as linhagens de maior crescimento de *Periconia macrospinoso* estão entre as mais sensíveis ao cádmio.

Na dosagem com 400 mg.L⁻¹ de cádmio, a linhagem A226 apresentou o maior diâmetro, velocidade de crescimento e superfície de colônia em relação a todas as outras. Essa linhagem foi seguida por um segundo grupo de crescimento separado pelo teste de Scott Knott, composto pelas linhagens A423 e A332 no diâmetro e velocidade de crescimento da colônia. Esse segundo grupo foi ampliado com as linhagens A158 e A160 analisando a superfície de colônia. O grupo de menor crescimento nesta dosagem de cádmio foi composto pelas linhagens A331, A335 e A329.

Na dose de 500 mg L⁻¹ as três variáveis de crescimento analisadas coincidiram na separação dos grupos de crescimento, sendo que as linhagens do grupo de maior crescimento foram A226, A332, A157 e A423. O segundo grupo de crescimento foi composto pelas linhagens A328, A158, A161 e A160. O grupo de menor crescimento, tal como na dose 400, foi composto pelas linhagens A335, A329, A331.

Nas dosagens de 400 e 500 mg L⁻¹ o teste de Scott Knott a 5% separou as linhagens em 7 grupos de crescimento, mostrando grande variabilidade de tolerância ao cádmio das linhagens de *Periconia macrospinoso*. As linhagens dos dois grupos de maior crescimento em meio acrescido de cádmio, em ambas as concentrações, apresentaram diâmetro da colônia, acima de 60% do seu crescimento no controle sem cádmio. Logo são fungos que conseguem se desenvolver em ambientes com elevadas concentrações desse metal.

As elevações nos teores de cádmio nos solos agrícolas pode ser atreladas a vários fatores, entre eles, o uso de rochas fosfatadas, as quais são matéria prima para produção de fertilizantes fosfatados, e possuem diferentes concentrações de metais tóxicos e radionuclídeos (GUPTA et al., 2018). O processamento deste minério aumenta no produto final as concentrações de metais tóxicos, e conseqüentemente aumentam a concentração no solo com a aplicação dos fertilizantes (KHATER, 2008). Metais tóxicos, como cádmio (Cd), quando presentes no solo, são absorvidos pelas plantas e podem ingressar na cadeia alimentar e acarretar problemas à saúde (MORTVEDT; BEATON, 1995).

Em solos contaminados, a fitorremediação assistida por microrganismos tem sido considerada a tecnologia mais promissora para a melhora da condição edáfica (ASHRAF et al., 2017; DENG; CAO, 2017). Desse modo, é importante selecionar linhagens de fungos simbiontes de plantas, que toleram níveis elevados de metais, e que possam ser utilizados em estratégias de fitorremediação de solos de ecossistemas contaminados.

Tabela 14. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de *Periconia macrospinoso* após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 400 e 500 mg.L⁻¹ de cádmio. Médias em ordem decrescente.

DM (mm)						SC (cm ²)					
Linh.	0	Linh.	400	Linh.	500	Linh.	0	Linh.	400	Linh.	500
A331	51,8 a	A226	36,2 a	A226	32,6 a	A331	20,8 a	A226	10,3 a	A226	8,4 a
A335	47,6 b	A423	32,4 b	A332	31,1 a	A335	20,3 a	A423	8,2 b	A332	7,6 a
A226	45,5 b	A332	31,9 b	A157	31,0 a	A226	16,2 b	A332	8,0 b	A157	7,5 a
A318	44,8 b	A158	29,8 c	A423	29,8 a	A318	15,8 b	A158	7,0 b	A423	7,0 a
A237	44,1 b	A160	29,5 c	A328	27,2 b	A237	15,3 b	A160	6,8 b	A328	5,8 b
A157	44,0 b	A161	28,6 c	A158	26,8 b	A157	15,2 b	A161	6,4 c	A158	5,6 b
A160	42,6 c	A328	28,5 c	A161	26,4 b	A160	14,3 b	A328	6,4 c	A161	5,5 b
A424	42,4 c	A159	28,0 c	A160	26,1 b	A424	14,1 b	A159	6,2 c	A160	5,4 b
A330	42,1 c	A355	28,0 c	A318	25,4 c	A330	14,0 b	A355	6,1 c	A318	5,1 b
A154	42,1 c	A318	27,5 c	A355	25,2 c	A154	13,9 b	A318	5,9 c	A355	5,0 b
A314	42,0 c	A164	27,4 c	A424	24,9 c	A314	13,8 b	A164	5,9 c	A424	4,9 b
A328	41,9 c	A157	26,8 c	A447	24,8 c	A328	13,8 b	A157	5,6 c	A447	4,8 b
A156	41,9 c	A314	26,6 c	A159	24,8 c	A156	13,8 b	A314	5,5 c	A159	4,8 b
A332	41,6 c	A156	26,4 c	A191	24,2 c	A329	13,5 c	A156	5,5 c	A191	4,6 b
A191	41,5 c	A162	26,1 d	A336	24,1 c	A332	13,5 c	A162	5,3 c	A336	4,6 b
A238	41,3 c	A237	26,0 d	A162	24,0 c	A191	13,5 c	A237	5,3 c	A162	4,5 b
A315	41,3 c	A155	25,7 d	A237	23,8 c	A315	13,4 c	A155	5,2 c	A237	4,5 b
A447	41,2 c	A424	25,3 d	A337	23,5 c	A238	13,4 c	A424	5,0 c	A327	4,4 b
A329	41,0 c	A336	25,1 d	A238	23,2 c	A447	13,3 c	A330	5,0 c	A337	4,3 b
A317	40,9 c	A330	24,8 d	A327	23,0 c	A317	13,2 c	A336	4,9 c	A238	4,2 b
A158	40,8 c	A337	24,3 d	A314	22,6 d	A158	13,1 c	A327	4,7 c	A314	4,0 c
A302	40,5 c	A259	24,3 d	A259	22,4 d	A302	12,9 c	A337	4,7 c	A259	3,9 c
A159	39,7 d	A327	23,9 d	A156	22,1 d	A159	12,4 c	A259	4,6 c	A156	3,8 c
A316	39,7 d	A315	23,6 d	A225	22,0 d	A316	12,4 c	A447	4,4 c	A225	3,8 c
A423	39,5 d	A373	23,5 d	A190	21,8 d	A423	12,3 c	A315	4,4 c	A190	3,7 c
A327	39,4 d	A447	23,5 d	A338	21,6 d	A327	12,2 c	A373	4,4 c	A338	3,7 c
A161	39,3 d	A257	23,5 d	A257	21,6 d	A164	12,1 c	A257	4,3 c	A164	3,7 c
A164	39,3 d	A235	23,3 d	A164	21,6 d	A161	12,1 c	A235	4,3 c	A257	3,7 c
A259	39,1 d	A238	23,0 d	A373	21,5 d	A259	12,0 c	A238	4,2 c	A373	3,6 c
A257	38,3 d	A258	22,7 d	A224	21,1 d	A257	11,5 c	A258	4,0 d	A224	3,5 c
A373	38,1 d	A338	22,6 d	A126	21,0 d	A373	11,4 d	A338	4,0 d	A126	3,5 c
A190	37,7 d	A372	22,2 d	A333	21,0 d	A190	11,2 d	A372	3,9 d	A333	3,5 c
A258	37,5 d	A225	22,1 d	A235	20,9 d	A258	11,0 d	A225	3,9 d	A235	3,5 c
A372	36,8 e	A191	22,0 d	A258	20,8 d	A372	10,6 d	A191	3,8 d	A258	3,4 c
A225	36,3 e	A190	21,8 d	A315	20,6 d	A225	10,4 d	A190	3,7 d	A315	3,3 c
A113	36,1 e	A260	21,7 d	A330	20,0 d	A113	10,2 d	A260	3,7 d	A260	3,1 c

Continua...

Continuação da Tabela 14.

DM (mm)						SC (cm ²)					
Linh.	0	Linh.	400	Linh.	500	Linh.	0	Linh.	400	Linh.	500
A111	36,0 e	A224	21,2 d	A260	20,0 d	A111	10,2 d	A224	3,5 d	A330	3,1 c
A337	35,8 e	A333	20,7 d	A334	19,9 d	A155	10,1 d	A333	3,4 d	A334	3,1 c
A162	35,7 e	A334	19,7 e	A372	19,7 d	A337	10,1 d	A334	3,1 d	A372	3,1 c
A189	35,7 e	A189	18,8 e	A189	19,1 e	A162	10,0 d	A189	2,8 d	A189	2,9 c
A224	35,4 e	A113	18,7 e	A113	19,1 e	A189	10,0 d	A113	2,7 d	A113	2,8 c
A155	35,4 e	A111	18,5 e	A111	19,0 e	A224	9,9 d	A111	2,7 d	A111	2,8 c
A355	35,3 e	A126	17,7 e	A356	17,7 e	A355	9,8 d	A126	2,4 e	A356	2,5 d
A260	35,0 e	A124	17,2 e	A317	17,6 e	A336	9,6 d	A124	2,3 e	A317	2,4 d
A235	34,6 e	A115	17,0 e	A124	17,5 e	A260	9,6 d	A115	2,3 e	A124	2,4 d
A336	34,2 f	A317	16,9 e	A115	17,4 e	A235	9,4 d	A317	2,2 e	A115	2,4 d
A124	33,2 f	A154	16,0 f	A163	17,2 e	A124	8,6 d	A154	2,0 e	A163	2,3 d
A338	33,2 f	A125	15,6 f	A302	16,7 e	A338	8,6 d	A356	1,9 e	A302	2,2 d
A115	33,1 f	A356	15,6 f	A316	16,3 e	A115	8,6 d	A125	1,9 e	A316	2,1 d
A126	32,7 f	A316	15,6 f	A154	16,1 e	A126	8,5 d	A316	1,9 e	A154	2,0 d
A236	31,9 f	A302	15,5 f	A125	16,1 e	A236	8,0 e	A302	1,9 e	A125	2,0 d
A356	31,9 f	A499	14,9 f	A499	15,1 e	A356	8,0 e	A499	1,8 e	A499	1,8 d
A125	30,4 g	A163	14,4 f	A236	13,2 f	A125	7,3 e	A163	1,6 e	A155	1,5 d
A499	29,6 g	A236	13,7 f	A155	12,5 f	A499	7,0 e	A236	1,5 e	A236	1,4 d
A333	27,1 h	A331	8,0 g	A335	8,0 g	A333	5,8 f	A331	0,5 e	A335	0,5 d
A334	25,8 h	A335	8,0 g	A329	8,0 g	A334	5,2 f	A335	0,5 e	A329	0,5 d
A163	24,0 h	A329	8,0 g	A331	8,0 g	A163	4,6 f	A329	0,5 e	A331	0,5 d

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

O crescimento das colônias das 57 linhagens de *Trichoderma* spp. nos três níveis de cádmio é apresentado na tabela 15. Ao observar o controle sem cádmio, as linhagens A511, A514, A510, A358, A482, A480, A307, A360, A426, A513, A410, A263, A483, A501, A512, A406, A412, A306, A509, A458 e A481, apresentaram maiores diâmetros médio e velocidade de crescimento das colônias que as demais linhagens de *Trichoderma* spp. O teste de Scott Knott 5% separou 7 grupos de diâmetro e velocidade de crescimento de colônias, sendo que os últimos 3 grupos continham as seguintes linhagens de menor crescimento, ou de crescimento mais lento: A229, A401, A403, A341 e A169. Para a superfície da colônia, os resultados foram similares quanto às linhagens, mas nesta variável o teste de Scott Knott subdividiu as linhagens de maior crescimento, listadas no início do parágrafo, em três grupos distintos.

Na dosagem 200 mg L⁻¹ de cádmio, as linhagens com maiores diâmetros e velocidade de crescimento de colônia foram A406, A409 e A468. Essas linhagens foram seguidas pelo crescimento das linhagens A263 e A411 como segundo grupo de maior crescimento. Na variável superfície da colônia essas 5 linhagens de maior crescimento foram subdivididas em 3 grupos.

Na dosagem de 300 mg L⁻¹ a linhagem com maior diâmetro, velocidade de crescimento e superfície de colônia foi a A406 que apresentou diâmetro da colônia 1,4 vezes, superfície da colônia 2 vezes e velocidade de crescimento 1,5 vezes maior que A514, que foi a segunda linhagem de maior crescimento. A406 mostrou-se, portanto, bastante tolerante a alta dosagem de Cd, sendo isso comprovado pelo sua pequena redução de crescimento na presença de Cd, mostrando com 300 mg.L⁻¹, 86% do diâmetro de colônia que tinha sem Cd. O isolado A406 é

da espécie *Trichoderma virens* tendo seu desempenho de tolerância a Cd comparável ao observado para *Trichoderma viride* por Hlihor et al. (2015), a qual tolerou Cd até 200 mg L⁻¹.

As linhagens A341 e A169 apresentaram o menor crescimento em todos os níveis de Cd, sugerindo que apresentaram problemas na repicagem pré-experimento ou que não se adaptam ao meio MEA, não sendo seu baixo crescimento atribuído a baixa tolerância de Cd. Porém, as linhagens A482 e A501, que estavam no grupo de maior crescimento nas condições sem Cd, diminuíram muito seu crescimento na presença de Cd, figurando nos grupos de menor crescimento, e se mostrando sensíveis ao Cd.

As linhagens da presente pesquisa apresentaram crescimento abaixo do observado por Ayad et al. (2018), ao avaliarem a tolerância ao cádmio de linhagens de fungos advindas de fábrica de zinco, Porto de Orã e Porto de Kharoba, dentre os quais tinha *Trichoderma sp.*, a qual apresentou alta capacidade de tolerar a dose 600 mg L⁻¹ apresentando um diâmetro de colônia de 62 mm. Após essa concentração o cádmio tornou-se tóxico e retardou o crescimento do micélio dessa *Trichoderma sp.*, sendo que a dosagem de 4000 mg L⁻¹ ocorreu a inibição máxima e o fungo não conseguiu crescer.

As concentrações de cádmio estudadas no presente trabalho para as linhagens de *Trichoderma spp.* foram menores que para as das linhagens de *Periconia macrospinoso*, devido a testes iniciais realizados com algumas linhagens de *Trichoderma* endofíticas de raízes de cana-de-açúcar indicarem que os isolados não se desenvolveriam em doses maiores que 300 mg L⁻¹, mesmo sendo visto em literatura que isolados de *Trichoderma* poderiam suportar uma amplitude maior de Cd, como o resultado relatado no parágrafo acima e o reportado por Zafar et al. (2007) com a concentração mínima inibitória de cádmio variando de 0,3 mg.mL⁻¹ até 3000 mg.mL⁻¹ para *Trichoderma sp.*

Tabela 15. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de *Trichoderma spp.* após 48 horas de crescimento em meio extrato de malte-água (MEA) com 0, 200 e 300 mg.L⁻¹ de cádmio. Médias em ordem decrescente.

Linh.	DM (mm)					SC (cm ²)					
	0	Linh.	200	Linh.	300	Linh.	0	Linh.	200	Linh.	300
A511	84,9 a	A406	69,2 a	A406	66,4 a	A511	56,7 a	A406	37,6 a	A406	34,7 a
A514	82,7 a	A409	63,5 a	A468	47,3 b	A514	53,7 a	A468	32,9 b	A404	16,9 b
A510	81,0 a	A468	63,4 a	A404	46,3 b	A510	51,6 a	A409	31,7 b	A468	16,8 b
A358	81,0 a	A263	56,8 b	A405	46,0 b	A358	51,6 a	A263	25,3 c	A405	16,7 b
A482	80,9 a	A411	54,4 b	A411	45,8 b	A482	51,4 a	A411	23,1 c	A411	16,4 b
A480	80,7 a	A460	52,8 c	A168	44,6 b	A480	51,2 a	A460	21,9 c	A168	15,7 b
A307	80,6 a	A247	50,4 c	A460	44,2 b	A307	51,1 a	A247	20,2 d	A460	15,3 b
A360	79,7 a	A168	50,3 c	A458	42,6 b	A360	49,9 a	A168	19,9 d	A458	14,3 b
A426	78,9 a	A404	49,9 c	A511	42,5 b	A426	48,9 b	A404	19,5 d	A511	14,2 b
A513	78,6 a	A405	48,0 c	A514	41,2 b	A410	48,8 b	A405	18,1 d	A514	13,4 c
A410	78,3 a	A458	47,2 c	A167	40,9 b	A513	48,5 b	A458	17,5 d	A167	13,1 c
A263	77,9 a	A461	46,1 d	A307	40,7 b	A263	47,8 b	A461	17,3 d	A307	13,0 c
A483	77,8 a	A511	44,2 d	A247	39,7 c	A483	47,5 b	A196	16,8 d	A247	12,4 c
A501	77,4 a	A307	43,9 d	A263	39,0 c	A501	47,0 b	A511	15,3 e	A263	12,4 c
A512	77,0 a	A167	43,3 d	A409	38,6 c	A512	46,6 b	A307	15,2 e	A409	11,7 c

Continua...

Continuação da Tabela 15.

Linh.	DM (mm)				SC (cm ²)												
	0	Linh.	200	Linh.	300	Linh.	0	Linh.	200	Linh.	300						
A406	76,9	a	A514	43,2	d	A480	38,3	c	A406	46,5	b	A167	14,8	e	A510	11,4	c
A412	76,5	a	A196	42,5	d	A510	38,2	c	A306	46,3	b	A514	14,6	e	A480	11,2	c
A306	76,5	a	A412	42,4	d	A229	36,5	c	A412	46,0	b	A412	14,2	e	A229	10,4	c
A509	75,9	a	A481	42,2	d	A461	35,9	c	A481	45,3	c	A481	14,0	e	A509	10,1	c
A458	75,9	a	A510	42,1	d	A509	35,7	c	A509	45,2	c	A510	13,9	e	A461	10,0	c
A481	75,8	a	A358	41,7	d	A412	34,8	c	A458	45,2	c	A358	13,6	e	A412	9,6	d
A361	75,2	b	A513	39,6	d	A358	33,7	c	A361	44,4	c	A513	12,3	f	A358	8,9	d
A460	74,3	b	A408	38,9	e	A481	32,7	d	A240	43,4	c	A480	12,0	f	A481	8,5	d
A319	74,2	b	A480	38,2	e	A306	32,0	d	A460	43,4	c	A408	11,9	f	A306	8,2	d
A240	73,8	b	A512	37,5	e	A196	31,5	d	A319	43,3	c	A410	11,8	f	A513	8,0	d
A135	73,5	b	A402	37,3	e	A513	31,4	d	A135	42,4	c	A359	11,2	f	A196	8,0	d
A468	73,0	b	A359	37,2	e	A512	30,4	d	A468	41,9	c	A512	11,0	f	A512	7,3	d
A411	72,9	b	A229	36,9	e	A426	29,8	d	A411	41,7	c	A402	11,0	f	A426	7,1	d
A282	72,9	b	A410	36,4	e	A408	29,3	d	A282	41,6	c	A229	10,7	f	A408	6,8	d
A196	71,6	b	A459	36,0	e	A400	29,0	d	A196	40,6	d	A357	10,3	f	A359	6,7	d
A400	71,5	b	A306	35,3	e	A402	28,8	d	A400	40,2	d	A459	10,2	f	A483	6,7	d
A149	71,1	b	A509	35,1	e	A459	28,7	d	A149	39,7	d	A306	9,9	f	A400	6,6	d
A399	70,4	b	A319	34,0	e	A359	28,5	d	A399	39,0	d	A509	9,6	f	A402	6,6	d
A320	69,9	b	A360	32,7	f	A483	28,2	d	A320	38,5	d	A319	9,1	f	A482	6,5	d
A357	68,5	b	A515	32,3	f	A482	28,1	d	A357	37,0	d	A360	8,4	g	A459	6,4	d
A409	64,8	c	A282	32,1	f	A360	26,8	e	A409	33,0	e	A515	8,2	g	A360	5,6	d
A167	64,3	c	A240	31,9	f	A357	25,7	e	A167	32,4	e	A282	8,1	g	A357	5,4	d
A402	63,2	c	A357	31,8	f	A508	25,7	e	A402	31,4	e	A240	7,9	g	A508	5,2	e
A168	62,5	c	A426	30,9	f	A282	25,0	e	A168	30,7	e	A426	7,6	g	A282	4,9	e
A247	61,9	c	A342	30,4	f	A361	24,2	e	A247	30,1	e	A361	7,3	g	A361	4,8	e
A515	60,7	c	A361	30,4	f	A320	24,1	e	A515	29,0	e	A342	7,3	g	A320	4,6	e
A405	59,9	c	A320	29,5	f	A342	24,1	e	A405	28,2	e	A320	6,8	g	A342	4,6	e
A459	59,6	c	A403	29,4	f	A319	23,6	e	A459	28,0	e	A403	6,8	g	A193	4,4	e
A342	58,8	c	A193	28,6	f	A403	23,5	e	A342	27,1	f	A193	6,5	g	A319	4,4	e
A193	57,8	d	A135	27,9	f	A135	23,5	e	A193	26,3	f	A135	6,1	g	A135	4,3	e
A359	57,3	d	A483	27,8	f	A240	23,4	e	A359	25,8	f	A483	6,1	g	A403	4,3	e
A408	56,2	d	A400	26,2	g	A193	23,0	e	A408	25,0	f	A400	5,4	h	A240	4,3	e
A461	55,4	d	A308	25,2	g	A410	21,5	e	A461	24,1	f	A401	5,0	h	A410	3,9	e
A308	55,3	d	A508	25,1	g	A401	19,9	f	A308	24,0	f	A308	5,0	h	A401	3,1	e
A508	54,2	d	A401	25,1	g	A501	18,7	f	A508	23,1	f	A508	4,9	h	A399	2,8	e
A377	53,0	d	A501	24,7	g	A308	17,6	f	A377	22,1	f	A399	4,8	h	A501	2,7	e
A404	52,3	d	A399	24,2	g	A515	17,4	f	A404	21,5	f	A501	4,8	h	A308	2,4	e
A229	47,5	e	A149	24,1	g	A399	17,3	f	A229	18,3	g	A149	4,6	h	A515	2,4	e

Continua...

Continuação da Tabela 15.

Linh.	DM (mm)				SC (cm ²)						
	0	Linh.	200	Linh.	300	Linh.	0	Linh.	200	Linh.	300
A401	41,7 f	A482	21,3 g	A149	15,6 f	A401	13,8 g	A482	3,7 h	A149	1,9 e
A403	37,1 f	A377	18,4 g	A377	14,0 f	A403	10,8 h	A377	2,6 h	A377	1,5 e
A341	36,2 f	A341	14,0 h	A341	9,7 g	A341	10,3 h	A341	1,6 h	A341	0,7 e
A169	22,4 g	A169	8,0 i	A169	8,0 g	A169	3,9 i	A169	0,5 h	A169	0,5 e

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

Os índices de tolerância ao cádmio das linhagens de *Periconia macrospinoso* e de *Trichoderma* spp. encontram-se na tabela 16. No experimento de *Periconia*, na dosagem com 400 mg.L⁻¹ de cádmio, as linhagens com maior índice de tolerância (IT) foram A423, A355, A226, A336, A332, A333, A334 e A155. Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al., (2018), as linhagens, A423, A355 e A226, foram classificadas como “Alta” tolerância. Essas linhagens foram seguidas pelas linhagens A161, A162, A158, A159, A164, A160, A338, A328, A337 e A235 formando um segundo grupo de maior IT. As linhagens com menor índice foram A329, A335 e A331.

Na dose de 500 mg.L⁻¹ as linhagens com maior índice de tolerância ao cádmio foram A333, A334, A332, A336, A423, A163, A355, A226 e A157, e para a classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al., (2018), as linhagens foram classificadas como “moderada” tolerância. Essas foram seguidas pelo segundo maior grupo de mais tolerantes com as linhagens A161, A162, A337, A158, A126, A338 e A328. As linhagens com menores índices de tolerância foram A329, A335 e A331.

As doses estudadas de cádmio para *Periconia macrospinoso* foram elevadas e mesmo assim as linhagens demonstraram moderada à alta tolerância a essas doses de Cádmio. Em alguns casos, os DSE são relatados como tolerantes aos estresses em condições de cultura *in vitro* (LIKAR; REGVAR, 2013 ; ZHAN et al., 2015b ; BERTHELOT et al., 2016). No caso do índice de tolerância, definido como a capacidade de um microrganismo sobreviver à toxicidade de um determinado metal, por meio de um ou mais mecanismos concebidos em resposta direta ao crescimento na presença do metal em questão (ZAFAR; AHMAD, 2007; IRAM; ZAMAN; IQBAL, 2013), mostrou essa capacidade dos isolados de *Periconia macrospinoso*. A tolerância a metais por fungos filamentosos tem sido associada aos seus locais de isolamento, toxicidade do metal testado, sua concentração no meio e na competência inata do isolado (RUTA et al, 2010). No caso os isolados testados, oriundos de raízes cana-de-açúcar, alguns isolados mais tolerantes podiam estar crescendo em ambientes potencialmente poluídos pelo cádmio trazido por fertilizantes, pela aplicação de vinhaça e outros efluentes industriais da usina, ou ainda por uma característica mineralógica do solo, já que os locais contaminados são conhecidos como principais fontes de espécies resistentes aos metais (GADD; SAYER, 2000). As linhagens que apresentaram maior tolerância na maior dose de cádmio, A126, A157 e A163 foram isoladas em canaviais nos municípios de Quatá e Macatuba. Há registros de que a simbiose com DSE mostra preferência por locais com metais pesados, exibindo maior intensidade de colonização com o aumento da poluição de metais (LI et al., 2011, REGVAR et al., 2011).

Mesmo que escassos os trabalhos com tolerância a cádmio pelos DSE, há o registro recente da cepa DSE *Exophiala pisciphila* H93 tolerante ao Cd, isolada das raízes de *Arundinella bengalensis*, que cresciam em uma fundição de minas na província de Yunnan, sudoeste da China. Essa cepa mostrou notável tolerância ao cádmio e acumulou 4,93% a 3,57% de Cd no micélio, em uma solução de 0.4 mg.ml⁻¹ de cádmio (ZHANG et al. 2008). Também há relatos que fungos DSEs habitam a maioria das raízes de plantas saudáveis que ocorrem nesta fundição de mina com concentrações consideravelmente altas de Cd (ZHANG et al., 2008, ZHOU et al., 2013a). A alta acumulação de vários metais é particularmente vantajosa na

biorremediação porque a água e o solo são frequentemente contaminados com vários metais (MCGRATH et al., 2001).

No experimento de *Trichoderma*, na dosagem com 200 mg.L⁻¹ de cádmio, as linhagens com maior índice de tolerância foram A409, A404 e A406 (Tabela 16). Essas linhagens foram seguidas pelas linhagens A468, A461, A247, A168, A229, A405 e A403 formando um segundo grupo de maior índice de tolerância. Para ambos os grupos de maior índice de tolerância, as linhagens foram classificadas segundo Oladipo et al. (2018) como de “tolerância alta” a esta dose de cádmio. As linhagens que compoem o grupo com menor índice de tolerância foram A400, A483, A169, A377, A399, A149, A501 e A482.

Na dose de 300 mg.L⁻¹ as linhagens com maior índice de tolerância ao cádmio foram A404 e A406, seguidas pelo segundo grupo de mais tolerantes com as linhagens A229 e A405. Dentre esses dois primeiros grupos, apenas as linhagens A404, A406 e A229 foram classificadas segundo Oladipo et al. (2018) como de “tolerância alta” a essa dose de Cd. As linhagens no grupo de menor índices de tolerância foram A515, A410, A341, A377, A399, A501 e A149. Errasquin; Vazquez (2003) relataram que cepas de *Trichoderma* toleram mais de um tipo de metal. Espécies de *Trichoderma* com capacidade de tolerar e desintoxicar metais pesados são comumente isoladas de solos contaminados (ZAFAR et al., 2007). Assim, cepas de *Trichoderma* spp. tolerantes a metais podem se tornar organismos dominantes em alguns ambientes poluídos (ERRASQUIN; VAZQUEZ, 2003).

Tabela 16. Índice de tolerância ao cádmio após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 400 e 500 mg.L⁻¹ de cádmio (Experimento com linhagens de *Periconia macrospinoso*) ou após 48 horas de crescimento em MEA com 200 e 300 mg.L⁻¹ de cádmio (Experimento com linhagens de *Trichoderma* spp.). Médias em ordem decrescente.

<i>Periconia macrospinoso</i>				<i>Trichoderma</i> spp.			
Linhagem	400	Linhagem	500	Linhagem	200	Linhagem	300
A423	0,82 a	A333	0,78 a	A409	0,98 a	A404	0,89 a
A355	0,80 a	A334	0,77 a	A404	0,96 a	A406	0,86 a
A226	0,80 a	A332	0,76 a	A406	0,90 a	A229	0,80 b
A336	0,79 a	A336	0,76 a	A468	0,88 b	A405	0,77 b
A332	0,78 a	A423	0,76 a	A461	0,84 b	A168	0,71 c
A333	0,77 a	A163	0,72 a	A247	0,82 b	A461	0,65 c
A334	0,76 a	A355	0,72 a	A168	0,81 b	A468	0,65 c
A155	0,75 a	A226	0,72 a	A229	0,81 b	A247	0,64 c
A161	0,73 b	A157	0,71 a	A405	0,80 b	A403	0,64 c
A162	0,73 b	A161	0,67 b	A403	0,80 b	A167	0,64 c
A158	0,73 b	A162	0,67 b	A411	0,75 c	A411	0,63 c
A159	0,70 b	A337	0,66 b	A263	0,73 c	A409	0,60 c
A164	0,70 b	A158	0,66 b	A460	0,71 c	A460	0,60 c
A160	0,69 b	A126	0,65 b	A408	0,70 c	A458	0,56 c
A338	0,68 b	A338	0,65 b	A167	0,68 c	A408	0,52 d
A328	0,68 b	A328	0,65 b	A359	0,65 c	A307	0,50 d
A337	0,68 b	A159	0,62 c	A458	0,62 d	A263	0,50 d
A235	0,67 b	A160	0,61 c	A459	0,61 d	A511	0,50 d
A314	0,63 c	A235	0,61 c	A401	0,61 d	A359	0,50 d
A156	0,63 c	A225	0,61 c	A402	0,59 d	A514	0,50 d
A259	0,62 c	A447	0,60 c	A196	0,58 d	A459	0,48 d
A373	0,62 c	A224	0,60 c	A481	0,56 d	A401	0,48 d
A260	0,62 c	A424	0,59 c	A412	0,56 d	A480	0,48 d

Continua...

Continuação da Tabela 16.

<i>Periconia macrospinoso</i>				<i>Trichoderma spp.</i>			
Linhagem	400	Linhagem	500	Linhagem	200	Linhagem	300
A318	0,61 c	A191	0,58 c	A307	0,54 d	A508	0,47 d
A257	0,61 c	A190	0,58 c	A515	0,53 e	A509	0,47 d
A157	0,61 c	A327	0,58 c	A511	0,52 e	A510	0,47 d
A225	0,61 c	A259	0,57 c	A514	0,52 e	A402	0,46 d
A372	0,61 c	A260	0,57 c	A510	0,52 e	A412	0,46 d
A163	0,61 c	A318	0,57 c	A342	0,52 e	A196	0,44 d
A258	0,60 c	A257	0,56 c	A358	0,51 e	A481	0,44 d
A327	0,60 c	A373	0,56 c	A513	0,50 e	A306	0,42 d
A224	0,60 c	A238	0,56 c	A193	0,50 e	A358	0,42 d
A424	0,60 c	A356	0,56 c	A512	0,49 e	A342	0,41 d
A237	0,59 c	A258	0,55 c	A480	0,48 e	A400	0,41 d
A330	0,59 c	A164	0,55 c	A410	0,48 e	A513	0,40 d
A190	0,58 c	A237	0,54 c	A306	0,47 e	A512	0,40 d
A315	0,57 c	A314	0,54 c	A508	0,46 e	A193	0,40 d
A447	0,57 c	A189	0,54 c	A357	0,46 e	A426	0,38 e
A238	0,56 d	A372	0,54 c	A509	0,46 e	A357	0,37 e
A126	0,55 d	A113	0,54 c	A319	0,46 e	A483	0,36 e
A189	0,53 d	A124	0,54 c	A308	0,46 e	A169	0,36 e
A191	0,53 d	A111	0,53 c	A240	0,44 f	A320	0,35 e
A113	0,53 d	A125	0,53 c	A282	0,44 f	A482	0,35 e
A124	0,53 d	A115	0,53 c	A320	0,43 f	A282	0,34 e
A111	0,52 d	A156	0,53 c	A360	0,41 f	A360	0,34 e
A125	0,52 d	A499	0,52 c	A361	0,40 f	A240	0,33 e
A115	0,52 d	A315	0,50 c	A426	0,39 f	A361	0,32 e
A499	0,51 d	A330	0,48 c	A341	0,39 f	A135	0,32 e
A356	0,49 d	A317	0,43 d	A135	0,38 f	A308	0,32 e
A236	0,44 e	A302	0,41 d	A400	0,37 fg	A319	0,32 e
A317	0,41 e	A236	0,41 d	A483	0,36 fg	A515	0,29 f
A316	0,39 e	A316	0,41 d	A169	0,36 fg	A410	0,28 f
A302	0,39 e	A154	0,38 d	A377	0,35 fg	A341	0,27 f
A154	0,38 e	A155	0,35 d	A399	0,34 fg	A377	0,26 f
A329	0,21 f	A329	0,21 e	A149	0,34 fg	A399	0,25 f
A335	0,20 f	A335	0,20 e	A501	0,32 fg	A501	0,24 f
A331	0,16 f	A331	0,16 e	A482	0,26 fg	A149	0,22 f

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

Segundo Olalipo et al., (2018, os valores de classificação do índice de tolerância indicam:

0,00 – 0,39 – Tolerância muito baixa ao metal; 0,40 – 0,59 – Tolerância baixa ao metal;

0,60 – 0,79 – Tolerância moderada ao metal; 0,80 – 0,99 – Tolerância alta ao metal;

1,00 => 1,00 – Tolerância muito alta ao metal.

Efeito principal para os níveis de Cd na análise de variância do índice de tolerância é apresentado na figura 3. Como esperado, o índice de tolerância médio das linhagens diminuiu da dose de Cd menor para a dosagem maior, tanto no experimento com *Periconia macrospinoso*, como no de *Trichoderma spp.* Apenas as linhagens de *Periconia macrospinoso* A126, A157 e A163 apresentaram comportamento contrário à essa média, apresentando maior índice de tolerância na maior dose de Cd (Tabela 16). As demais linhagens de *Periconia macrospinoso* e as de *Trichoderma spp* mostram comportamento igual ao da média das linhagens, com índice de tolerância maior na menor dose, ou seu índice de tolerância não diferiu estatisticamente entre as doses de Cd.

Nesse estudo as linhagens de *Trichoderma* se mostraram menos tolerantes ao Cd que as de *Periconia macrospinoso*. Isso pode ser observado pela magnitude do índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinoso* e de *Trichoderma spp* para cada nível de Cd (Figura 3). Apesar no experimento de *Periconia macrospinoso* ter sido conduzido com

maior dosagem de Cd (quase o dobro do experimento de *Trichoderma* spp.) suas linhagens apresentaram índice de tolerância médio mais elevado que a média das linhagens de *Trichoderma* spp. Além disso, devido ao seu crescimento mais lento, o tempo de contato das colônias de *Periconia macrospinoso* com o cádmio foi o dobro do tempo que as linhagens de *Trichoderma* spp.

A maior tolerância observada para as linhagens de *Periconia macrospinoso* (fungos escuros) em relação às linhagens de *Trichoderma* spp. (fungos hialinos) pode ser em parte explicada pela sua cor, pois a melanina fúngica, que é um composto macromolecular biológico complexo, cuja composição inclui compostos fenólicos e aromáticos, promove o suporte rígido estrutural da parede celular micelial e aumenta a tolerância dos fungos mais escuros a vários fatores estressores, como metais pesados, seca e condições oxidativas (EISENMAN; CASADEVALL, 2012 ; BERTHELOT et al., 2017).

O presente estudo de tolerância ao cádmio indica que existem linhagens do DSE *Periconia macrospinoso* e do fungo endofítico *Trichoderma* spp. que podem crescer e ter alta tolerância a condições tóxicas de Cd, mesmo sendo isoladas de condições agrícolas comuns a lavoura de cana-de-açúcar. Essas linhagens podem ser utilizadas como simbiotes em processos de fitorremediação ou de necessidade de cultivo em solos poluídos. No processo de remediação de solos e água, a maioria dos métodos físicos e químicos, como filtração, troca iônica, precipitação química, tratamento eletroquímico e osmose reversa, utilizados para remover metais pesados do meio ambiente, são bem onerosos, requerem alta energia, não são específicos e têm eficácia limitada (OZCAN et al., 2005). Assim, a disponibilidade de materiais biológicos que podem auxiliar na remoção de metais tóxicos são bastante desejados, pois são baratos, possuem alta eficiência para absorção de metais pesados e muitas vezes são específicos para o tipo de metal (MUNOS et al., 2006; EDRIS et al., 2013; IRAM et al., 2015).

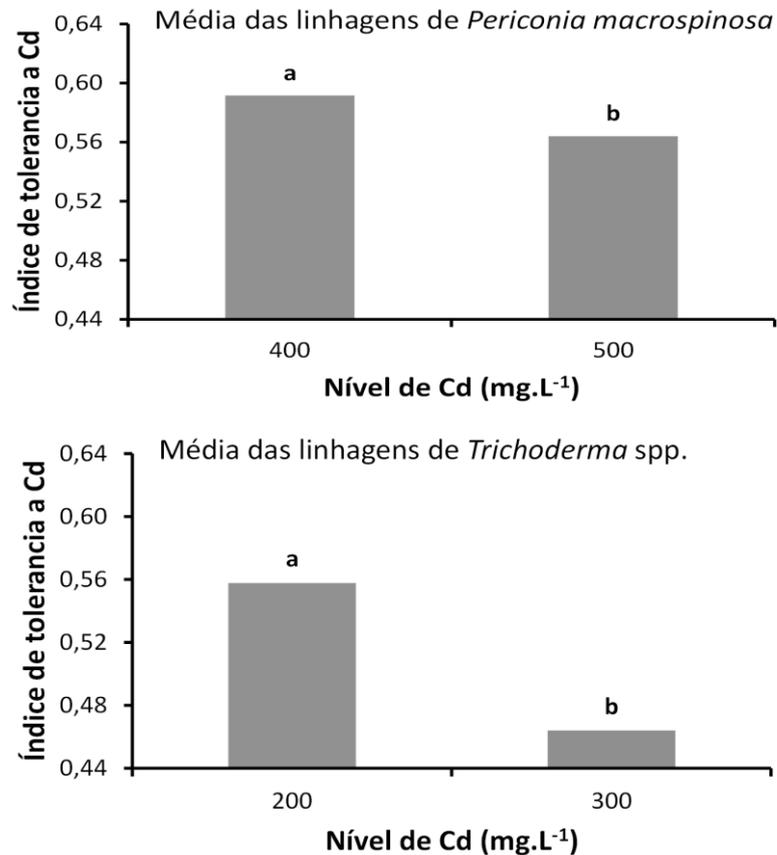


Figura 3. Índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinoso* e de *Trichoderma spp* para cada nível de Cd (Efeito principal para nível de Cd na análise de variância). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre níveis de Cd pelo teste de Scott Knott 5%.

4.3.2 Tolerância ao excesso de cobre

Foram avaliadas quanto a tolerância ao excesso de cobre 115 linhagens de fungos endofíticos de raízes de cana-de-açúcar, sendo 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* e 58 linhagens de *Trichoderma spp.*, todas testadas quanto ao crescimento micelial em meio Extrato de Malte Ágar (MEA) suplementado com 0, 300 e 1000 mg.L⁻¹ de cobre e ajustado para pH 6,0.

O diâmetro médio e a superfície das colônias das 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* são apresentados na tabela 17. Ao observar o controle sem suplemento de cobre, as linhagens A158, A237, A334, A355, A317, A318, A258 e A257 apresentaram maior diâmetro, velocidade de crescimento* e superfície das colônias que as demais linhagens de *P. macrospinoso*. A linhagem de menor crescimento ou de crescimento mais lento foi a A163 apresentando uma colônia de apenas 20 mm de diâmetro em 120 horas de crescimento. Essa foi antecedida pelas linhagens A111, A164 e A113 que também apresentaram crescimento pequeno ou lento.

Na dosagem com 300 mg.L⁻¹ de cobre, as linhagens com maior diâmetro e velocidade de crescimento foram A162, A334, A191 e A257, sendo a linhagem A257 excluída desse grupo na análise da superfície de colônia, ficando dentro do grupo posterior. Esse primeiro grupo de maior crescimento em diâmetro e velocidade foi seguido pelo grupo composto pelas linhagens

* Variável apresentada na tabela 30 para *Periconia macrospinoso* e na tabela 31 para *Trichoderma spp.*

A423, A314, A373, A164, A499, A317, A259, A157 e A332, sendo que novamente a superfície das colônias deixou A157 e A332 para o próximo terceiro grupo em crescimento. Quanto ao grupo das linhagens de menor crescimento nessa dosagem de cobre, as três variáveis concordam de ser composto pelas linhagens A163 e A331, antecedido pela linhagem A113. Como a linhagem A113 também apresentou pequeno crescimento no meio sem suplementação de cobre, esse pequeno crescimento dela não foi atribuído a um efeito deletério do excesso de cobre.

Na dose de 1000 mg.L⁻¹ de cobre, as três variáveis analisadas concordam em separar o grupo das linhagens de maior crescimento nesta alta dosagem tendo as linhagens A160, A191, A316, A158, A330, A162, A334 e A499 e o grupo de menor crescimento contendo as linhagens A113 e A331. Conforme já comentado o pequeno crescimento de A113 não foi atribuído somente a sensibilidade ao excesso de cobre. Grupos de linhagens intermediários a esses dois extremos foram divididos diferentemente entre as variáveis, sendo que a superfície de colônia separou apenas três grupos intermediários e o diâmetro e velocidade de crescimento da colônia cinco grupos intermediários.

Tabela 17. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de *Periconia macrospinoso* após 120 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.

DM (mm)						SC (cm ²)					
Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000
A158	56,6 a	A162	44,7 a	A160	34,3 a	A158	25,0 a	A162	15,8 a	A160	9,3 a
A237	55,9 a	A334	44,1 a	A191	31,4 a	A237	24,6 a	A334	15,3 a	A191	7,8 a
A334	55,5 a	A191	44,0 a	A316	31,3 a	A334	24,2 a	A191	15,2 a	A316	7,7 a
A355	55,3 a	A257	42,4 a	A158	31,3 a	A317	24,0 a	A257	14,2 b	A158	7,7 a
A317	55,3 a	A423	41,4 b	A330	31,2 a	A355	24,0 a	A423	13,5 b	A330	7,6 a
A318	55,0 a	A314	41,3 b	A162	30,9 a	A318	23,8 a	A314	13,4 b	A162	7,5 a
A258	54,9 a	A373	41,2 b	A334	30,4 a	A258	23,6 a	A373	13,3 b	A334	7,5 a
A257	54,8 a	A164	40,9 b	A499	30,1 a	A257	23,6 a	A164	13,2 b	A499	7,4 a
A314	53,6 a	A499	40,5 b	A257	29,4 b	A314	22,6 b	A499	13,1 b	A257	6,9 b
A226	53,1 b	A317	40,4 b	A423	29,3 b	A226	22,2 b	A317	13,0 b	A423	6,8 b
A191	53,1 b	A259	39,9 b	A329	29,1 b	A191	22,1 b	A259	12,5 b	A329	6,7 b
A162	53,1 b	A157	39,0 b	A190	28,8 b	A162	22,1 b	A332	12,0 c	A238	6,7 b
A315	53,0 b	A332	38,8 b	A336	28,8 b	A315	22,0 b	A157	11,9 c	A226	6,6 b
A160	52,6 b	A190	38,3 c	A226	28,7 b	A160	21,7 c	A190	11,5 c	A190	6,6 b
A159	52,5 b	A333	37,9 c	A238	28,6 b	A159	21,6 c	A333	11,3 c	A336	6,5 b
A373	52,5 b	A158	37,2 c	A164	28,4 b	A373	21,6 c	A158	10,9 c	A164	6,3 b
A336	52,3 b	A154	37,1 c	A424	28,2 b	A336	21,4 c	A154	10,8 c	A424	6,3 b
A332	52,2 b	A258	36,3 c	A314	27,9 b	A332	21,4 c	A258	10,3 c	A314	6,1 b
A499	51,9 b	A160	36,0 c	A125	27,8 b	A499	21,2 c	A160	10,3 c	A125	6,1 b
A260	51,8 b	A318	35,8 c	A337	27,8 b	A260	21,1 c	A318	10,1 c	A337	6,1 b
A259	51,6 b	A155	35,6 c	A333	27,8 b	A259	20,9 c	A238	9,9 c	A333	6,1 b
A157	51,1 b	A238	35,4 c	A259	27,7 b	A157	20,5 c	A155	9,9 c	A259	6,1 b
A302	50,8 b	A355	34,8 c	A159	26,0 c	A302	20,3 c	A355	9,6 c	A159	5,4 b
A238	50,4 b	A315	34,5 c	A356	25,9 c	A238	20,0 d	A315	9,3 d	A356	5,4 b
A224	49,9 b	A224	34,1 c	A225	25,7 c	A224	19,5 d	A224	9,1 d	A225	5,2 b

Continua...

Continuação da Tabela 17.

Linh.	DM (mm)					SC (cm ²)					
	0	Linh.	300	Linh.	1000	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000
A316	49,8 b	A328	33,9 c	A327	25,1 c	A316	19,4 d	A328	9,1 d	A318	5,0 b
A338	49,1 c	A226	33,8 c	A163	24,9 c	A338	18,9 d	A226	9,0 d	A327	5,0 b
A189	48,8 c	A337	32,8 d	A318	24,7 c	A189	18,7 d	A330	8,5 d	A163	4,9 b
A447	48,4 c	A189	32,5 d	A373	23,9 c	A447	18,4 d	A337	8,4 d	A373	4,5 c
A372	47,8 c	A330	32,4 d	A126	23,1 d	A372	18,0 e	A189	8,3 d	A189	4,4 c
A330	47,5 c	A159	32,4 d	A111	22,8 d	A330	17,8 e	A159	8,2 d	A126	4,2 c
A423	47,4 c	A125	32,3 d	A189	22,3 d	A156	17,5 e	A125	8,2 d	A111	4,1 c
A156	47,2 c	A329	32,1 d	A235	22,1 d	A423	17,4 e	A329	8,1 d	A302	3,9 c
A155	46,7 c	A336	32,0 d	A302	21,9 d	A155	17,1 e	A336	8,1 d	A235	3,8 c
A154	46,7 c	A327	30,8 d	A372	21,2 d	A154	17,1 e	A327	7,5 e	A372	3,5 c
A333	46,5 c	A260	30,8 d	A447	20,9 d	A333	16,9 e	A260	7,4 e	A447	3,5 c
A236	46,2 c	A156	30,8 d	A236	20,9 d	A236	16,8 e	A156	7,4 e	A236	3,4 c
A225	46,2 c	A302	30,4 d	A154	20,7 d	A225	16,7 e	A302	7,3 e	A154	3,4 c
A125	45,8 d	A236	30,2 d	A332	20,1 e	A125	16,5 e	A236	7,1 e	A332	3,3 c
A337	45,8 d	A335	29,8 d	A328	19,6 e	A337	16,5 e	A335	7,0 e	A315	3,1 c
A424	45,8 d	A237	29,3 d	A315	19,5 e	A424	16,5 e	A237	6,7 e	A260	3,0 c
A329	45,1 d	A316	29,0 d	A224	19,3 e	A327	16,1 f	A316	6,7 e	A328	3,0 c
A327	44,9 d	A447	29,0 d	A260	19,0 e	A329	16,0 f	A447	6,6 e	A224	2,9 c
A331	44,7 d	A372	28,5 e	A157	18,9 e	A335	15,7 f	A372	6,4 e	A157	2,8 d
A124	44,4 d	A356	28,2 e	A156	18,8 e	A161	15,5 f	A356	6,4 e	A156	2,8 d
A161	44,4 d	A338	27,6 e	A258	18,6 e	A124	15,5 f	A338	6,0 f	A258	2,7 d
A190	43,9 d	A235	27,5 e	A115	18,4 e	A190	15,1 f	A235	5,9 f	A115	2,7 d
A235	43,8 d	A115	27,1 e	A237	17,7 e	A331	15,1 f	A115	5,8 f	A237	2,5 d
A115	43,6 d	A225	26,7 e	A124	17,6 e	A235	15,1 f	A424	5,8 f	A124	2,5 d
A335	43,2 d	A161	26,6 e	A155	17,2 f	A115	14,9 f	A225	5,6 f	A355	2,3 d
A328	40,2 e	A424	26,1 e	A355	17,1 f	A328	14,3 f	A161	5,6 f	A155	2,3 d
A126	40,1 e	A126	25,8 e	A335	15,7 f	A126	12,6 g	A126	5,2 f	A335	1,9 d
A356	38,4 e	A111	25,3 e	A161	15,3 f	A356	11,7 g	A111	5,0 f	A317	1,9 d
A111	35,6 f	A124	23,2 e	A317	15,3 f	A111	10,0 h	A124	4,2 f	A161	1,8 d
A164	34,3 f	A113	21,0 f	A338	14,5 f	A164	9,5 h	A113	3,4 g	A338	1,7 d
A113	34,1 f	A163	12,9 g	A113	13,0 g	A113	9,5 h	A163	1,3 h	A113	1,3 d
A163	20,6 g	A331	10,2 g	A331	9,5 g	A163	3,3 i	A331	0,8 h	A331	0,7 d

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

Os pesos dos micélios frescos e secos das colônias das 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* são apresentados na tabela 18. Observando essas variáveis na testemunha sem adição de cobre verifica-se que a análise do peso do micélio fresco dividiu as linhagens em seis grupos de crescimento enquanto que o peso do micélio seco em apenas 3 grupos de crescimento. No peso do micélio fresco as linhagens A355 e A258 apresentaram massa superior a todas as demais, seguida pela linhagem A314. As linhagens A162, A224, A327, A161, A190, A257, A316, A126, A259, A113, A125, A328, A336, A424, A337, A111, A236, A235, A331, A423, A164 e A163 formaram o grupo com menor massa. No peso do micélio seco, o grupo de maior massa foi das linhagens A157, A155, A258, A158 e A331. O grupo de massa intermediária composto pelas linhagens A355, A356, A237, A332, A424, A373, A302, A423, A447 e A372. E o grupo de menor massa pelas linhagens A315, A191, A334, A124, A159, A317, A260, A115, A318, A162, A226, A499, A335, A189, A328, A330, A160, A329, A333, A225, A257, A154, A314, A259, A161, A156, A336, A327, A316, A238, A338, A190, A125, A224, A236, A337, A126, A235, A113, A111, A164 e A163.

Houve grande variação dentro dos agrupamentos entre a massa dos micélios fresca e seca. Pode-se salientar que com a secagem houve a subida para agrupamento mais pesado das linhagens A331, A423, A424, A155 e A157 e a descida para agrupamento mais leve da

linhagem A314. Isso pode indicar que as linhagens podem apresentar micélios com diferentes densidades, mas o mais provável é que houve uma drenagem deficiente pela centrifugação, alguma perda de material durante a secagem e pesagem, ou ainda algum outro tipo de erro experimental incontrolável. Isto se deve ao manuseio trabalhoso para a separação do micélio do meio sólido, ao manuseio de pequenas quantidades de materiais e à pesagem de quantidades muito pequenas, em miligramas, para obtenção dessas massas. O resultado é que nem todas as linhagens agrupadas como mais pesadas apresentaram maior crescimento em diâmetro médio e superfície da colônia (Tabela 17).

Na dosagem com 300 mg.L⁻¹ de suplementação de cobre, tanto a massa fresca, quanto a seca dividiram as linhagens em apenas dois grupos de crescimento (Tabela 18). A massa fresca colocou as linhagens A355, A237, A258, A302, A332, A372, A124, A447, A154, A315, A257, A259, A115, A260, A334, A161, A317, A314, A226, A373 e A356 no grupo de maior crescimento, e as demais no outro grupo. A massa seca foi mais restritiva e colocou apenas as linhagens A237, A226, A191, A499 e A154 no grupo de maior crescimento, sendo que destas apenas as linhagens A191 e A499 figuram nos dois grupos de maior crescimento em diâmetro e superfície da colônia (Tabela 17).

Na dosagem com 1000 mg.L⁻¹ de suplementação de cobre, tanto a massa fresca, quanto a seca não dividiram as linhagens, não apresentando diferenças significativas entre elas (Tabela 18). Ao contrário das divisões de linhagens observadas em diâmetro e superfície da colônia (Tabela 17).

Tabela 18. Peso do micélio fresco (PMF) e peso do micélio seco (PMS) de colônias de diferentes linhagens de *Periconia macrospinoso* após 120 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.

		PMF (mg)				PMS (mg)					
Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000
A355	1174,2 a	A355	300,8 a	A156	308,2 a	A157	51,0 a	A237	32,4 a	A334	22,0 a
A258	1117,5 a	A237	250,7 a	A314	159,7 a	A155	46,3 a	A226	31,6 a	A159	20,5 a
A314	848,0 b	A258	247,0 a	A260	153,3 a	A258	40,5 a	A191	29,4 a	A164	10,8 a
A373	741,7 c	A302	234,8 a	A334	145,8 a	A158	38,8 a	A499	25,6 a	A314	10,3 a
A302	740,5 c	A332	225,0 a	A355	121,2 a	A331	38,8 a	A154	22,1 a	A258	8,9 a
A447	705,4 c	A372	224,9 a	A124	114,0 a	A355	35,2 b	A337	17,9 b	A124	8,5 a
A372	703,7 c	A124	224,5 a	A258	111,2 a	A356	31,8 b	A336	17,9 b	A224	8,4 a
A332	616,5 d	A447	223,8 a	A332	96,3 a	A237	31,7 b	A258	16,1 b	A317	8,3 a
A159	609,5 d	A154	217,9 a	A257	96,3 a	A332	31,4 b	A124	15,0 b	A356	8,1 a
A237	604,0 d	A315	208,7 a	A302	95,3 a	A424	31,1 b	A334	14,7 b	A355	7,9 a
A158	595,1 d	A257	190,0 a	A373	94,9 a	A373	30,8 b	A317	14,4 b	A156	7,5 a
A260	575,2 d	A259	178,7 a	A447	90,9 a	A302	29,1 b	A332	14,2 b	A330	7,5 a
A189	531,5 d	A115	175,5 a	A259	90,6 a	A423	28,6 b	A373	13,9 b	A157	7,3 a
A334	529,7 d	A260	173,0 a	A159	89,8 a	A447	27,8 b	A314	13,9 b	A373	7,1 a
A335	528,2 d	A334	157,8 a	A372	86,1 a	A372	27,6 b	A257	13,5 b	A329	7,1 a
A315	511,8 d	A161	157,5 a	A126	76,0 a	A315	25,0 c	A224	13,1 b	A225	7,1 a
A356	507,8 d	A317	155,0 a	A226	74,5 a	A191	25,0 c	A302	12,9 b	A260	7,0 a
A226	483,0 d	A314	154,8 a	A224	74,2 a	A334	24,4 c	A259	12,7 b	A332	7,0 a
A124	464,0 d	A226	137,5 a	A157	64,1 a	A124	24,3 c	A260	12,3 b	A302	6,9 a
A225	453,7 d	A373	137,3 a	A317	62,7 a	A159	23,4 c	A372	12,3 b	A115	6,8 a
A333	437,8 e	A356	137,0 a	A155	60,8 a	A317	22,9 c	A447	12,3 b	A226	6,7 a
A317	397,7 e	A423	127,2 b	A154	59,8 a	A260	22,8 c	A355	12,3 b	A190	6,7 a

Continua...

Continuação da Tabela 18.

Linh.	PMF (mg)					PMS (mg)					
	0	Linh.	300	Linh.	1000	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000
A191	372,0 ^e	A111	103,7 ^b	A333	55,2 ^a	A115	21,4 ^c	A315	12,1 ^b	A447	6,6 ^a
A154	364,4 ^e	A159	103,7 ^b	A328	54,8 ^a	A318	21,2 ^c	A189	11,7 ^b	A333	6,6 ^a
A115	360,3 ^e	A191	100,2 ^b	A316	54,3 ^a	A162	20,4 ^c	A190	11,6 ^b	A372	6,6 ^a
A156	354,2 ^e	A224	100,2 ^b	A237	53,7 ^a	A226	19,5 ^c	A159	11,2 ^b	A155	6,6 ^a
A318	336,3 ^e	A126	97,6 ^b	A158	53,5 ^a	A499	18,9 ^c	A423	11,1 ^b	A154	6,2 ^a
A160	328,0 ^e	A316	96,8 ^b	A499	52,5 ^a	A335	18,5 ^c	A115	10,9 ^b	A158	6,2 ^a
A157	296,8 ^e	A156	95,6 ^b	A330	51,8 ^a	A189	18,3 ^c	A160	10,8 ^b	A337	6,2 ^a
A338	281,2 ^e	A190	93,0 ^b	A356	51,7 ^a	A328	17,9 ^c	A161	10,1 ^b	A126	6,2 ^a
A329	273,9 ^e	A164	87,3 ^b	A315	50,5 ^a	A330	17,9 ^c	A235	9,8 ^b	A160	6,0 ^a
A330	268,8 ^e	A499	87,0 ^b	A335	50,0 ^a	A160	17,7 ^c	A318	9,1 ^b	A316	5,9 ^a
A155	264,0 ^e	A160	84,4 ^b	A160	49,5 ^a	A329	17,7 ^c	A316	8,9 ^b	A257	5,6 ^a
A238	260,2 ^e	A318	83,5 ^b	A329	47,6 ^a	A333	17,5 ^c	A356	8,4 ^b	A237	5,6 ^a
A499	254,8 ^e	A424	82,7 ^b	A423	46,7 ^a	A225	16,9 ^c	A126	8,4 ^b	A259	5,3 ^a
A162	242,2 ^f	A189	77,8 ^b	A164	45,3 ^a	A257	16,9 ^c	A157	7,5 ^b	A113	5,2 ^a
A224	230,8 ^f	A225	72,4 ^b	A238	44,5 ^a	A154	16,6 ^c	A156	7,4 ^b	A499	5,0 ^a
A327	225,7 ^f	A329	71,7 ^b	A190	43,1 ^a	A314	16,5 ^c	A111	7,4 ^b	A236	5,0 ^a
A161	224,7 ^f	A235	70,3 ^b	A236	39,7 ^a	A259	15,9 ^c	A238	7,1 ^b	A338	5,0 ^a
A190	223,7 ^f	A333	66,2 ^b	A191	39,6 ^a	A161	15,0 ^c	A424	7,0 ^b	A235	5,0 ^a
A257	213,6 ^f	A338	64,7 ^b	A225	37,0 ^a	A156	14,8 ^c	A329	6,9 ^b	A328	5,0 ^a
A316	208,5 ^f	A336	63,3 ^b	A337	36,0 ^a	A336	13,7 ^c	A155	6,8 ^b	A315	5,0 ^a
A126	201,2 ^f	A335	61,5 ^b	A338	35,8 ^a	A327	13,5 ^c	A330	6,7 ^b	A335	4,7 ^a
A259	200,8 ^f	A157	61,2 ^b	A336	33,6 ^a	A316	13,5 ^c	A225	6,6 ^b	A189	4,6 ^a
A113	185,8 ^f	A158	60,6 ^b	A163	30,1 ^a	A238	13,1 ^c	A158	6,5 ^b	A191	4,5 ^a
A125	185,0 ^f	A330	59,0 ^b	A331	27,5 ^a	A338	12,8 ^c	A335	6,5 ^b	A423	4,5 ^a
A328	180,8 ^f	A155	57,9 ^b	A318	25,8 ^a	A190	12,5 ^c	A327	6,4 ^b	A162	4,3 ^a
A336	176,1 ^f	A125	52,4 ^b	A115	23,0 ^a	A125	12,4 ^c	A125	6,1 ^b	A336	4,1 ^a
A424	174,3 ^f	A238	51,0 ^b	A161	20,3 ^a	A224	12,1 ^c	A333	6,1 ^b	A331	3,8 ^a
A337	141,3 ^f	A113	51,0 ^b	A162	18,8 ^a	A236	12,1 ^c	A338	6,0 ^b	A238	3,7 ^a
A111	137,3 ^f	A162	45,2 ^b	A327	18,0 ^a	A337	12,0 ^c	A162	6,0 ^b	A327	3,6 ^a
A236	137,0 ^f	A328	43,2 ^b	A113	17,1 ^a	A126	11,6 ^c	A328	5,6 ^b	A318	3,3 ^a
A235	123,3 ^f	A331	42,9 ^b	A235	16,9 ^a	A235	11,1 ^c	A164	5,4 ^b	A125	2,9 ^a
A331	117,6 ^f	A327	40,0 ^b	A189	15,7 ^a	A113	11,0 ^c	A236	4,3 ^b	A161	2,8 ^a
A423	110,3 ^f	A337	39,0 ^b	A125	15,4 ^a	A111	10,2 ^c	A113	3,6 ^b	A163	2,6 ^a
A164	79,8 ^f	A163	23,8 ^b	A111	8,7 ^a	A164	5,9 ^c	A163	2,6 ^b	A111	1,2 ^a
A163	31,1 ^f	A236	22,5 ^b	A424	4,6 ^a	A163	2,9 ^c	A331	2,4 ^b	A424	0,8 ^a

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

O diâmetro médio, velocidade de crescimento e superfície das colônias após 48 horas de crescimento das 58 linhagens de *Trichoderma* spp. no meio MEA sólido à pH 6,0, com as dosagens de suplementação de cobre de 0, 300 e 1000 mg.L⁻¹ de cobre são apresentados na Tabela 19.

Sem a suplementação de cobre ao meio, as linhagens A359, A403, A282, A511, A408, A512, A482, A358, A319, A308, A320, A510, A247, A515, A196 e A514 apresentaram maiores diâmetro, velocidade de crescimento e superfície das colônias. A variável diâmetro da colônia ainda inclui neste grupo superior as linhagens A458, A229 e A135 e a variável velocidade de crescimento as linhagens A458 e A229. As três variáveis indicam que o grupo de menor crescimento continha as linhagens A481, A412, A483, A411 e A480.

Na dosagem com 300 mg.L⁻¹ de cobre, as três variáveis indicam a linhagem A501 como a de maior crescimento. O segundo grupo de maior crescimento, também concordado pelas três variáveis, foi composto das linhagens A361 e A511. A mesma concordância há no grupo com menor crescimento formado pelas linhagens A404, A410, A405 e A412. Deste grupo, a

linhagem A412 mostrou pequeno crescimento também sem a suplementação de cobre, sugerindo que seu baixo crescimento não se deve apenas a presença da dose de Cu.

Na dosagem de 1000 mg.L⁻¹ de cobre, as linhagens com maiores diâmetros, velocidade de crescimento e superfície de colônia foram A512, A501, A361 e A240 e o segundo grupo de maior crescimento formado pelas linhagens A357 e A511. O grupo de menor crescimento nesta dosagem mais alta de cobre foi formado pelas linhagens A481, A401, A483, A263, A247, A149, A510, A341, A168, A319, A400, A404, A402, A342, A408, A458, A412, A411, A229, A167 e A169.

Tabela 19. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de *Trichoderma* spp. após 48 horas de crescimento em meio extrato de malte-água (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.

Linh.	DM (mm)				SC (cm ²)			
	0	300	1000	0	300	1000	0	300
A359	82,4 a	78,8 a	49,3 a	53,3 a	48,8 a	19,1 a		
A403	82,3 a	73,9 b	47,3 a	53,2 a	42,9 b	17,6 a		
A282	82,0 a	72,3 b	45,7 a	52,8 a	41,1 b	16,7 a		
A511	81,6 a	58,6 c	45,7 a	52,3 a	27,0 c	16,4 a		
A408	81,5 a	56,6 c	43,7 b	52,2 a	25,3 c	15,0 b		
A512	81,3 a	55,0 c	42,2 b	51,9 a	23,8 d	14,0 b		
A482	81,2 a	54,0 c	35,5 c	51,8 a	22,9 d	9,9 c		
A358	81,1 a	52,6 d	33,7 c	51,6 a	21,5 e	8,8 c		
A319	81,0 a	51,2 d	33,3 c	51,6 a	20,6 e	8,8 c		
A308	80,9 a	50,7 d	32,5 c	51,4 a	20,2 e	8,3 c		
A320	80,9 a	50,1 d	30,9 d	51,4 a	19,3 e	7,5 c		
A510	80,5 a	47,6 e	30,8 d	50,9 a	17,7 f	7,5 c		
A247	80,5 a	47,4 e	30,4 d	50,8 a	17,6 f	7,3 c		
A515	80,4 a	47,1 e	30,3 d	50,8 a	17,4 f	7,2 c		
A196	80,4 a	45,1 f	30,0 d	50,7 a	16,7 f	7,1 c		
A514	80,4 a	44,2 f	26,8 e	50,7 a	15,6 g	5,7 d		
A458	79,8 a	44,2 f	25,3 e	50,0 b	15,4 g	5,1 d		
A229	79,8 a	44,0 f	24,7 e	50,0 b	15,3 g	4,8 d		
A135	79,4 a	44,0 f	23,2 f	49,5 b	15,2 g	4,2 d		
A508	79,0 b	43,8 f	23,2 f	48,9 b	15,2 g	4,2 d		
A361	78,5 b	43,5 f	18,9 g	48,4 b	15,2 g	2,8 d		
A409	78,3 b	42,5 g	18,8 g	48,2 b	14,2 g	2,8 d		
A168	78,0 b	42,4 g	18,8 g	47,8 b	14,1 g	2,8 d		
A167	77,7 b	40,8 g	17,8 g	47,5 b	13,7 g	2,5 d		
A401	77,6 b	40,5 g	16,8 g	47,4 b	12,8 h	2,3 e		
A169	76,5 b	38,7 g	16,7 g	46,0 c	11,9 h	2,2 e		
A509	76,4 b	38,1 h	15,5 g	45,9 c	11,6 h	1,9 e		
A501	74,2 c	37,5 h	15,5 g	43,3 d	11,4 h	1,9 e		
A193	74,0 c	36,8 h	14,3 g	43,0 d	10,7 h	1,8 e		
A402	73,8 c	36,8 h	13,8 h	42,9 d	10,6 h	1,6 e		
A377	73,3 c	36,2 h	13,5 h	42,2 d	10,3 h	1,5 e		
A306	72,6 c	35,7 h	13,0 h	41,5 e	10,0 h	1,4 e		
A342	72,6 c	34,6 i	12,6 h	41,4 e	9,5 h	1,3 e		
A459	71,9 c	34,6 i	12,5 h	40,6 e	9,4 h	1,2 e		
A360	71,0 d	34,5 i	12,5 h	39,5 f	9,3 h	1,2 e		
A426	69,9 d	34,3 i	11,8 h	38,3 f	9,3 h	1,1 e		
A149	69,1 d	33,4 i	10,9 h	37,8 f	8,8 h	0,9 e		

Continua...

Continuação da Tabela 19.

DM (mm)						SC (cm ²)					
Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000
A460	67,6 d	A461	33,4 i	A481	10,2 i	A410	36,1 g	A461	8,8 h	A401	0,8 e
A410	66,9 e	A513	33,0 i	A401	9,9 i	A460	35,9 g	A513	8,5 h	A481	0,8 e
A400	66,6 e	A408	31,4 j	A483	9,8 i	A400	34,9 g	A408	7,7 i	A483	0,8 e
A341	65,3 e	A247	30,4 j	A263	9,6 i	A341	33,4 g	A247	7,3 i	A263	0,7 e
A468	61,4 f	A426	30,3 j	A247	9,5 i	A468	29,6 h	A426	7,2 i	A247	0,7 e
A461	61,1 f	A458	28,9 j	A149	9,5 i	A461	29,3 h	A458	6,5 i	A149	0,7 e
A513	61,0 f	A409	26,5 k	A510	9,3 i	A513	29,2 h	A168	5,6 j	A510	0,7 e
A405	60,6 f	A168	26,5 k	A341	9,0 i	A405	28,9 h	A409	5,6 j	A341	0,6 e
A263	60,0 f	A169	26,0 k	A168	8,4 i	A263	28,3 h	A169	5,4 j	A168	0,6 e
A404	59,8 f	A401	25,9 k	A319	8,3 i	A404	28,1 h	A401	5,3 j	A319	0,5 e
A240	59,6 f	A481	22,4 l	A400	8,3 i	A240	27,9 h	A481	3,9 j	A400	0,5 e
A399	57,4 g	A263	22,3 l	A404	8,0 i	A399	25,9 h	A263	3,9 j	A404	0,5 e
A357	56,3 g	A483	21,5 l	A402	8,0 i	A357	24,9 i	A483	3,6 j	A402	0,5 e
A406	55,0 h	A411	19,9 l	A342	8,0 i	A406	23,8 i	A411	3,1 k	A342	0,5 e
A307	53,8 h	A341	13,4 n	A408	8,0 i	A307	22,8 i	A341	1,4 k	A408	0,5 e
A407	52,4 h	A402	12,9 n	A458	8,0 i	A407	21,6 i	A402	1,4 k	A458	0,5 e
A481	50,6 i	A342	12,7 n	A412	8,0 i	A481	20,1 j	A342	1,3 k	A412	0,5 e
A412	49,4 i	A404	10,4 n	A411	8,0 i	A412	19,2 j	A404	0,9 k	A411	0,5 e
A483	48,6 i	A410	10,2 n	A229	8,0 i	A483	18,5 j	A410	0,8 k	A229	0,5 e
A411	46,4 i	A405	10,0 n	A167	8,0 i	A480	17,1 j	A405	0,8 k	A167	0,5 e
A480	46,2 i	A412	8,0 n	A169	8,0 i	A411	16,9 j	A412	0,5 k	A169	0,5 e

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

O peso de micélio fresco e seco das colônias de *Trichoderma* spp. é apresentado na Tabela 20. No controle de MEA sem suplementação de Cu, as linhagens A341 e A401 apresentaram as maiores massa fresca e as linhagens A308 e A402 as maiores massa secas. No grupo de massas mais leves ficaram as linhagens A482, A412, A196, A361, A193, A360, A240, A481, A483, A411, A400 e A480 para massa fresca e para a massa seca as linhagens A320, A410, A407, A481, A263, A483, A480, A361, A240, A360, A412 e A458, portanto somente coincidindo 7 linhagens (A240, A360, A361, A412, A480, A481 e A483) de um total de 12.

Portanto, tal como verificado no experimento de *Periconia macrospinoso*, no experimento de *Trichoderma* spp. também houve grande variação dentro dos agrupamentos de linhagens entre as massas fresca e seca dos micélios. No experimento de *Trichoderma* spp pode-se salientar que com a secagem houve a subida para o segundo agrupamento mais pesado da linhagem A149 e a descida para agrupamento mais leve da linhagem A307. Além disso, listando as 19 linhagens que compõem o grupo de maior crescimento de colônia de *Trichoderma* spp (Tabela 19), apenas 7 (A135, A282, A308, A319, A408, A510 e A515) figuram entre as 19 de maiores em massa fresca de micélio e apenas 6 (A196, A229, A358, A359, A510 e A511) figuram entre as 19 maiores de massa seca de micélio. Portanto, a metodologia utilizadas de avaliação da massa de micélio não consegue refletir o crescimento de colônia observado em placa.

Na dosagem com 300 mg.L⁻¹ de suplementação de cobre, a massa fresca dividiu as linhagens em dois grupos de crescimento e a massa seca em três grupos. (Tabela 20). A massa fresca deixou as linhagens A168, A169, A511 e A501 em um grupo de maior crescimento e as demais no outro grupo inferior. A massa seca salientou a linhagem A501 como tendo maior massa, e em um segundo grupo deixou as linhagens A307, A196, A193, A282, A168, A169, A308, A407, A513, A410, A511 e A512, A377 e as demais no outro grupo inferior.

Na dosagem com 1000 mg.L⁻¹ de suplementação de cobre, tanto a massa fresca, quanto a seca não dividiram as linhagens, não apresentando diferenças entre elas pelo teste de Scott Knott 5% (Tabela 20).

Tabela 20. Peso do micélio fresco (PMF) e peso do micélio seco (PMS) de colônias de diferentes linhagens de *Trichoderma* spp. após 48 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.

		PMF (mg)				PMS (mg)					
Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000
A341	606,3 a	A168	142,9 a	A501	59,3 a	A401	73,6 a	A501	57,2 a	A308	7,4 a
A308	587,8 a	A169	140,1 a	A406	45,7 a	A402	67,6 a	A307	12,4 b	A468	6,8 a
A377	542,6 b	A511	138,6 a	A360	28,9 a	A405	59,9 b	A196	12,0 b	A501	4,3 a
A510	532,0 b	A501	126,2 a	A240	26,8 a	A149	58,0 b	A193	10,8 b	A406	3,8 a
A307	474,8 c	A459	73,0 b	A361	24,1 a	A404	54,0 b	A282	9,6 b	A512	3,4 a
A282	332,9 d	A307	72,5 b	A512	22,1 a	A357	52,4 b	A168	9,6 b	A377	2,5 a
A168	327,6 d	A460	67,6 b	A399	21,0 a	A399	47,5 c	A169	9,4 b	A508	2,5 a
A169	321,2 d	A406	66,4 b	A468	20,8 a	A459	43,0 c	A308	9,3 b	A509	2,5 a
A409	286,8 e	A513	61,3 b	A513	19,5 a	A377	41,4 c	A407	9,2 b	A480	2,4 a
A508	282,3 e	A360	47,7 b	A308	19,4 a	A510	40,5 c	A513	8,6 b	A240	1,9 a
A408	279,6 e	A306	43,4 b	A306	16,9 a	A460	39,8 c	A410	7,5 b	A513	1,8 a
A509	273,3 e	A403	41,7 b	A480	16,3 a	A511	35,4 d	A511	6,6 b	A511	1,5 a
A319	265,4 e	A359	40,2 b	A377	15,9 a	A513	32,2 d	A512	6,2 b	A135	1,5 a
A135	260,2 e	A399	40,1 b	A410	13,7 a	A342	30,5 d	A377	6,1 b	A282	1,3 a
A401	253,1 e	A196	39,8 b	A508	13,6 a	A341	30,4 d	A406	5,5 c	A515	1,3 a
A501	245,5 e	A358	38,5 b	A358	13,2 a	A359	26,1 e	A229	5,2 c	A514	1,3 a
A515	233,6 f	A508	38,0 b	A509	13,2 a	A358	25,5 e	A409	5,0 c	A196	1,2 a
A514	233,4 f	A509	36,8 b	A149	12,9 a	A196	24,4 e	A411	4,5 c	A399	1,2 a
A342	226,9 f	A319	36,7 b	A359	12,7 a	A229	23,9 e	A341	4,4 c	A193	1,2 a
A410	221,3 f	A193	36,0 b	A510	12,6 a	A193	22,1 e	A510	4,2 c	A481	1,1 a
A402	219,5 f	A468	34,0 b	A403	10,6 a	A168	17,5 f	A149	3,8 c	A459	1,1 a
A403	204,8 f	A361	33,4 b	A400	10,5 a	A169	17,2 f	A240	3,3 c	A460	1,1 a
A426	203,0 f	A247	32,9 b	A263	8,7 a	A308	15,1 f	A359	3,1 c	A320	1,1 a
A359	195,5 f	A240	32,3 b	A282	8,6 a	A167	14,7 f	A306	3,0 c	A483	1,1 a
A358	193,0 f	A308	30,8 b	A247	8,5 a	A403	14,1 f	A358	3,0 c	A306	1,0 a
A306	192,2 f	A407	30,6 b	A511	8,0 a	A408	11,7 g	A482	2,9 c	A410	1,0 a
A405	190,3 f	A341	29,9 b	A135	7,4 a	A319	9,5 g	A247	2,8 c	A461	0,9 a
A468	185,3 f	A135	29,7 b	A481	7,0 a	A512	9,5 g	A459	2,4 c	A263	0,9 a
A461	177,3 f	A282	28,5 b	A483	6,7 a	A135	9,4 g	A481	2,4 c	A426	0,9 a
A404	175,6 f	A515	27,9 b	A196	6,7 a	A411	9,3 g	A263	2,3 c	A407	0,9 a
A320	175,0 f	A514	27,8 b	A193	6,2 a	A282	9,0 g	A483	2,3 c	A247	0,8 a
A407	152,2 g	A408	26,9 b	A515	6,1 a	A306	8,5 g	A460	2,3 c	A341	0,8 a
A247	151,7 g	A263	26,3 b	A514	6,1 a	A409	8,5 g	A508	2,2 c	A149	0,8 a
A458	147,8 g	A510	26,0 b	A482	5,3 a	A515	8,4 g	A509	2,2 c	A357	0,8 a
A511	137,1 g	A512	26,0 b	A229	4,8 a	A514	8,4 g	A401	2,1 c	A307	0,7 a
A229	133,7 g	A167	25,7 b	A407	4,6 a	A400	8,3 g	A403	2,1 c	A510	0,7 a
A167	122,9 g	A377	25,2 b	A461	4,6 a	A501	8,2 g	A167	2,0 c	A360	0,7 a
A459	115,8 g	A482	24,3 b	A320	4,6 a	A406	8,0 g	A319	1,9 c	A400	0,6 a
A460	106,5 g	A426	23,2 b	A426	4,3 a	A468	7,9 g	A402	1,9 c	A482	0,6 a
A399	106,1 g	A400	22,8 b	A459	4,1 a	A482	7,8 g	A408	1,7 c	A361	0,6 a
A357	98,8 g	A461	21,1 b	A460	3,9 a	A307	7,5 g	A468	1,7 c	A403	0,6 a
A406	97,6 g	A320	20,9 b	A342	3,9 a	A247	7,4 g	A360	1,6 c	A409	0,6 a

Continua...

Continuação da Tabela 20.

Linh.	PMF (mg)				PMS (mg)						
	0	Linh.	300	Linh.	1000	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	1000
A263	97,3 g	A458	19,9 b	A307	3,8 a	A426	7,3 g	A361	1,6 c	A401	0,6 a
A513	96,0 g	A229	16,6 b	A401	3,4 a	A508	7,0 g	A135	1,6 c	A319	0,5 a
A149	92,8 g	A410	16,4 b	A411	3,0 a	A509	6,9 g	A404	1,5 c	A411	0,5 a
A512	87,8 g	A401	16,3 b	A402	3,0 a	A461	6,3 g	A399	1,5 c	A402	0,5 a
A482	70,0 h	A409	16,1 b	A319	2,7 a	A320	6,3 g	A515	1,5 c	A404	0,4 a
A412	65,9 h	A481	15,3 b	A404	2,5 a	A410	6,2 g	A405	1,5 c	A405	0,4 a
A196	63,7 h	A411	15,1 b	A405	2,5 a	A407	5,5 g	A514	1,5 c	A458	0,4 a
A361	63,3 h	A480	15,0 b	A409	2,5 a	A481	5,2 g	A426	1,2 c	A229	0,4 a
A193	57,7 h	A483	14,7 b	A357	1,7 a	A263	5,1 g	A480	1,2 c	A358	0,4 a
A360	47,9 h	A342	11,1 b	A458	1,3 a	A483	5,0 g	A320	1,1 c	A359	0,4 a
A240	34,4 h	A149	9,5 b	A341	1,0 a	A480	3,9 g	A461	1,1 c	A342	0,4 a
A481	33,8 h	A402	8,8 b	A168	0,3 a	A361	2,7 g	A400	1,0 c	A168	0,2 a
A483	32,5 h	A404	7,1 b	A169	0,3 a	A240	2,4 g	A357	1,0 c	A169	0,2 a
A411	24,1 h	A405	6,9 b	A167	0,2 a	A360	2,0 g	A342	0,6 c	A167	0,1 a
A400	20,4 h	A357	1,7 b	A412	0,2 a	A412	1,7 g	A458	0,4 c	A408	0,1 a
A480	19,0 h	A412	0,2 b	A408	0,2 a	A458	0,8 g	A412	0,1 c	A412	0,1 a

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

O índice de tolerância ao cobre das linhagens de *Periconia macrospinoso* e de *Trichoderma* spp. nas dosagens de 300 e 1000 mg.L⁻¹ de cobre no meio são apresentados na Tabela 21. A linhagem de *Periconia macrospinoso* com maior índice de tolerância na dosagem com 300 mg.L⁻¹ de cobre foi a A164, seguida da linhagem A328. Já na dosagem de 1000 mg.L⁻¹ a linhagem com maior índice de tolerância foi a A163, seguida da linhagem A164. Todas foram classificadas como “muito alta” ou “alta” tolerância pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018).

A linhagem de *Trichoderma* spp. com maior índice de tolerância na dosagem com 300 mg.L⁻¹ de cobre, foi a A501, seguida das linhagens A361 e A240 que apresentaram “alta” ou “muito alta” tolerância a esse nível de cobre. Já na dosagem de 1000 mg.L⁻¹ as linhagens com maior índice de tolerância foram a A357 e A240, seguidas das linhagens A480 e A501. Segundo a classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018), essas linhagens apresentaram moderada tolerância a esse nível de cobre.

Tabela 21. Índice de tolerância ao cobre após 120 horas de crescimento (Experimento com linhagens de *Periconia macrospinoso*) ou 48 horas de crescimento (Experimento com linhagens de *Trichoderma* spp.) em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 300 e 1000 mg.L⁻¹ de cobre. Médias em ordem decrescente.

Linhagem	<i>Periconia macrospinoso</i>				<i>Trichoderma</i> spp.			
	300	Linhagem	1000	Linhagem	300	Linhagem	1000	
A164	1,22 a	A163	1,23 a	A501	1,06 a	A357	0,78 a	
A328	1,02 b	A164	0,85 b	A361	0,94 b	A240	0,77 a	
A190	0,88 c	A356	0,68 c	A240	0,92 b	A480	0,67 b	
A423	0,87 c	A330	0,66 c	A511	0,89 c	A501	0,64 b	
A162	0,84 c	A190	0,65 c	A480	0,84 c	A512	0,61 c	
A191	0,83 c	A160	0,65 c	A357	0,84 c	A361	0,58 c	
A333	0,82 c	A329	0,64 c	A407	0,77 d	A399	0,57 c	
A154	0,79 c	A111	0,64 c	A399	0,76 d	A511	0,52 d	
A334	0,79 c	A316	0,63 c	A377	0,74 e	A377	0,48 d	
A373	0,78 c	A423	0,63 c	A229	0,73 e	A406	0,46 e	

Continua...

Continuação da Tabela 21.

<i>Periconia macrospinoso</i>				<i>Trichoderma spp.</i>			
Linhagem	300	Linhagem	1000	Linhagem	300	Linhagem	1000
A499	0,78 c	A424	0,62 c	A459	0,71 e	A407	0,44 e
A259	0,77 c	A337	0,61 d	A460	0,70 e	A468	0,44 e
A257	0,77 c	A125	0,61 d	A308	0,70 e	A196	0,42 f
A314	0,77 c	A333	0,60 d	A468	0,67 f	A193	0,42 f
A157	0,76 c	A191	0,59 d	A406	0,67 f	A359	0,40 f
A155	0,76 c	A499	0,58 d	A196	0,65 f	A358	0,38 f
A335	0,75 c	A162	0,58 d	A193	0,64 f	A482	0,37 f
A356	0,74 c	A126	0,58 d	A307	0,62 g	A403	0,37 f
A332	0,74 c	A327	0,58 d	A512	0,62 g	A360	0,35 f
A317	0,73 c	A328	0,57 d	A403	0,62 g	A307	0,31 g
A337	0,72 d	A238	0,57 d	A306	0,58 g	A135	0,29 g
A111	0,71 d	A225	0,56 d	A167	0,57 h	A513	0,26 g
A329	0,71 d	A158	0,55 d	A400	0,56 h	A459	0,25 h
A327	0,71 d	A336	0,55 d	A513	0,55 h	A460	0,25 h
A125	0,71 d	A334	0,55 d	A359	0,55 h	A515	0,23 h
A238	0,71 d	A226	0,54 d	A514	0,55 h	A514	0,23 h
A160	0,69 d	A259	0,54 d	A515	0,55 h	A320	0,23 h
A224	0,68 d	A257	0,54 d	A461	0,55 h	A461	0,23 h
A330	0,68 d	A314	0,52 d	A320	0,55 h	A405	0,21 h
A189	0,66 d	A235	0,51 d	A358	0,54 h	A481	0,20 h
A113	0,66 d	A159	0,49 e	A319	0,52 h	A483	0,20 h
A258	0,66 d	A189	0,46 e	A360	0,51 i	A426	0,19 h
A158	0,66 d	A373	0,46 e	A149	0,50 i	A308	0,19 h
A236	0,65 d	A236	0,45 e	A282	0,46 j	A409	0,18 i
A156	0,65 d	A318	0,45 e	A482	0,45 j	A411	0,17 i
A318	0,65 d	A154	0,44 e	A509	0,45 j	A410	0,17 i
A315	0,65 d	A372	0,44 e	A508	0,45 j	A509	0,17 i
A126	0,64 d	A447	0,43 e	A481	0,44 j	A508	0,16 i
A163	0,64 d	A302	0,43 e	A483	0,44 j	A306	0,16 i
A226	0,64 d	A115	0,42 e	A426	0,43 j	A412	0,16 i
A355	0,63 e	A124	0,40 e	A135	0,43 j	A263	0,16 i
A235	0,63 e	A113	0,40 e	A411	0,43 j	A282	0,15 i
A115	0,62 e	A156	0,40 e	A510	0,43 j	A149	0,14 i
A159	0,62 e	A335	0,39 e	A408	0,38 k	A341	0,14 i
A336	0,61 e	A224	0,39 e	A247	0,38 k	A404	0,13 j
A161	0,60 e	A332	0,38 e	A263	0,37 k	A401	0,13 j
A447	0,60 e	A157	0,37 e	A458	0,36 k	A400	0,12 j
A302	0,60 e	A315	0,37 e	A168	0,34 k	A247	0,12 j
A372	0,60 e	A155	0,37 e	A169	0,34 k	A510	0,11 j
A260	0,59 e	A260	0,36 e	A409	0,34 k	A342	0,11 j
A316	0,58 e	A161	0,35 f	A401	0,33 k	A402	0,11 j
A225	0,58 e	A258	0,34 f	A341	0,21 l	A168	0,11 j
A424	0,57 e	A237	0,32 f	A342	0,18 l	A169	0,10 j
A338	0,56 e	A355	0,31 f	A402	0,18 l	A167	0,10 j
A124	0,53 e	A338	0,30 f	A404	0,17 l	A319	0,10 j
A237	0,52 e	A317	0,28 f	A405	0,17 l	A229	0,10 j
A331	0,23 f	A331	0,21 f	A412	0,16 l	A458	0,10 j
				A410	0,16 l	A408	0,10 j

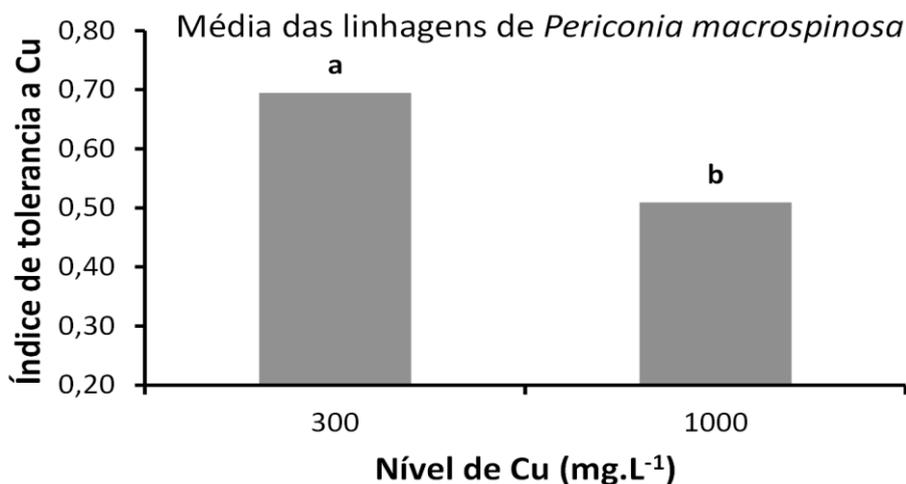
Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem. Segundo Oladipo et al., (2018), os valores de classificação do índice de tolerância indicam: 0,00 – 0,39 – Tolerância muito baixa ao metal. 0,40 – 0,59 – Tolerância baixa ao metal. 0,60 – 0,79 – Tolerância moderada ao metal. 0,80 – 0,99 – Tolerância alta ao metal. 1,00 = > 1,00 – Tolerância muito alta ao metal.

O efeito principal para os níveis de cobre na análise de variância do índice de tolerância é apresentado na Figura 4. O índice de tolerância médio das linhagens diminuiu da menor dose de Cu para a maior, como é normal acontecer. Exceções a esse comportamento ocorreu apenas em 17 linhagens de *Periconia macrospinoso* (A111, A125, A126, A154, A158, A160, A162, A225, A226, A316, A329, A330, A331, A336, A337, A356 e A424) que não apresentaram diferenças entre os índices de tolerância entre as duas dosagens de cobre e a uma única linhagem (A163) que aumentou o índice de tolerância da dosagem 300 para 1000 mg.L⁻¹ (Tabela 21). O comportamento das linhagens de *Trichoderma* spp foi mais uniforme, e a maioria mostrou redução do índice de tolerância da dose 300 para a 1000 mg.L⁻¹. Apenas as linhagens A404, A405, A410, A412 e A512 não mostraram essa redução tendo índices de tolerância que não diferiam entre as doses de Cu (Tabela 21).

A magnitude do índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinoso* e de *Trichoderma* spp mostraram maior tolerância ao Cu das linhagens de *Periconia macrospinoso*, a qual apresentou índices de tolerância maiores em ambas as concentrações de cobre no meio (Figura 4.).

Linhagens de *Trichoderma harzianum* apresentaram índice de tolerância de 1,32 e 1,27 respectivamente para as doses de 150 e 1000 mg.L⁻¹ de Cu (OLADIPO et al., 2018), superiores às observadas no presente estudo, onde o máximo foi obtido na linhagem A501, que apresentou índice de tolerância 1,06. Índices de tolerância comparáveis aos obtidos por Oladipo et al. (2018) foram obtidos no presente estudo apenas para as linhagens de *Periconia macrospinoso* A164 (1,22) na dose 300 e A163 (1,23) na dose 1000 mg.L⁻¹ (Tabela 21).

(I)



Continua a **Figura 4** na próxima página...

Continuação da **Figura 4**.

(II)

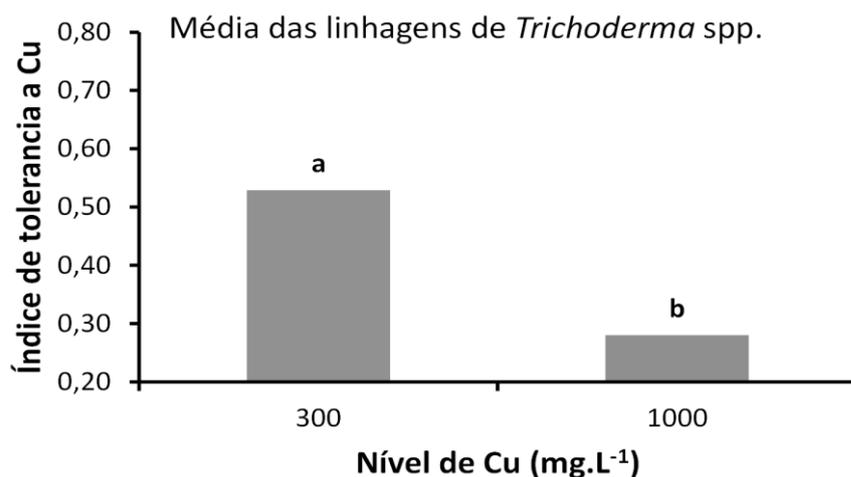


Figura 4. Índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinosa* (I) ver pg. 58) e de *Trichoderma* spp (II) para cada nível de Cu (Efeito principal para nível de Cu na análise de variância). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre níveis de Cu pelo teste de Scott Knott 5%.

A menor tolerância das linhagens de *Trichoderma* no presente estudo, quando comparado a tolerância a vários metais pesados em concentrações variadas encontradas por Oladipo et al. (2018) indicam a influência do local de isolamento, pois esses autores isolaram de sítios de mineração e as do presente estudo de áreas agrícolas, embora os solos agrícolas possam ser contaminados com cobre de diferentes maneiras, sendo a mais comum o uso exagerado de fungicidas cúpricos. Petrović et al. (2014) observaram que o crescimento da maioria das linhagens de *Trichoderma* isoladas de diferentes ecossistemas foi inibido de 20 a 80% por concentrações de cobre variando de 0,5 a 1 mmol L⁻¹ de Cu (II) no meio.

Assim, a avaliação do crescimento do micélio de linhagens fúngicas na presença de cobre é uma estratégia de caracterização que pode servir tanto para isolados de solos agrícolas quanto para solos com outros tipos de contaminação por cobre. Os isolados caracterizados com maior crescimento em altas doses de cobre possuem uma melhor aptidão para a biorremediação deste metal. Além disso, *Trichoderma harzianum* também foi identificado como um agente eficaz na bioconversão de resíduos sólidos, pois produz enzimas extracelulares (RAHMAN et al., 2011), sendo que esses resíduos geralmente estão contaminados por metais.

Os microrganismos tolerantes a cobre podem possuir várias estratégias de sobrevivência diretas ou indiretas, havendo o exemplo de uma, que é a síntese de metalotioneínas ou peptídeos c-glutamil, a qual é um mecanismo de resistência ao cobre verificado em *Saccharomyces cerevisiae*. Essa proteína liga ou precipita o Cu ao redor da parede celular desta levedura, o que impede seu transporte intracelular (GADD; WHITE, 1989). Outro mecanismo foi demonstrado pela ligação do íon Cu (II) à superfície da parede celular de *Trichoderma viride*, sendo esse um mecanismo de tolerância ao metal que torna-o menos disponível ao meio ambiente e às plantas (ANAND et al., 2006). Esse mecanismo é beneficiado por um bom desenvolvimento do micélio, o qual auxilia no processo de absorção e retenção de metais.

4.3.3 Tolerância ao excesso de zinco

Foram estudadas quanto a tolerância ao excesso de zinco 114 linhagens de fungos endofíticos das raízes de cana-de-açúcar, sendo 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* e 57 linhagens de *Trichoderma* spp., utilizando o meio Extrato de Malte Ágar (MEA) com ajuste para pH 6,0, contendo três concentrações de de zinco.

O crescimento das colônias das 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* é apresentado na Tabela 22. Ao Observar o controle com MEA sem suplementação de Zn, a linhagem A331 apresentou maior diâmetro médio e velocidade de crescimento* da colônia do que as demais linhagens de *Periconia macrospinoso*. A superfície de colônia adicionou junto com essa, a linhagem A335. As linhagens no grupo de menor crescimento ou mais lentas foram A333, A334 e A163.

Na dose de 400 mg.L⁻¹ de zinco, as linhagens com maiores diâmetros e velocidade de crescimento de colônia foram A318, A226, A158, A159, A373 e A156. Para superfície de colônia o grupo de maior desenvolvimento continha apenas as linhagens A318 e A226. O grupo de menor diâmetro e velocidade de crescimento continha as linhagens A155 e A331.

Na dose de 600 mg.L⁻¹ de zinco as linhagens com maiores diâmetros e velocidade de crescimento de colônia foram A158, A314, A315, A330, A161, A302, A373, A162 e A372. O grupo com menor diâmetro e velocidade de crescimento agrupou as linhagens A225, A355, A190, A257, A337, A336, A224, A258, A260, A235, A328, A335, 338, A329, A331, A327, A333, A447 e A334. A superfície de colônia separou na dose 600 as linhagens em apenas três grupos, sendo de maior crescimento as linhagens A158, A302, A314, A315, A330, A161 e A373. De crescimento intermediário com as linhagens A162, A372, A191, A189, A113 e A111 e o de menor crescimento com as demais linhagens.

Tabela 22. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de *Periconia macrospinoso* após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 0, 400 e 600 mg.L⁻¹ de zinco. Médias em ordem decrescente.

Linh.	DM (mm)				SC (cm ²)						
	0	Linh.	400	Linh.	600	Linh.	0	Linh.	400	Linh.	600
A331	51,8 a	A318	42,3 a	A158	32,7 a	A331	20,8 a	A318	14,0 a	A158	8,4 a
A335	47,6 b	A226	42,2 a	A314	30,5 a	A335	20,3 a	A226	14,0 a	A302	7,7 a
A226	45,5 b	A158	39,9 a	A315	30,2 a	A226	16,2 b	A158	12,5 b	A314	7,4 a
A318	44,8 b	A159	39,5 a	A330	30,0 a	A318	15,8 b	A159	12,2 b	A315	7,1 a
A237	44,1 b	A373	39,0 a	A161	29,9 a	A237	15,3 b	A373	11,9 b	A330	7,1 a
A157	44,0 b	A156	38,6 a	A302	29,0 a	A157	15,2 b	A156	11,7 b	A161	7,1 a
A160	42,6 c	A447	38,2 b	A373	28,6 a	A160	14,3 b	A447	11,5 b	A373	6,4 a
A424	42,4 c	A328	38,0 b	A162	27,2 a	A424	14,1 b	A328	11,4 b	A162	5,8 b
A330	42,1 c	A314	37,9 b	A372	27,0 a	A330	14,0 b	A314	11,3 b	A372	5,7 b
A154	42,1 c	A372	37,8 b	A113	23,2 b	A154	13,9 b	A372	11,2 b	A191	4,6 b
A314	42,0 c	A237	37,2 b	A111	23,0 b	A314	13,8 b	A237	10,9 b	A189	4,3 b
A328	41,9 c	A161	37,1 b	A156	22,4 b	A328	13,8 b	A161	10,8 b	A113	4,2 b
A156	41,9 c	A315	36,5 b	A189	22,1 b	A156	13,8 b	A315	10,4 b	A111	4,2 b
A332	41,6 c	A157	36,2 b	A191	21,9 b	A329	13,5 c	A157	10,4 b	A156	3,9 c
A191	41,5 c	A327	34,1 b	A163	21,8 b	A332	13,5 c	A327	9,4 c	A163	3,7 c
A238	41,3 c	A162	33,8 b	A126	21,4 b	A191	13,5 c	A162	8,9 c	A124	3,6 c
A315	41,3 c	A225	33,1 c	A124	21,3 b	A315	13,4 c	A225	8,6 c	A126	3,6 c
A447	41,2 c	A113	32,8 c	A115	21,1 b	A238	13,4 c	A113	8,5 c	A115	3,5 c
A329	41,0 c	A111	32,7 c	A332	20,4 b	A447	13,3 c	A111	8,4 c	A332	3,3 c

Continua...

* Variável apresentada na tabela 30 para *Periconia macrospinoso* e na tabela 31 para *Trichoderma* spp.

Continuação da Tabela 22.

DM (mm)						SC (cm ²)					
Linh.	0	Linh.	400	Linh.	600	Linh.	0	Linh.	400	Linh.	600
A317	40,9 c	A224	32,2 c	A236	20,1 b	A317	13,2 c	A259	8,3 c	A236	3,2 c
A158	40,8 c	A259	32,0 c	A125	19,4 b	A158	13,1 c	A330	8,2 c	A125	3,0 c
A302	40,5 c	A330	31,8 c	A356	18,3 c	A302	12,9 c	A224	8,2 c	A499	2,7 c
A159	39,7 c	A355	31,5 c	A499	18,2 c	A159	12,4 c	A355	8,0 c	A356	2,7 c
A316	39,7 c	A190	31,2 c	A317	18,1 c	A316	12,4 c	A257	7,9 c	A317	2,6 c
A423	39,5 c	A257	31,1 c	A154	17,2 c	A423	12,3 c	A190	7,7 c	A155	2,5 c
A327	39,4 c	A236	30,8 c	A316	16,9 c	A327	12,2 c	A258	7,5 d	A154	2,3 c
A161	39,3 c	A258	30,3 c	A226	16,4 c	A164	12,1 c	A236	7,4 d	A316	2,2 c
A164	39,3 c	A124	30,2 c	A157	15,4 c	A161	12,1 c	A164	7,3 d	A226	2,1 c
A259	39,1 c	A115	30,1 c	A155	15,1 c	A259	12,0 c	A124	7,2 d	A157	1,9 c
A257	38,3 c	A164	29,4 d	A237	15,0 c	A257	11,5 c	A115	7,1 d	A237	1,8 c
A373	38,1 c	A499	29,2 d	A424	14,9 c	A373	11,4 d	A499	6,7 d	A424	1,8 c
A190	37,7 c	A336	28,9 d	A159	14,8 c	A190	11,2 d	A336	6,6 d	A423	1,7 c
A258	37,5 c	A260	28,6 d	A423	14,8 c	A258	11,0 d	A260	6,6 d	A159	1,7 c
A372	36,8 d	A424	28,2 d	A238	14,4 c	A372	10,6 d	A424	6,3 d	A318	1,6 c
A225	36,3 d	A332	28,2 d	A318	14,4 c	A225	10,4 d	A332	6,2 d	A238	1,6 c
A113	36,1 d	A235	28,1 d	A259	14,3 c	A113	10,2 d	A235	6,2 d	A259	1,6 c
A111	36,0 d	A317	27,8 d	A164	14,2 c	A111	10,2 d	A160	6,2 d	A164	1,6 c
A337	35,8 d	A125	27,7 d	A160	14,1 c	A155	10,1 d	A317	6,0 d	A160	1,6 c
A162	35,7 d	A160	27,5 d	A225	13,6 d	A337	10,1 d	A125	6,0 d	A225	1,5 c
A189	35,7 d	A191	26,7 d	A355	13,5 d	A162	10,0 d	A191	5,6 d	A190	1,4 c
A224	35,4 d	A316	26,5 d	A190	13,5 d	A189	10,0 d	A316	5,5 d	A355	1,4 c
A155	35,4 d	A154	26,4 d	A257	13,5 d	A224	9,9 d	A154	5,5 d	A257	1,4 c
A355	35,3 d	A126	25,9 d	A337	13,3 d	A355	9,8 d	A126	5,3 d	A337	1,4 c
A260	35,0 d	A356	25,7 d	A336	13,1 d	A336	9,6 d	A356	5,2 d	A336	1,4 c
A235	34,6 d	A302	25,7 d	A224	12,7 d	A260	9,6 d	A302	5,1 d	A224	1,3 c
A336	34,2 d	A163	22,1 e	A258	12,6 d	A235	9,4 d	A163	3,9 e	A258	1,3 c
A124	33,2 d	A238	22,0 e	A260	12,6 d	A124	8,6 d	A238	3,8 e	A260	1,3 c
A338	33,2 d	A337	20,5 e	A235	12,1 d	A338	8,6 d	A337	3,4 e	A235	1,2 c
A115	33,1 d	A335	19,7 e	A328	12,1 d	A115	8,6 d	A335	3,0 e	A328	1,2 c
A126	32,7 d	A189	19,6 e	A335	12,0 d	A126	8,5 d	A189	3,0 e	A335	1,1 c
A236	31,9 d	A423	19,3 e	A338	12,0 d	A236	8,0 e	A423	2,9 e	A338	1,1 c
A356	31,9 d	A334	18,7 e	A329	11,3 d	A356	8,0 e	A333	2,9 e	A331	1,0 c
A125	30,4 e	A333	18,5 e	A331	11,2 d	A125	7,3 e	A334	2,8 e	A329	1,0 c
A499	29,6 e	A338	18,3 e	A327	11,1 d	A499	7,0 e	A338	2,7 e	A327	1,0 c
A333	27,1 f	A329	15,3 e	A333	9,3 d	A333	5,8 f	A329	1,8 e	A333	0,7 c
A334	25,8 f	A155	11,9 f	A447	8,9 d	A334	5,2 f	A155	1,4 e	A447	0,6 c
A163	23,5 f	A331	8,0 f	A334	8,4 d	A163	4,4 f	A331	0,5 e	A334	0,6 c

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

O diâmetro médio e a superfície das colônias das 57 linhagens de *Trichoderma* spp. é apresentado na Tabela 23. Ao observar o controle com MEA sem suplementação de Zn, as linhagens de maior diâmetro, velocidade de crescimento e superfície das colônias foram A511, A514, A510, A358, A482, A480, A307 e A360. As linhagem de *Trichoderma* com menor desenvolvimento foi a A169, antecedidas pelas linhagens A401, A403 e A341.

Na dosagem 300 mg.L⁻¹ de zinco, as linhagens com maiores diâmetros e velocidade de crescimento foram A360, A514, A510, A511, A307, A460, A480, A358 e A482. A superfície de colônia dividiu essas linhagens em dois grupos. O grupo seguinte, nas três variáveis, foi composto pelas linhagens A483, A468 e A240. A linhagem com menor diâmetro, velocidade de crescimento e superfície de colônia foi a A341.

Na dosagem 400 mg.L⁻¹ de zinco, a linhagem com maior diâmetro, velocidade de crescimento e superfície de colônia foi a A240. Essa linhagem foi seguida pelas linhagens A481, A468, A483, A263, A480, A357, A410 e A482 formando um ou dois grupos dependendo

da variável. A linhagem com menor diâmetro da colônia e velocidade de crescimento foi a A341. Como a linhagem A341 apresentou baixo crescimento mesmo sem os níveis de zinco, seu baixo desempenho no experimento não foi atribuído apenas a baixa tolerância a esse metal.

O zinco é um nutriente essencial. Absorvido e assimilado entra nas necessidades celulares e atividades do metabolismo do organismo. Porém, com a elevação das doses de zinco nota-se uma redução drástica do diâmetro de colônia de fungos. De acordo com Fomina et al. (2005) as propriedades responsáveis pelo crescimento dos fungos são comprometidas com acúmulo de Zn na parede celular, a qual é a primeira barreira aos metais tóxicos.

No caso das linhagens de *Trichoderma* do presente trabalho, na dosagem de 400 mg.L⁻¹ de zinco houve uma redução de 27 a 64% em relação ao diâmetro do controle sem Zn. Portanto, as linhagens estudadas são muito menos tolerantes ao zinco que o isolado *Trichoderma sp* do estudo de Ayad et al. (2018), o qual na dose de 800 mg.L⁻¹ de zinco apresentou 53 mm de diâmetro de colônia, sua inibição começou a partir de 1000 mg.L⁻¹, sendo que registrou crescimento até a dose grande de 4000 mg.L⁻¹. Por outro lado, as linhagens são mais tolerantes que as linhagens de *Trichoderma sp.* do estudo de Ting; Jioe (2016) que mostraram tolerância apenas até 100 mg.L⁻¹ de Zn apresentando diâmetro de colônia de 80 mm. Com 200 mg.L⁻¹ o diâmetro foi reduzido para 43 mm (TING; JOE, 2016).

As linhagens, A149, A169 e A357 apresentaram uma redução do diâmetro e velocidade de crescimento na dose 300 mg.L⁻¹ de zinco, mas retomaram o desenvolvimento na dose 400 mg.L⁻¹ de zinco. Esse comportamento pode ser devido ao observado por Ayad et al. (2018), que Zn é tóxico e retarda a expansão do micélio em concentrações intermediárias até haver uma retomada do desenvolvimento dos fungos, então apresentando hifas mais espessas. Os autores observaram nas colônias a presença de uma zona de inibição de crescimento evidenciada por uma marca circular amarela, seguida de uma zona de esporulação e externamente a esse círculo o micélio volta a aumentar a velocidade de crescimento. Quando havia o aumento das doses de zinco havia novamente a inibição e redução de velocidade, sendo que Ayad et al. (2018) observaram a dosagem máxima tolerada de 4000 mg.L⁻¹. O autores sugerem que por zinco ser um elemento essencial para os organismos, ele se torna tóxico apenas em alta concentração (AYAD et al., 2018). Esse comportamento descrito por Ayad et al. (2018) corrobora o estudo de Lanfranco et al. (2006) o qual relata que altas concentrações de zinco alteravam a morfologia das hifas e que as mais características mudanças das hifas tratadas com zinco eram os aumentos gerais na ramificação, inchaço e septação.

Tabela 23. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de *Trichoderma spp.* após 48 horas de crescimento em meio extrato de malte-água (MEA) com 0, 300 e 400 mg.L⁻¹ de zinco. Médias em ordem decrescente.

DM (mm)					SC (cm ²)						
Linh.	0	Linh.	300	Linh.	400	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	400
A511	84,9 a	A360	81,6 a	A240	61,8 a	A511	56,7 a	A360	52,3 a	A240	30,0 a
A514	82,7 a	A514	81,5 a	A481	54,3 b	A514	53,7 a	A514	52,2 a	A481	22,9 b
A510	81,0 a	A510	81,5 a	A468	51,3 b	A510	51,6 a	A510	52,2 a	A468	20,7 b
A358	81,0 a	A511	80,1 a	A483	50,8 b	A358	51,6 a	A511	50,4 a	A483	20,3 b
A482	80,9 a	A307	79,2 a	A263	48,9 c	A482	51,4 a	A307	49,3 a	A263	18,7 b
A480	80,7 a	A460	78,3 a	A480	48,0 c	A480	51,2 a	A460	48,2 b	A480	18,2 b
A307	80,6 a	A480	77,2 a	A357	47,5 c	A307	51,1 a	A480	46,7 b	A357	17,7 b
A360	79,7 a	A358	75,9 a	A410	47,1 c	A360	49,9 a	A358	45,5 b	A410	17,4 b
A426	78,9 b	A482	75,8 a	A482	47,0 c	A426	48,9 b	A482	45,3 b	A482	17,3 b
A513	78,6 b	A483	71,5 b	A306	44,4 d	A410	48,8 b	A483	40,4 c	A306	15,6 c

Continua...

Continuação da Tabela 23.

DM (mm)						SC (cm ²)					
Linh.	0	Linh.	300	Linh.	400	Linh.	0	Linh.	300	Linh.	400
A410	78,3 b	A468	69,3 b	A459	43,8 d	A513	48,5 b	A468	37,9 c	A459	15,2 c
A263	77,9 b	A240	68,8 b	A511	43,7 d	A263	47,8 b	A240	37,2 c	A511	15,0 c
A483	77,8 b	A399	65,8 c	A168	43,3 d	A483	47,5 b	A399	34,3 d	A168	14,7 c
A501	77,4 b	A406	64,5 c	A196	43,3 d	A501	47,0 b	A406	32,8 d	A196	14,7 c
A512	77,0 b	A263	64,1 c	A409	42,7 d	A512	46,6 b	A263	32,4 d	A409	14,4 c
A406	76,9 b	A481	62,0 c	A460	42,3 d	A406	46,5 b	A481	31,3 d	A460	14,1 c
A412	76,5 b	A359	58,0 d	A458	41,2 d	A306	46,3 b	A359	26,9 e	A458	13,3 c
A306	76,5 b	A410	55,4 d	A412	40,7 e	A412	46,0 b	A410	24,1 f	A399	13,1 c
A509	75,9 b	A405	54,9 d	A399	40,6 e	A481	45,3 c	A405	23,8 f	A412	13,1 c
A458	75,9 b	A412	53,8 d	A405	39,7 e	A509	45,2 c	A412	22,8 f	A405	12,4 c
A481	75,8 b	A461	53,3 d	A408	39,4 e	A458	45,2 c	A461	22,3 f	A408	12,2 c
A361	75,2 c	A168	51,6 d	A461	38,4 e	A361	44,4 c	A168	21,0 f	A461	11,6 c
A460	74,3 c	A458	51,1 d	A402	37,8 e	A240	43,4 c	A458	20,5 f	A402	11,3 c
A319	74,2 c	A459	49,7 e	A359	36,2 e	A460	43,4 c	A459	19,9 f	A359	10,9 c
A240	73,8 c	A377	47,7 e	A514	34,6 f	A319	43,3 c	A377	18,0 g	A514	9,7 d
A135	73,5 c	A408	45,6 f	A411	34,1 f	A135	42,4 c	A408	16,4 g	A411	9,1 d
A468	73,0 c	A357	44,2 f	A404	32,6 f	A468	41,9 c	A357	15,4 g	A247	8,3 d
A411	72,9 c	A306	43,8 f	A247	32,4 f	A411	41,7 c	A306	15,2 g	A404	8,3 d
A282	72,9 c	A247	42,8 f	A406	32,4 f	A282	41,6 c	A247	14,4 g	A406	8,2 d
A196	71,6 c	A167	41,7 f	A501	30,4 f	A196	40,6 d	A167	14,0 g	A501	7,3 d
A400	71,5 c	A512	39,1 g	A149	29,9 f	A400	40,2 d	A512	12,7 h	A149	7,1 d
A149	71,1 c	A400	38,7 g	A377	29,7 f	A149	39,7 d	A400	11,7 h	A377	7,0 d
A399	70,4 c	A409	37,5 g	A400	28,6 g	A399	39,0 d	A196	11,1 h	A400	6,5 d
A320	69,9 c	A196	37,4 g	A307	28,5 g	A320	38,5 d	A409	11,0 h	A307	6,4 d
A357	68,5 c	A402	36,0 g	A320	28,3 g	A357	37,0 d	A402	10,3 h	A320	6,3 d
A409	64,8 d	A319	35,9 g	A319	27,4 g	A409	33,0 e	A319	10,3 h	A510	6,1 d
A167	64,3 d	A282	34,4 g	A513	27,1 g	A167	32,4 e	A282	9,4 h	A319	5,9 d
A402	63,2 d	A411	34,1 g	A510	27,1 g	A402	31,4 e	A411	9,1 h	A513	5,8 d
A168	62,5 d	A501	34,0 g	A167	26,3 g	A168	30,7 e	A501	9,1 h	A167	5,4 e
A247	61,9 d	A320	33,2 g	A358	26,1 g	A247	30,1 e	A320	8,6 h	A358	5,4 e
A515	60,7 d	A426	33,1 g	A426	25,9 g	A515	29,0 e	A426	8,6 h	A426	5,3 e
A405	59,9 d	A404	32,3 g	A282	25,8 g	A405	28,2 e	A404	8,3 h	A282	5,3 e
A459	59,6 d	A509	30,7 h	A193	24,8 g	A459	28,0 e	A509	7,4 i	A193	4,9 e
A342	58,8 d	A361	29,3 h	A229	24,4 g	A342	27,1 f	A361	6,7 i	A401	4,7 e
A193	57,8 e	A513	28,8 h	A401	24,3 g	A193	26,3 f	A513	6,5 i	A229	4,5 e
A359	57,3 e	A135	28,0 h	A509	23,4 h	A359	25,8 f	A135	6,2 i	A169	4,4 e
A408	56,2 e	A308	26,9 h	A169	23,3 h	A408	25,0 f	A308	5,7 i	A509	4,3 e
A461	55,4 e	A515	25,6 i	A361	22,6 h	A461	24,1 f	A403	5,3 i	A361	4,0 e
A308	55,3 e	A403	25,5 i	A135	21,8 h	A308	24,0 f	A515	5,2 i	A135	3,8 e
A508	54,2 e	A229	25,4 i	A342	21,2 h	A508	23,1 f	A508	5,2 i	A342	3,5 e
A377	53,0 e	A169	25,3 i	A308	20,7 h	A377	22,1 f	A229	5,1 i	A308	3,4 e
A404	52,3 e	A508	25,0 i	A515	20,7 h	A404	21,5 f	A169	5,0 i	A515	3,4 e
A229	47,5 f	A401	24,8 i	A360	20,1 h	A229	18,3 g	A401	4,8 i	A360	3,3 e
A401	41,7 g	A193	23,3 i	A512	18,2 i	A401	13,8 g	A149	4,2 i	A512	2,6 e
A403	37,1 g	A342	22,8 i	A508	16,5 i	A403	10,8 h	A193	4,2 i	A508	2,1 e
A341	36,2 g	A149	21,8 i	A403	16,0 i	A341	10,3 h	A342	4,1 i	A403	2,1 e
A169	22,4 h	A341	9,0 j	A341	8,0 j	A169	3,9 i	A341	0,6 i	A341	0,5 e

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

Os índices de tolerância ao zinco pelas linhagens de *Periconia macrospinoso* e *Trichoderma* spp. são apresentados na tabela 24 Para *Periconia macrospinoso* na dosagem com 400 mg.L⁻¹ de zinco, as linhagens com maiores índice de tolerância (IT) foram A372, A373, A499, A159, A158, A236, A163, A162, A161, A318, A226, A447, A156, A113, A124, A115, A111, A125, A225, A328, A224, A314, A336, A355 e A315 e a linhagem de menor índice foi A331.

Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018), apenas as linhagens A372, A373 e A499 apresentaram tolerância “muito alta” na dose 400 mg.L⁻¹. A maioria das linhagens apresentaram uma tolerância “alta”. As linhagens A126, A330, A164, A334, A332, A333, A317, A316, A424, A191, A160, A302 e A154 apresentaram tolerância “moderada”, as

linhagens A337, A338, A189, A238, A423, A335 e A329 apresentaram tolerância “baixa” e as linhagens A155 e A331 apresentaram tolerância “muito baixa” ao nível de 400 mg.L⁻¹ de Zn.

Na dose de 600 mg.L⁻¹ a linhagem de *Periconia macrospinoso* com maior índice de tolerância ao zinco foi a A163 com IT de 0,94, seguidas pelo segundo maior grupo de tolerantes com as linhagens A158, A161, A162, A373, A372, A315, A314, A330 e A302 com IT entre 0,80 e 0,71 e os de menores índices de tolerância foram das linhagens A332, A317, A316, A155, A336, A154, A355, A225, A423, A159, A337, A259, A164, A226, A260, A338, A224, A190, A424, A235, A157, A257, A238, A333, A237, A258, A160, A334, A318, A329, A335, A328, A327, A331 e A447 com variação IT= 0,49 à 0,22.

Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018) nenhuma linhagens apresentou tolerância “muito alta” na dose 600 mg.L⁻¹ de Zn. As linhagens A163, A158, A161, A162, A373, A372, A315, A314, A330, A302, A126, A124, A113, A115, A111, A125, A236, A189 e A499 apresentaram uma tolerância “alta” e as linhagens A356, A156, A191, A332, A317, A316, A155, A336 e A154 apresentaram tolerância “moderada”. A maioria das linhagens apresentaram tolerância “muito baixa” ao nível de 600 mg.L⁻¹ de Zn.

No experimento com linhagens de *Trichoderma* spp., na dosagem com 300 mg.L⁻¹ de zinco, as linhagens com maior índice de tolerância foram A169, A460, A360, A359 e A510, com IT entre 1,13 e 1,01. Essas linhagens foram seguidas pelas linhagens A514, A307, A461, A480, A240, A468, A511, A399, A482, A358, A405 e A483 como segundo grupo de maior índice de tolerância. As linhagens com menor índice foram A149 e A341.

Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018), o primeiro grupo separado pelo teste de Scott Knott listado no parágrafo anterior, as linhagens apresentaram tolerância “muito alta” a dose 300 mg.L⁻¹. As linhagens A514, A307, A461, A480, A240, A468, A511, A399, A482, A358, A405, A483, A377, A406, A459, A263, A168, A408 e A481 apresentam uma tolerância “alta”; as linhagens A410, A412, A403, A247, A458, A167, A357, A404 e A401 apresentaram tolerância “moderada”; as linhagens A306, A409, A402, A229, A400, A196, A512, A308, A319, A320, A282, A411, A508, A501, A515, A426, A509 e A193 apresentaram tolerância “baixa” e as linhagens A361, A342, A135, A513, A149 e A341 apresentaram tolerância “muito baixa” ao nível de 300 mg.L⁻¹ de Zn.

Na dose de 400 mg.L⁻¹ a linhagem com maior índice de tolerância ao zinco foi a A169, IT=1,04, seguida pela linhagem A240, IT=0,85. As linhagens do grupo com menores índices de tolerância foram A282, A307, A513, A515, A510, A426, A358, A509, A508, A361, A135, A360, A512 e A341.

Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018), apenas a linhagem A169 apresentou tolerância “muito alta” a dose 400 mg.L⁻¹ e apenas a linhagem A240 apresentou uma tolerância “alta”. As linhagens A459, A481, A408, A468, A357, A461, A168, A409, A405, A483, A359, A263, A404, A196, A410 e A402 apresentaram tolerância “moderada”; as linhagens A480, A306, A401, A482, A399, A460, A377, A458, A229, A412, A247, A511, A411, A403, A193, A406, A149, A514, A320, A167 e A400 apresentaram tolerância “baixa” e as linhagens A501, A308, A319, A342, A282, A307, A513, A515, A510, A426, A358, A509, A508, A361, A135, A360, A512 e A341 apresentaram tolerância “muito baixa” ao nível de 400 mg.L⁻¹ de Zn.

Tabela 24. Índice de tolerância ao zinco após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 400 e 600 mg.L⁻¹ de zinco (Experimento com linhagens de *Periconia macrospinoso*) ou após 48 horas de crescimento em MEA com 300 e 400 mg.L⁻¹ de zinco (Experimento com linhagens de *Trichoderma* spp.). Médias em ordem decrescente.

<i>Periconia macrospinoso</i>				<i>Trichoderma</i> spp.			
Linhagem	400	Linhagem	600	Linhagem	300	Linhagem	400
A372	1,03 a	A163	0,94 a	A169	1,13 a	A169	1,04 a
A373	1,03 a	A158	0,80 b	A460	1,06 a	A240	0,85 b
A499	1,00 a	A161	0,76 b	A360	1,02 a	A459	0,74 c
A159	0,99 a	A162	0,76 b	A359	1,01 a	A481	0,72 c
A158	0,98 a	A373	0,75 b	A510	1,01 a	A408	0,71 c
A236	0,97 a	A372	0,74 b	A514	0,99 b	A468	0,71 c
A163	0,96 a	A315	0,73 b	A307	0,98 b	A357	0,70 c
A162	0,95 a	A314	0,73 b	A461	0,96 b	A461	0,70 c
A161	0,95 a	A330	0,71 b	A480	0,96 b	A168	0,69 c
A318	0,94 a	A302	0,71 b	A240	0,95 b	A409	0,66 c
A226	0,93 a	A126	0,67 c	A468	0,95 b	A405	0,66 c
A447	0,93 a	A124	0,65 c	A511	0,95 b	A483	0,66 c
A156	0,92 a	A113	0,65 c	A399	0,94 b	A359	0,63 c
A113	0,92 a	A115	0,64 c	A482	0,94 b	A263	0,63 c
A124	0,92 a	A111	0,64 c	A358	0,94 b	A404	0,63 c
A115	0,92 a	A125	0,64 c	A405	0,92 b	A196	0,61 d
A111	0,92 a	A236	0,64 c	A483	0,92 b	A410	0,61 d
A125	0,92 a	A189	0,62 c	A377	0,90 c	A402	0,60 d
A225	0,91 a	A499	0,61 c	A406	0,84 c	A480	0,59 d
A328	0,91 a	A356	0,58 c	A459	0,83 c	A306	0,59 d
A224	0,91 a	A156	0,53 c	A263	0,83 c	A401	0,58 d
A314	0,90 a	A191	0,53 c	A168	0,83 c	A482	0,58 d
A336	0,90 a	A332	0,49 d	A408	0,82 c	A399	0,58 d
A355	0,89 a	A317	0,44 d	A481	0,82 c	A460	0,57 d
A315	0,89 a	A316	0,43 d	A410	0,72 d	A377	0,56 d
A327	0,86 b	A155	0,42 d	A412	0,70 d	A458	0,54 d
A237	0,85 b	A336	0,42 d	A403	0,70 d	A229	0,53 d
A190	0,83 b	A154	0,41 d	A247	0,69 d	A412	0,53 d
A157	0,82 b	A355	0,38 d	A458	0,67 d	A247	0,53 d
A259	0,82 b	A225	0,38 d	A167	0,65 d	A511	0,51 d
A260	0,82 b	A423	0,37 d	A357	0,65 d	A411	0,47 e
A235	0,81 b	A159	0,37 d	A404	0,62 e	A403	0,44 e
A257	0,81 b	A337	0,37 d	A401	0,60 e	A193	0,43 e
A258	0,81 b	A259	0,36 d	A306	0,58 e	A406	0,42 e
A356	0,81 b	A164	0,36 d	A409	0,58 e	A149	0,42 e
A126	0,80 b	A226	0,36 d	A402	0,57 e	A514	0,42 e
A330	0,76 b	A260	0,36 d	A229	0,56 e	A320	0,41 e
A164	0,74 b	A338	0,36 d	A400	0,54 e	A167	0,41 e
A334	0,73 c	A224	0,36 d	A196	0,53 e	A400	0,40 e
A332	0,69 c	A190	0,36 d	A512	0,51 f	A501	0,39 e
A333	0,68 c	A424	0,35 d	A308	0,49 f	A308	0,37 e
A317	0,68 c	A235	0,35 d	A319	0,49 f	A319	0,37 e
A316	0,67 c	A157	0,35 d	A320	0,49 f	A342	0,36 e
A424	0,67 c	A257	0,35 d	A282	0,47 f	A282	0,35 f
A191	0,65 c	A238	0,35 d	A411	0,47 f	A307	0,35 f
A160	0,64 c	A333	0,34 d	A508	0,46 f	A513	0,34 f
A302	0,64 c	A237	0,34 d	A501	0,44 f	A515	0,34 f

Continua...

Continuação da Tabela 24.

<i>Periconia macrospinoso</i>				<i>Trichoderma</i> spp.			
Linhagem	400	Linhagem	600	Linhagem	300	Linhagem	400
A154	0,63 c	A258	0,34 d	A515	0,42 f	A510	0,33 f
A337	0,57 d	A160	0,33 d	A426	0,42 f	A426	0,33 f
A338	0,55 d	A334	0,32 d	A509	0,40 g	A358	0,32 f
A189	0,55 d	A318	0,32 d	A193	0,40 g	A509	0,31 f
A238	0,53 d	A329	0,30 d	A361	0,39 g	A508	0,30 f
A423	0,49 e	A335	0,29 d	A342	0,39 g	A361	0,30 f
A335	0,46 e	A328	0,29 d	A135	0,38 g	A135	0,30 f
A329	0,41 e	A327	0,28 d	A513	0,37 g	A360	0,25 f
A155	0,35 e	A331	0,23 d	A149	0,31 h	A512	0,24 f
A331	0,16 f	A447	0,22 d	A341	0,25 h	A341	0,22 f

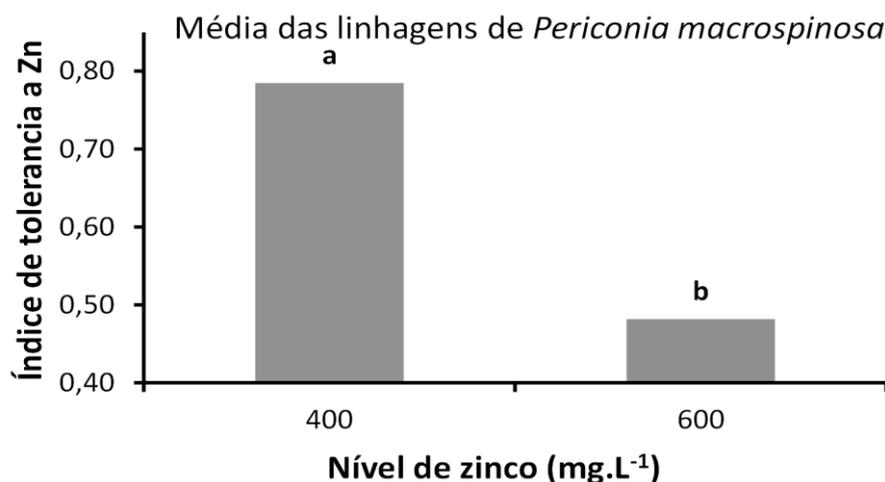
Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem. Segundo Oladipo et al., (2018), os valores de classificação do índice de tolerância indicam: 0,00 – 0,39 – Tolerância muito baixa ao metal. 0,40 – 0,59 – Tolerância baixa ao metal. 0,60 – 0,79 – Tolerância moderada ao metal. 0,80 – 0,99 – Tolerância alta ao metal. 1,00 = > 1,00 – Tolerância muito alta ao metal.

O efeito principal para os níveis de zinco na análise de variância do índice de tolerância é apresentado na figura 5. Dentro da normalidade, o índice de tolerância médio das linhagens diminuiu da menor dose de Zn para a maior. Exceções a esse comportamento normal ocorreu apenas com as linhagens de *Periconia macrospinoso* A155, A163, A189, A191, A302, A329, A330, A331 que não apresentaram diferenças entre os índices de tolerância entre as doses 400 e 600 mg.L⁻¹ de zinco (Tabela 24).

Para linhagens de *Trichoderma* spp., a maioria também diminuiu a tolerância com o aumento da dose de zinco. As linhagens que não alteraram seu índice de tolerância com o aumento da dose de Zn foram A135, A169, A193, A196, A229, A240, A306, A320, A341, A342, A357, A361, A401, A402, A404, A409, A411, A426, A459, A481, A501, A509, A513 e A515. A única exceção foi linhagem A149 que apresentou o índice de tolerância maior na dose maior (Tabela 24).

Observando a magnitude média do índice de tolerância entre as linhagens de *Periconia macrospinoso* e de *Trichoderma* spp em cada nível de Zn verifica-se que as linhagens de *Trichoderma* se mostraram menos tolerantes ao Zn que as de *Periconia macrospinoso* (Figura 5). Isto fica evidente quando se compara o índice de tolerância na dosagem 400 mg.L⁻¹ de Zn, dosagem essa comum a ambos os experimentos.

(I)



Continua a Figura 5 na próxima página...

Continuação da **Figura 5**.

(II)

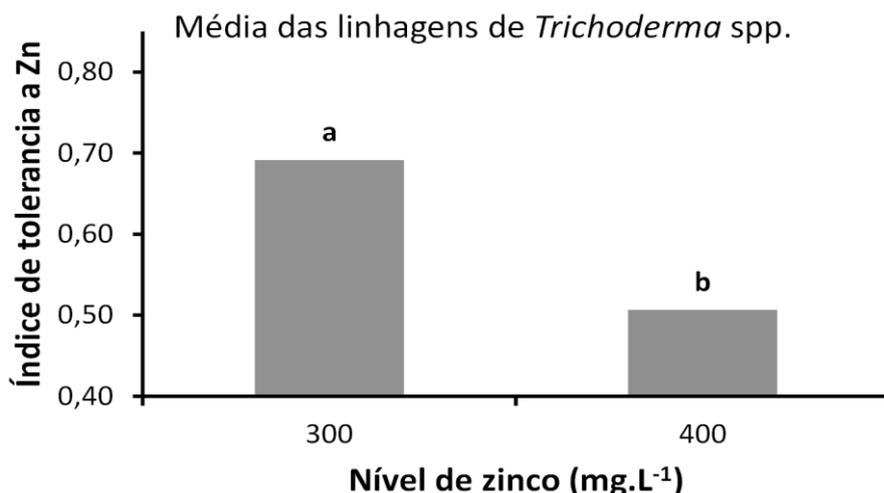


Figura 5. Índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinoso* (I) ver pg. 66) e de *Trichoderma* spp (II) para cada nível de Zn (Efeito principal para nível de Zn na análise de variância). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre níveis de Zn pelo teste de Scott Knott 5%.

Segundo Kok et al. (2001) vários fungos filamentosos, como *Trichoderma* sp., mostram-se promissores na biorremediação de metais como o Zinco. O presente estudo mostra que mesmo entre linhagens de *Trichoderma* spp. isoladas de ambiente agrícola, existem aquelas com bom potencial para biorremediação, devido sua alta tolerância e capacidade de rápida produção de biomassa micelial. Por outro lado, as linhagens de *Periconia macrospinoso* se mostraram muito mais tolerantes ao zinco que as linhagens de *Trichoderma* spp., e apesar do crescimento mais lento, podem ser utilizadas associadas a plantas para a bioremediação, pois fungos DSE colonizam muitas espécies de plantas. Zhang et al. (2013) mostraram que dentre as 29 espécies de plantas que cresceram em pilha de escória com concentrações elevadas de zinco ($31.265,9 \pm 6875,05 \text{ mg.kg}^{-1}$), todas foram altamente colonizadas por hifas DSE e microescleródios, exceto *Rorippa indica*. As porcentagens de colonização de hifas DSE e microescleródio nessas plantas foram de 83% a 97%.

4.4 Tolerância ao Excesso de Vinhaça

Foram estudadas quanto a tolerância ao excesso de vinhaça 115 linhagens de fungos endofíticos das raízes de cana-de-açúcar, sendo 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* e 58 linhagens de *Trichoderma* spp., utilizando o meio Extrato de Malte Ágar (MEA) com ajuste para pH 6,0 com as doses de 0, 400 e 800 mL.L⁻¹ de vinhaça.

O crescimento das colônias das 57 linhagens de *Periconia macrospinoso* é apresentado na tabela 25. No controle com MEA puro, sem vinhaça, as linhagens A257, A334, A331 e A155 apresentaram maior diâmetro médio e velocidade de crescimento da colônia e do que as demais linhagens de *Periconia macrospinoso*. Na variável superfície das colônias, essas 4 linhagens foram divididas em dois grupos distintos de crescimento. As linhagens A314, A338, A317 e A316 apresentaram os menores diâmetros, velocidades de crescimento e superfícies da colônia.

Na dosagem com 400 mL.L⁻¹ de vinhaça, a linhagem A334 apresentou maior diâmetro, velocidade de crescimento e superfície da colônia que as demais. As linhagens A331 e A257 sucederam a primeira, quando observa-se o diâmetro e a velocidade de crescimento da colônia.

Mas observando a superfície de colônia o segundo grupo é bastante numeroso, contendo as linhagens A331, A257, A161, A336, A329, A154, A373, A155, A332, A372, A316, A158, A126, A328, A258, A156, A237, A160, A162, A327, A260 e A225. Há concordância nas variáveis para a linhagem A190 que apresenta o menor diâmetro e superfície de colônia e o crescimento mais lento.

Na dose de 800 mL.L⁻¹ de vinhaça as linhagem de *Periconia macrospinoso* com maior diâmetro, velocidade de crescimento e superfície da colônia foi a A334. Esta foi seguida pelas linhagens A335 e A331 considerando o diâmetro da colônia e a velocidade de crescimento. As linhagens com menores diâmetros e crescimento mais lento foram A111, A235, A164, A163 e A190. Já as com menores superfície de colônia foram A113, A126, A260, A338, A163, A111, A235, A164 e A190.

Tabela 25. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de *Periconia macrospinoso* após 96 horas de crescimento em meio extrato de malte-água (MEA) com 0, 400 e 800 mL.L⁻¹ de vinhaça. Médias em ordem decrescente.

		DM (mm)			SC (cm ²)						
Linh.	0	Linh.	400	Linh.	800	Linh.	0	Linh.	400	Linh.	800
A257	49,8 a	A334	46,4 a	A334	52,8 a	A257	20,1 a	A334	16,8 a	A334	21,9 a
A334	48,6 a	A331	42,4 b	A335	43,5 b	A334	18,4 a	A331	14,1 b	A335	14,7 b
A331	46,4 a	A257	42,2 b	A331	40,7 b	A331	16,8 b	A257	14,0 b	A331	13,0 c
A155	46,0 a	A161	41,2 c	A158	38,9 c	A155	16,6 b	A161	13,4 b	A158	11,9 c
A154	43,7 b	A336	41,2 c	A336	38,8 c	A161	15,1 c	A336	13,3 b	A336	11,9 c
A161	43,7 b	A329	41,0 c	A154	38,0 c	A154	15,0 c	A329	13,2 b	A161	11,4 c
A258	43,5 b	A154	40,6 c	A161	38,0 c	A258	14,9 c	A154	13,0 b	A154	11,4 c
A355	43,0 b	A373	40,6 c	A332	37,7 c	A355	14,6 c	A373	12,9 b	A332	11,1 c
A156	41,8 c	A155	40,6 c	A257	37,1 c	A329	13,7 c	A155	12,9 b	A257	10,8 c
A329	41,7 c	A332	40,5 c	A373	36,8 c	A156	13,7 c	A332	12,9 b	A373	10,6 c
A372	41,7 c	A372	40,3 c	A328	36,4 c	A372	13,7 c	A372	12,8 b	A328	10,4 d
A336	41,7 c	A316	40,3 c	A356	36,2 c	A336	13,7 c	A316	12,7 b	A329	10,4 d
A332	41,0 c	A158	40,2 c	A237	36,1 c	A332	13,2 d	A158	12,7 b	A356	10,3 d
A260	40,4 c	A126	40,1 c	A162	36,0 c	A260	12,8 d	A126	12,6 b	A237	10,3 d
A327	40,1 c	A328	39,8 c	A329	35,7 c	A327	12,6 d	A328	12,4 b	A162	10,2 d
A337	39,3 d	A258	39,6 c	A160	35,6 c	A111	12,3 d	A258	12,3 b	A160	10,0 d
A115	39,2 d	A156	39,0 c	A156	35,6 c	A337	12,1 d	A156	11,9 b	A156	9,9 d
A111	39,1 d	A237	38,8 c	A191	34,8 d	A164	12,1 d	A237	11,8 b	A191	9,5 d
A164	39,0 d	A160	38,8 c	A315	34,6 d	A115	12,1 d	A160	11,8 b	A315	9,4 d
A335	38,7 d	A162	38,7 c	A155	34,5 d	A335	11,9 d	A162	11,8 b	A155	9,4 d
A424	38,6 d	A327	38,6 c	A423	34,4 d	A424	11,7 e	A327	11,7 b	A423	9,3 d
A236	38,4 d	A260	38,5 c	A225	34,3 d	A236	11,6 e	A260	11,6 b	A225	9,3 d
A330	38,3 d	A225	38,1 c	A424	34,1 d	A162	11,5 e	A225	11,4 b	A424	9,1 d
A162	38,2 d	A125	37,7 c	A318	34,0 d	A330	11,5 e	A125	11,1 c	A318	9,1 d
A191	38,1 d	A330	37,6 c	A125	34,0 d	A191	11,4 e	A330	11,1 c	A125	9,1 d
A157	37,8 d	A191	37,3 d	A159	34,0 d	A237	11,2 e	A191	10,9 c	A159	9,1 d
A237	37,8 d	A124	37,2 d	A330	33,9 d	A157	11,2 e	A124	10,9 c	A330	9,0 d
A333	37,4 d	A226	37,0 d	A327	33,9 d	A333	11,1 e	A226	10,8 c	A327	9,0 d
A238	37,4 d	A159	37,0 d	A447	33,8 d	A238	11,0 e	A159	10,8 c	A447	9,0 d
A159	37,1 d	A423	37,0 d	A314	33,7 d	A159	10,8 e	A423	10,7 c	A314	8,9 d
A328	37,0 d	A224	36,8 d	A236	33,4 d	A328	10,8 e	A224	10,7 c	A236	8,7 e
A225	36,6 d	A115	36,7 d	A258	33,2 d	A225	10,5 e	A115	10,6 c	A258	8,7 e
A160	36,5 d	A337	36,6 d	A355	33,1 d	A160	10,5 e	A337	10,5 c	A226	8,7 e

Continua...

Continuação da Tabela 25.

		DM (mm)				SC (cm ²)					
Linh.	0	Linh.	400	Linh.	800	Linh.	0	Linh.	400	Linh.	
A315	36,1 e	A355	36,6 d	A124	33,1 d	A163	10,3 e	A355	10,5 c	A355	8,6 e
A318	36,0 e	A356	36,3 d	A226	33,1 d	A315	10,2 e	A356	10,4 c	A124	8,6 e
A224	35,9 e	A259	36,1 d	A189	33,0 d	A224	10,2 e	A259	10,2 c	A189	8,6 e
A163	35,5 e	A236	36,0 d	A372	32,9 d	A318	10,2 e	A236	10,1 c	A372	8,5 e
A226	35,4 e	A238	35,9 d	A157	32,8 d	A226	9,8 e	A238	10,1 c	A157	8,5 e
A423	35,1 e	A189	35,9 d	A316	32,6 d	A423	9,8 e	A189	10,1 c	A316	8,3 e
A447	34,7 e	A315	35,7 d	A259	32,5 d	A113	9,4 e	A315	10,0 c	A259	8,3 e
A113	34,7 e	A447	35,4 d	A333	32,5 d	A447	9,4 e	A447	9,9 c	A333	8,3 e
A124	34,4 e	A333	35,4 d	A499	32,3 d	A124	9,3 e	A333	9,8 c	A224	8,2 e
A499	33,9 e	A318	35,3 d	A224	32,2 d	A499	9,2 e	A318	9,8 c	A499	8,2 e
A356	33,8 e	A157	35,1 d	A238	32,0 d	A356	9,0 e	A157	9,7 c	A238	8,1 e
A189	33,6 e	A111	35,1 d	A337	31,8 d	A189	8,9 e	A111	9,7 c	A337	8,0 e
A302	32,9 e	A424	35,0 d	A302	31,0 d	A302	8,5 f	A424	9,6 c	A302	7,7 e
A235	31,7 f	A164	34,9 d	A115	30,9 d	A235	7,9 f	A164	9,6 c	A317	7,5 e
A158	31,1 f	A335	34,1 d	A317	30,9 d	A158	7,6 f	A335	9,4 c	A115	7,5 e
A259	31,0 f	A302	33,6 d	A113	30,0 e	A259	7,6 f	A302	8,9 d	A113	7,1 f
A373	30,9 f	A317	33,3 e	A126	29,7 e	A373	7,5 f	A317	8,7 d	A126	6,9 f
A190	30,6 f	A113	33,0 e	A260	29,1 e	A190	7,3 f	A113	8,6 d	A260	6,7 f
A125	29,6 f	A314	32,8 e	A338	28,2 e	A125	6,9 f	A499	8,5 d	A338	6,3 f
A126	29,3 f	A499	32,7 e	A111	26,9 f	A125	6,9 f	A314	8,4 d	A163	6,2 f
A314	28,2 g	A338	31,5 e	A235	26,4 f	A314	6,3 g	A338	7,8 d	A111	5,7 f
A338	27,8 g	A235	30,1 f	A164	26,4 f	A338	6,0 g	A163	7,5 d	A235	5,5 f
A317	26,0 g	A163	29,3 f	A163	25,2 f	A317	5,4 g	A235	7,1 d	A164	5,5 f
A316	25,7 g	A190	25,5 g	A190	23,4 f	A316	5,2 g	A190	5,1 e	A190	4,3 f

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

O crescimento das colônias das 58 linhagens de *Trichoderma* spp. é apresentado na Tabela 26. No controle com MEA sem vinhaça, a linhagem A512 apresentou o maior diâmetro, velocidade de crescimento e superfície da colônia. Essa linhagem foi seguida das linhagens A400 e A401 formando um segundo grupo de crescimento grande e rápido. As linhagens com menor e mais lento crescimento foram A169 e A341, que nas variáveis diâmetro e velocidade de crescimento de colônia ainda foram subdivididas em dois grupos distintos de baixo crescimento.

Na dosagem com 400 mL.L⁻¹ de vinhaça a linhagem com maior diâmetro, velocidade de crescimento e superfície de colônia foi a A400. Essa linhagem foi seguida pelo crescimento das linhagens A512, A426, A401 e A307 formando um segundo grupo de maior crescimento. O grupo de menor crescimento foi formado pela linhagem A341, antecedido pelas linhagens A399 e A357, quando se considera as variáveis diâmetro e velocidade de crescimento da colônia. Para a variável superfície da colônia o grupo de menor crescimento foi composto pelas linhagens A342, A169, A358, A399, A357 e A341.

Na dosagem de 800 mL.L⁻¹ de vinhaça as linhagens com maiores diâmetros, velocidades de crescimento e superfícies de colônia foram A400 e A320. Essas linhagens foram seguidas pelo crescimento das linhagens A512, A361, A501 e A514 formando um segundo grupo de maior crescimento. O grupo de menor crescimento foi formado pela linhagem A341, antecedido pelas linhagens A168, A399, A358 e A357, quando se considera as variáveis diâmetro e velocidade de crescimento da colônia. Para a variável superfície da colônia o grupo de menor crescimento foi composto pelas linhagens A406, A482, A511, A403, A247, A193, A359, A167, A480, A515, A342, A169, A458, A168, A399, A358, A357 e A341.

Tabela 26. Diâmetro médio da colônia (DM) e superfície da colônia (SC) de diferentes linhagens de *Trichoderma* spp. após 24 horas de crescimento em meio extrato de malte-água (MEA) com 0, 400 e 800 mL.L⁻¹ de vinhaça. Médias em ordem decrescente.

DM (mm)						SC (cm ²)					
Linh.	0	Linh.	400	Linh.	800	Linh.	0	Linh.	400	Linh.	800
A512	57,3 a	A400	51,9 a	A400	40,7 a	A512	25,8 a	A400	21,2 a	A400	13,1 a
A400	53,3 b	A512	45,0 b	A320	38,2 a	A400	22,4 b	A512	16,1 b	A320	11,5 a
A401	52,3 b	A426	44,7 b	A512	37,0 b	A401	21,7 b	A426	15,8 b	A512	10,9 b
A307	48,8 c	A401	43,4 b	A361	35,2 b	A307	18,7 c	A401	15,0 b	A361	9,8 b
A426	48,3 c	A307	42,6 b	A501	35,2 b	A426	18,3 c	A307	14,4 b	A501	9,7 b
A361	47,9 c	A135	40,8 c	A514	33,6 b	A361	18,1 c	A135	13,1 c	A514	8,9 c
A306	47,8 c	A402	40,4 c	A402	32,9 c	A306	17,6 c	A402	13,0 c	A402	8,5 c
A320	47,2 c	A306	39,8 c	A426	32,9 c	A320	17,5 c	A306	12,4 c	A426	8,5 c
A501	45,9 c	A514	39,6 c	A306	32,2 c	A501	16,5 d	A514	12,3 c	A306	8,1 c
A135	45,7 c	A320	39,3 c	A513	31,8 c	A135	16,4 d	A320	12,2 c	A513	7,9 c
A402	45,2 c	A513	38,0 c	A401	30,5 d	A402	16,4 d	A513	11,3 c	A401	7,6 d
A514	43,6 d	A468	37,0 d	A135	30,4 d	A514	14,9 e	A468	10,8 d	A135	7,3 d
A377	42,3 d	A501	36,9 d	A405	30,2 d	A377	14,0 e	A501	10,8 d	A405	7,2 d
A513	41,7 d	A361	35,7 d	A263	29,9 d	A513	13,6 e	A361	10,1 d	A263	7,0 d
A149	41,5 d	A360	35,2 d	A409	29,5 d	A149	13,5 e	A360	9,7 d	A409	6,8 d
A240	40,5 d	A240	34,7 d	A360	29,3 d	A240	13,0 e	A240	9,5 d	A360	6,7 d
A412	37,7 e	A405	34,2 d	A412	29,2 d	A412	11,2 f	A405	9,2 d	A412	6,7 d
A360	37,4 e	A149	34,0 d	A240	28,5 d	A360	11,0 f	A149	9,1 d	A240	6,5 d
A508	37,2 e	A409	33,7 d	A377	28,4 d	A468	10,9 f	A409	8,9 d	A377	6,3 d
A319	37,1 e	A412	33,3 d	A508	27,5 d	A508	10,8 f	A412	8,7 e	A468	5,9 e
A468	37,1 e	A408	31,8 e	A468	27,5 d	A319	10,8 f	A408	7,9 e	A508	5,9 e
A405	37,0 e	A263	31,1 e	A510	26,7 e	A405	10,8 f	A481	7,7 e	A510	5,6 e
A263	36,4 e	A410	30,8 e	A307	26,4 e	A263	10,4 f	A263	7,6 e	A307	5,5 e
A483	36,1 e	A483	30,6 e	A149	26,3 e	A483	10,3 f	A410	7,5 e	A149	5,5 e
A410	36,0 e	A481	30,6 e	A404	26,1 e	A410	10,2 f	A319	7,4 e	A404	5,4 e
A409	36,0 e	A319	30,6 e	A408	26,0 e	A409	10,2 f	A483	7,3 e	A408	5,3 e
A408	34,5 f	A509	30,3 e	A319	25,2 e	A408	9,3 g	A509	7,2 e	A319	5,0 e
A481	34,2 f	A404	29,8 e	A282	25,0 e	A481	9,2 g	A404	7,0 e	A282	5,0 e
A404	34,0 f	A377	29,3 e	A308	25,0 e	A404	9,0 g	A377	6,8 e	A308	4,9 e
A510	33,7 f	A508	29,2 e	A410	25,0 e	A510	8,9 g	A508	6,7 e	A410	4,9 e
A511	33,2 f	A510	28,5 f	A481	24,7 e	A511	8,6 g	A407	6,5 e	A411	4,8 e
A411	32,0 f	A407	28,4 f	A411	24,7 e	A411	8,0 g	A510	6,4 e	A481	4,8 e
A359	31,3 f	A282	28,2 f	A461	24,6 e	A509	7,7 g	A282	6,2 e	A461	4,7 e
A509	31,3 f	A459	27,9 f	A483	24,5 e	A359	7,7 g	A459	6,1 e	A483	4,7 e
A480	30,2 g	A411	27,9 f	A460	24,5 e	A480	7,1 h	A411	6,1 e	A460	4,7 e
A407	30,0 g	A403	27,6 f	A509	24,3 e	A282	7,1 h	A403	6,0 e	A509	4,6 e
A308	29,7 g	A308	27,4 f	A196	24,1 e	A407	7,0 h	A308	5,9 e	A196	4,5 e
A403	29,6 g	A196	25,6 f	A407	23,9 e	A403	7,0 h	A196	5,1 f	A407	4,3 e
A282	29,6 g	A359	25,5 f	A459	23,0 f	A308	6,9 h	A359	5,1 f	A459	4,2 e
A461	29,2 g	A461	25,4 f	A229	22,9 f	A461	6,7 h	A461	5,1 f	A229	4,1 e
A482	28,6 g	A511	25,2 f	A406	22,5 f	A482	6,4 h	A511	4,9 f	A406	4,0 f
A458	28,3 g	A460	24,7 g	A482	22,1 f	A193	6,3 h	A460	4,8 f	A482	3,8 f
A196	28,3 g	A193	24,4 g	A511	21,9 f	A196	6,3 h	A193	4,7 f	A511	3,8 f
A229	28,3 g	A247	24,4 g	A403	21,6 f	A229	6,3 h	A247	4,7 f	A403	3,7 f
A193	28,1 g	A515	24,3 g	A247	21,5 f	A458	6,3 h	A515	4,6 f	A247	3,6 f
A460	28,1 g	A406	23,9 g	A359	20,7 g	A460	6,2 h	A406	4,5 f	A193	3,4 f

Continua...

Continuação da Tabela 26.

Linh.	DM (mm)				SC (cm ²)						
	0	Linh.	400	Linh.	800	Linh.	0	Linh.	400	Linh.	800
A459	27,8 g	A229	23,9 g	A193	20,7 g	A459	6,1 h	A229	4,5 f	A359	3,4 f
A406	27,7 g	A458	23,4 g	A167	20,7 g	A406	6,0 h	A458	4,3 f	A167	3,3 f
A515	27,6 g	A480	23,1 g	A480	20,5 g	A515	6,0 h	A480	4,1 f	A480	3,3 f
A247	26,9 g	A167	22,9 g	A515	20,2 g	A247	5,6 h	A167	4,1 f	A515	3,2 f
A399	23,7 h	A482	21,8 h	A342	19,8 g	A399	4,7 i	A482	3,8 f	A342	3,1 f
A167	23,5 h	A168	21,7 h	A169	19,7 g	A167	4,3 i	A168	3,7 f	A169	3,0 f
A357	22,5 h	A342	20,0 h	A458	19,3 g	A357	4,0 i	A342	3,2 g	A458	2,9 f
A168	22,1 h	A169	19,9 h	A168	17,7 h	A168	3,8 i	A169	3,1 g	A168	2,5 f
A358	22,0 h	A358	19,7 h	A399	17,7 h	A358	3,8 i	A358	3,0 g	A399	2,4 f
A342	18,8 i	A399	17,4 i	A358	17,2 h	A342	2,8 i	A399	2,4 g	A358	2,3 f
A169	15,7 j	A357	16,1 i	A357	16,4 h	A169	1,9 j	A357	2,0 g	A357	2,1 f
A341	10,4 k	A341	9,8 j	A341	8,8 i	A341	0,9 j	A341	0,8 g	A341	0,6 f

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem.

Os índices de tolerância a vinhaça pelas linhagens de *Periconia macrospinoso* e *Trichoderma* spp. Nas dosagens 400 e 800 mL.L⁻¹ desse rejeito industrial no meio MEA são apresentados na tabela 27. Para *Periconia macrospinoso* na dosagem com 400 mL.L⁻¹ de vinhaça, a linhagem com maior índice de tolerância (IT) foi a A316, seguida pela linhagem A126, formando um segundo grupo. Essas foram seguidas pelas linhagens A373, A317, A158 e A125, formando um terceiro grupo e pelas linhagens A314 e A259 formando um quarto grupo, sendo todos esses grupos com índice de tolerância “muito alto” pela classificação de Oladipo et al. (2018). O grupo de menor tolerância foi composto pela maioria das linhagens, com valores de IT que variaram de 0,83 a 1,00, ainda considerados por Oladipo et al. (2018) com tolerância “alta” a “muito alta”.

Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018), as linhagens A316, A126, A373, A317, A158, A125, A314, A259, A338, A124, A328, A423, A356, A189, A163, A160, A226, A225, A224, A302, A237, A447, A162 e A159 apresentaram tolerância “muito alta” a dose 400 mL.L⁻¹ de vinhaça. As linhagens A315, A336, A332, A329, A499, A330, A318, A191, A327, A372, A334, A235, A238, A161, A260, A113, A333, A115, A236, A337, A156, A154, A157, A331, A111, A258, A424, A164, A155, A335, A257, A355 e A190 apresentaram uma tolerância “alta” a essa dose de vinhaça. Nenhuma linhagem apresentou tolerância “moderada” ou inferior a essa, sugerindo que as linhagens de *Periconia macrospinoso* são altamente adaptadas a esse subproduto da indústria do álcool de cana-de-açúcar.

Para *Periconia macrospinoso* na dosagem com 800 mL.L⁻¹ de vinhaça, as linhagens com maiores índices de tolerância (IT) foram A316, A158, A317, A314, A373, A335, A334 e A125. Essas foram seguidas pelas linhagens A356, A259, A126 e A338, formando um segundo grupo. As linhagens A337, A115, A372, A355, A257, A190, A258, A155, A260, A111, A164 e A163 formaram o grupo de menor índice de tolerância cujos valores variaram de 0,67 a 0,81.

Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018), as linhagens A316, A158, A317, A314, A373, A335, A334, A125, A356, A259, A126, A338 e A423 apresentaram tolerância “muito alta” a dose 800 mL.L⁻¹ de vinhaça. As linhagens A328, A189, A160, A447, A499, A124, A315, A237, A302, A162, A318, A226, A225, A336, A332, A159, A191, A224, A330, A331, A424, A161, A154, A333, A236, A157, A113, A238, A329, A156, A235, A327 e A337 apresentaram uma tolerância “alta” a essa dose de vinhaça. As linhagens A115, A372, A355, A257, A190, A258, A155, A260, A111, A164 e A163 apresentaram tolerância “moderada”. Nenhuma linhagem apresentou índices inferiores a categoria “moderada”.

comprovando a alta adaptação das linhagens de *Periconia macrospinoso* para crescer em vinhaça.

No experimento com linhagens de *Trichoderma* spp., na dosagem com 400 mL.L⁻¹ de vinhaça, a linhagem com maior índice de tolerância foi a A169, seguida pela linhagem A342, formando um segundo grupo. Essas linhagens foram seguidas pelas linhagens A468, A459, A282, A168, A400, A167, A509, A403, A341, A407, A360, A409, A426, A405, A308, A408, A513, A514, A247 e A196 como terceiro grupo de maior índice de tolerância. As demais linhagens formaram um quarto e inferior grupo com índices de tolerância variando de 0,70 a 0,90, portanto também indicando pela classificação de Oladipo et al. (2018) linhagens com moderada a alta tolerância a essa dosagem de vinhaça.

Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018), as linhagens A169, A342, A468, A459 e A282 apresentaram tolerância “muito alta” a dose 400 mL.L⁻¹. As linhagens A168, A400, A167, A509, A403, A341, A407, A360, A409, A426, A405, A308, A408, A513, A514, A247, A196, A402, A358, A135, A481, A412, A460, A193, A515, A404, A411, A240, A461, A307, A406, A263, A483, A410, A229, A510, A306, A401, A320, A319, A458, A149, A359 e A501 apresentaram uma tolerância “alta” e as linhagens A512, A508, A399, A480, A482, A511, A361, A357 e A377 apresentaram tolerância “moderada”. Nenhuma linhagem apresentou tolerâncias “baixa” ou “muito baixa” ao nível de 400 mL.L⁻¹ de vinhaça, indicando alta tolerância a 400 mL.L⁻¹ de vinhaça também pelas linhagens de *Trichoderma* spp.

Na dose de 800 mL.L⁻¹ de vinhaça, a linhagem com maior índice de tolerância foi a A169, seguida pela linhagem A342, formando um segundo grupo, tal como verificado também na dose 400 mL.L⁻¹. Essas linhagens foram seguidas pelas linhagens A282, A460, A167, A196, A341, A461, A308, A459, A405, A263, A409, A406, A229, A320, A168, A247, A407, A510, A358, A509, A360, A412, A399, A514, A482, A411, A468, A404, A501, A513, A400, A408, A193, A357, A403, A508, A402, A361 e A515 como terceiro grupo de maior índice de tolerância. As linhagens do grupo com menores índices de tolerância foram A240, A481, A480, A410, A458, A483, A426, A319, A306, A377, A359, A135, A511, A512, A149, A401 e A307 com índice de tolerância variando entre 0,54 e 0,73, portanto pela classificação de Oladipo et al. (2018) índices de tolerância de “baixo” a “moderado”.

Pela classificação dos índices de tolerância de Oladipo et al. (2018), apenas as linhagens A169 e A342 apresentaram tolerância “muito alta” a dose 800 mL.L⁻¹ de vinhaça. As linhagens A282, A460, A167, A196, A341, A461, A308, A459, A405, A263, A409, A406, A229, A320, A168, A247 e A407 apresentaram uma tolerância “alta”. As linhagens A510, A358, A509, A360, A412, A399, A514, A482, A411, A468, A404, A501, A513, A400, A408, A193, A357, A403, A508, A402, A361, A515, A240, A481, A480, A410, A458, A483, A426, A319, A306, A377, A359, A135, A511, A512 e A149 apresentaram tolerância “moderada” e as linhagens A401 e A307 apresentaram tolerância “baixa”. Nenhuma linhagem apresentou tolerância “muito baixa” ao nível de 800 mL.L⁻¹ de vinhaça, indicando também grande tolerância a vinhaça da maioria das linhagens de *Trichoderma* spp. isoladas endofiticamente de cana-de-açúcar.

Tabela 27. Índice de tolerância a vinhaça após 96 horas de crescimento (Experimento com linhagens de *Periconia macrospinoso*) ou 24 horas de crescimento (Experimento com linhagens de *Trichoderma* spp.) em meio extrato de malte-ágar (MEA) com 400 e 800 mL.L⁻¹ de vinhaça. Médias em ordem decrescente.

<i>Periconia macrospinoso</i>				<i>Trichoderma</i> spp.			
Linhagem	400	Linhagem	800	Linhagem	400	Linhagem	800
A316	1,58 a	A316	1,28 a	A169	1,27 a	A169	1,27 a
A126	1,41 b	A158	1,26 a	A342	1,12 b	A342	1,11 b
A373	1,32 c	A317	1,22 a	A468	1,03 c	A282	0,89 c
A317	1,32 c	A314	1,20 a	A459	1,01 c	A460	0,88 c
A158	1,31 c	A373	1,20 a	A282	1,00 c	A167	0,88 c
A125	1,28 c	A335	1,16 a	A168	0,98 c	A196	0,85 c
A314	1,17 d	A334	1,15 a	A400	0,98 c	A341	0,85 c
A259	1,17 d	A125	1,15 a	A167	0,97 c	A461	0,85 c
A338	1,14 e	A356	1,08 b	A509	0,97 c	A308	0,84 c
A124	1,09 e	A259	1,05 b	A403	0,96 c	A459	0,83 c
A328	1,09 e	A126	1,04 b	A341	0,95 c	A405	0,83 c
A423	1,08 e	A338	1,02 b	A407	0,94 c	A263	0,82 c
A356	1,08 e	A423	1,01 c	A360	0,94 c	A409	0,82 c
A189	1,07 e	A328	0,99 c	A409	0,94 c	A406	0,81 c
A163	1,07 e	A189	0,99 c	A426	0,93 c	A229	0,81 c
A160	1,06 e	A160	0,98 c	A405	0,93 c	A320	0,81 c
A226	1,05 e	A447	0,98 c	A308	0,93 c	A168	0,80 c
A225	1,04 e	A499	0,97 c	A408	0,92 c	A247	0,80 c
A224	1,03 e	A124	0,97 c	A513	0,91 c	A407	0,80 c
A302	1,03 e	A315	0,96 c	A514	0,91 c	A510	0,79 c
A237	1,03 e	A237	0,96 c	A247	0,91 c	A358	0,78 c
A447	1,02 e	A302	0,96 c	A196	0,91 c	A509	0,78 c
A162	1,02 e	A162	0,95 c	A402	0,90 d	A360	0,78 c
A159	1,00 f	A318	0,95 c	A358	0,90 d	A412	0,78 c
A315	0,99 f	A226	0,94 c	A135	0,89 d	A399	0,78 c
A336	0,99 f	A225	0,94 c	A481	0,89 d	A514	0,78 c
A332	0,99 f	A336	0,93 c	A412	0,89 d	A482	0,78 c
A329	0,98 f	A332	0,92 c	A460	0,89 d	A411	0,77 c
A499	0,98 f	A159	0,92 c	A193	0,88 d	A468	0,77 c
A330	0,98 f	A191	0,92 c	A515	0,88 d	A404	0,77 c
A318	0,98 f	A224	0,91 c	A404	0,88 d	A501	0,77 c
A191	0,98 f	A330	0,89 c	A411	0,87 d	A513	0,76 c
A327	0,97 f	A331	0,88 c	A240	0,87 d	A400	0,76 c
A372	0,97 f	A424	0,88 c	A461	0,87 d	A408	0,75 c
A334	0,96 f	A161	0,88 c	A307	0,87 d	A193	0,75 c
A235	0,96 f	A154	0,87 c	A406	0,87 d	A357	0,75 c
A238	0,96 f	A333	0,87 c	A263	0,86 d	A403	0,74 c
A161	0,96 f	A236	0,87 c	A483	0,86 d	A508	0,74 c
A260	0,95 f	A157	0,87 c	A410	0,86 d	A402	0,74 c
A113	0,95 f	A113	0,87 c	A229	0,85 d	A361	0,74 c
A333	0,95 f	A238	0,86 c	A510	0,85 d	A515	0,73 c
A115	0,94 f	A329	0,85 c	A306	0,84 d	A240	0,73 d
A236	0,94 f	A156	0,85 c	A401	0,84 d	A481	0,72 d
A337	0,93 f	A235	0,85 c	A320	0,83 d	A480	0,70 d
A156	0,93 f	A327	0,85 c	A319	0,83 d	A410	0,69 d
A154	0,93 f	A337	0,81 d	A458	0,83 d	A458	0,68 d
A157	0,93 f	A115	0,79 d	A149	0,82 d	A483	0,68 d
A331	0,92 f	A372	0,79 d	A359	0,82 d	A426	0,68 d

Continua...

Continuação da Tabela 27.

<i>Periconia macrospinoso</i>				<i>Trichoderma spp.</i>			
Linhagem	400	Linhagem	800	Linhagem	400	Linhagem	800
A111	0,92 f	A355	0,78 d	A501	0,80 d	A319	0,68 d
A258	0,91 f	A257	0,77 d	A512	0,79 d	A306	0,68 d
A424	0,91 f	A190	0,76 d	A508	0,78 d	A377	0,67 d
A164	0,90 f	A258	0,76 d	A399	0,78 d	A359	0,66 d
A155	0,88 f	A155	0,75 d	A480	0,78 d	A135	0,66 d
A335	0,88 f	A260	0,72 d	A482	0,77 d	A511	0,66 d
A257	0,87 f	A111	0,71 d	A511	0,76 d	A512	0,65 d
A355	0,86 f	A164	0,69 d	A361	0,75 d	A149	0,63 d
A190	0,83 f	A163	0,67 d	A357	0,74 d	A401	0,58 d
				A377	0,70 d	A307	0,54 d

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%. Linh.: Linhagem. Segundo Oladipo et al., (2018), os valores de classificação do índice de tolerância indicam: 0,00 – 0,39 – Tolerância muito baixa. 0,40 – 0,59 – Tolerância baixa. 0,60 – 0,79 – Tolerância moderada. 0,80 – 0,99 – Tolerância alta. 1,00 = > 1,00 – Tolerância muito alta.

Efeito principal para os níveis de vinhaça na análise de variância do índice de tolerância é apresentado na Figura 6. Como esperado, o índice de tolerância médio das linhagens diminuiu da dose 400 mL L⁻¹ para a dose 800 mL L⁻¹ de vinhaça, tanto no experimento com *Periconia macrospinoso*, como no de *Trichoderma spp.*

Entretanto, a grande maioria das linhagens de *Periconia macrospinoso* não apresentaram redução do índice de tolerância entre as doses 400 e 800 mL.L⁻¹ de vinhaça. Apenas as linhagens A111, A115, A126, A163, A164, A258, A260, A316 e A372 apresentaram essa redução significativa com o aumento da concentração da vinhaça no MEA. Duas linhagens, A334 e A335, apresentaram índices de tolerância maiores na dose 400 do que na dose de 800 mL.L⁻¹.

O mesmo aconteceu com as linhagens de *Trichoderma spp.* Ao comparar os índices de tolerâncias entre as doses de vinhaça dentro de cada linhagem verifica-se que 30 linhagens que não diminuíram significativamente seu índice de tolerância com o aumento da dose de vinhaça (A167, A169, A196, A229, A247, A263, A282, A308, A320, A341, A342, A357, A358, A361, A377, A399, A404, A405, A406, A409, A411, A412, A460, A461, A480, A482, A501, A508, A510 e A511) e 28 linhagens apresentaram essa redução (A135, A149, A168, A193, A240, A306, A307, A319, A359, A360, A400, A401, A402, A403, A407, A408, A410, A426, A458, A459, A468, A481, A483, A509, A512, A513, A514 e A515). Isso comprova a alta tolerância dessas linhagens de *Periconia macrospinoso* e *Trichoderma spp.* a vinhaça adicionada ao meio de cultura.

Tal como ao excesso de metais estudados (Cd, Cu e Zn), linhagens de *Periconia macrospinoso* (um fungo escuro) apresentaram índices de tolerância superiores às linhagens de *Trichoderma spp.* (um fungo hialino). Entretanto a superioridade na vinhaça foi de menor magnitude que nos metais, indicando que para vinhaça, as linhagens de *Trichoderma spp* endofíticas de cana-de-açúcar também são bem adaptadas e tolerantes.

Os índices de tolerância próximos ou superiores a 1,00 indicam alta tolerância das linhagens de *Trichoderma spp.* e *Periconia macrospinoso*. Isto sugere uma adaptação ou seleção ocorrida nessas linhagens ao longo das aplicações de vinhaça nas lavouras de cana ou ainda à características do caldo da cana que podem se manter na vinhaça, tal como a concentração de sais. Os microrganismos são bioindicadores potenciais para a avaliação da qualidade de solos com aplicação de vinhaça em função das suas características peculiares de atividade bioquímica e metabólica e por serem sensíveis às mudanças no ambiente, proporcionando uma resposta rápida à fatores adversos (SILVA; MARTINS, 2011), porém

talvez microrganismos endofíticos de cana não sejam bons indicadores nessa situação de poluição por vinhaça.

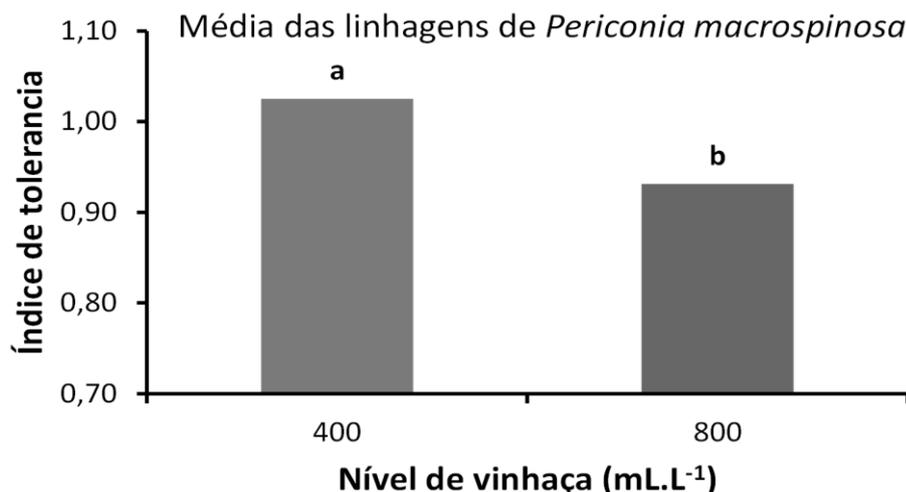


Figura 6. Índice de tolerância médio entre as linhagens de *Periconia macrospinoso* e de *Trichoderma* spp para cada nível de vinhaça (Efeito principal para nível de vinhaça na análise de variância). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença entre níveis de vinhaça pelo teste de Scott Knott 5%.

Os estudos sobre o manejo da aplicação da vinhaça sob a comunidade de microbiana endofítica são escassos, logo o presente estudo tem suma importância para essa avaliação da influência de diferentes doses de vinhaça sobre as linhagens de fungos endofíticos da cana-de-açúcar. Foi possível observar que os linhagens de modo geral apresentaram de moderada à muito alta tolerância as doses de vinhaça, e que a dosagem máxima estudada reduziu o crescimento de determinadas linhagens, em especial de *Trichoderma*.

A vinhaça, mesmo com um potencial poluente elevado, quando utilizada e manejada de maneira recomendada pode ser consideravelmente benéfica para a fertilidade, para a microbiota do solo e para o desenvolvimento das culturas plantadas nos locais tratados com este subproduto, como é o caso de culturas como as de trigo (THOMPSON et al., 1997), cevada, milho e sorgo (RUSTAMANI, 1992); pastagens gramíneas (FRIEBE, 1995) e, principalmente, cana-de-açúcar (HANINE, 1990). Junto a cana-de-açúcar a vinhaça estimula a produção do ácido aconítico pelas raízes da planta, onde esse ácido estimula o crescimento de fungos endofíticos e apresenta efeitos alelopáticos para sementes de trapoeraba (*Commelina benghalensis*) (VOLL et al., 2004).

O ganho em fertilidade e no desenvolvimento de microrganismos produzido pela aplicação de vinhaça é justificado pela riqueza em nutrientes importantes para as culturas, tais como nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo, e, em teores menores, sulfato. A vinhaça também é constituída de componentes orgânicos, tais como etanol, glicerol, ácido láctico, frutose, glicose, sacarose e galactose. Contudo, a concentração desses elementos é influenciada diretamente pelos métodos utilizados no processamento do mosto, como também é influenciada pelo tipo de mosto utilizado na produção do álcool (GLORIA, 1984; LUDOVICE, 1996; TONOLI, 2017).

4.5 Produção do Regulador de Crescimento Ácido Indolacético (AIA)

A concentração de moléculas relacionadas ao ácido indolacético (AIA) no meio de cultura, o crescimento das linhagens medido pela massa de micélio fresca e a quantidade de

AIA produzida por unidade de massa de micélio de 114 linhagens de fungos endofíticos de cana-de-açúcar (57 linhagens de *Periconia macrospinoso* e 57 linhagens de *Trichoderma* spp.) crescidas em meio extrato de malte líquido suplementado com L-triptofano é apresentado na Tabelas 28 (Experimento de *Periconia*) e Tabela 29 (Experimento de *Trichoderma*).

Para *Periconia macrospinoso* (Tabela 28), pode-se observar que as linhagens A157, A156 e A158 apresentaram maior produção de massa micelial que as demais linhagens. Essas foram seguidas do segundo grupo de maior massa composto pelas linhagens A115, A125, A113 e A126. O grupo cujas linhagens apresentaram com menor produção de massa micelial foi composto pelas linhagens A237, A238, A257, A259, A258 e A260.

Para o teor de AIA no meio de cultura, o teste de Scott Knott 5% separou 8 grupos de níveis de produção deste regulador de crescimento, onde as linhagens que promoveram o maior teor de AIA no meio foram A302 e A226. Essas foram seguidas por um segundo grupo com as linhagens A355, A225, A499 e A257. O grupo que promoveu menor concentração de AIA ao meio foi o das linhagens A327, A126, A156, A328, A224, A164, A258, A191, A157, A111, A115 e A125, o qual não diferiu da concentração de AIA estimada no meio testemunha não inoculado, o qual foi incubado junto com os tratamentos inoculados com as linhagens. Mesmo subtraindo-se da concentração do meio das linhagens o valor encontrado no meio da testemunha não inoculada, a concentração de AIA no meio da maioria das linhagens foi superior ao obtido por Faria et al. (2016), que avaliaram o isolado de *Periconia macrospinoso* Fun502A, o qual produziu 0,3 µg mL⁻¹ de AIA.

A quantidade de AIA produzida por unidade de massa de micélio indica que a linhagem A257 foi a que mais produziu AIA por grama de micélio. Em segundo lugar ficou a linhagem A226. Em terceiro as linhagens A225, A260, A237 e A259. As linhagens que menos produziram AIA por grama de micélio foram A335, A329, A315, A316, A154, A336, A318, A327, A317, A159, A155, A328, A113, A126, A111, A158, A156, A115, A125 e A157. A diferença entre a linhagem que mais produziu (A257 = 638 µg g⁻¹) e a que menos produziu (A157 = 105 µg g⁻¹) é da ordem 6 vezes superior.

Tabela 28. Concentração de ácido indolacético (AIA) no meio de cultura, massa fresca de micélio e quantidade de AIA produzido pelo micélio de linhagens de *Periconia macrospinoso* após 120 h de crescimento em extrato de malte líquido suplementado com L-triptofano. Médias em ordem decrescente.

Linhagem	Concentração de AIA no meio (µg mL ⁻¹)	Linhagem	Massa fresca de micélio (g)	Linhagem	AIA produzido pelo micélio (µg g ⁻¹)
A302	8,29 a	A157	0,67 a	A257	638,17 a
A226	7,93 a	A156	0,64 a	A226	567,41 b
A355	7,01 b	A158	0,64 a	A225	500,77 c
A225	6,96 b	A115	0,61 b	A260	483,25 c
A499	6,84 b	A125	0,60 b	A237	459,33 c
A257	6,66 b	A113	0,57 b	A259	446,41 c
A189	6,45 c	A126	0,57 b	A302	413,73 d
A447	6,21 c	A155	0,54 c	A258	384,87 d
A333	5,94 c	A159	0,54 c	A499	372,00 d
A337	5,58 d	A111	0,53 c	A238	369,75 d
A124	5,47 d	A315	0,53 c	A447	365,57 d
A332	5,40 d	A328	0,52 c	A236	353,53 d
A314	5,40 d	A336	0,51 c	A189	350,41 d
A237	5,28 e	A154	0,51 c	A235	322,71 d

Continua...

Continuação da Tabela 28.

Linhagem	Concentração de AIA no meio ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linhagem	Massa fresca de micélio (g)	Linhagem	AIA produzido pelo micélio ($\mu\text{g g}^{-1}$)
A356	5,09 e	A317	0,50 c	A355	315,43 d
A334	5,08 e	A318	0,50 c	A333	298,04 e
A161	4,98 e	A124	0,48 c	A331	283,75 e
A331	4,93 e	A337	0,48 c	A423	278,33 e
A338	4,89 e	A327	0,48 c	A332	275,86 e
A160	4,89 e	A302	0,48 c	A356	260,79 e
A423	4,72 f	A316	0,48 c	A330	260,32 e
A315	4,71 f	A160	0,48 c	A224	244,97 e
A372	4,52 f	A335	0,47 c	A314	244,94 e
A330	4,48 f	A329	0,46 c	A372	243,74 e
A236	4,47 f	A314	0,46 c	A338	241,59 e
A162	4,44 f	A334	0,46 c	A190	236,20 e
A335	4,34 f	A161	0,45 c	A337	233,06 e
A259	4,32 f	A355	0,45 c	A373	228,86 e
A260	4,27 g	A163	0,41 d	A161	226,83 e
A154	4,26 g	A162	0,41 d	A124	226,63 e
A336	4,19 g	A338	0,41 d	A334	224,43 e
A235	4,14 g	A333	0,40 d	A162	221,23 e
A373	4,13 g	A356	0,39 d	A191	220,29 e
A329	4,08 g	A332	0,39 d	A424	216,02 e
A238	4,08 g	A164	0,38 d	A160	211,42 e
A316	4,05 g	A424	0,37 d	A163	199,53 e
A163	4,04 g	A189	0,37 d	A164	198,27 e
A424	4,04 g	A372	0,37 d	A335	186,70 f
A155	4,02 g	A499	0,37 d	A329	179,16 f
A158	4,00 g	A373	0,36 d	A315	178,97 f
A113	3,98 g	A331	0,35 d	A316	176,06 f
A317	3,97 g	A330	0,35 d	A154	171,16 f
A159	3,92 g	A447	0,35 d	A336	163,84 f
A318	3,89 g	A423	0,34 d	A318	161,85 f
A190	3,87 g	A190	0,33 d	A327	159,33 f
A327	3,81 h	A191	0,33 d	A317	158,71 f
Test. Ni	3,76 h	A224	0,31 d	A159	151,28 f
A126	3,75 h	A226	0,29 e	A155	151,17 f
A156	3,74 h	A225	0,28 e	A328	148,09 f
A328	3,72 h	A235	0,26 e	A113	142,61 f
A224	3,72 h	A236	0,26 e	A126	134,71 f
A164	3,68 h	A237	0,23 f	A111	132,61 f
A258	3,65 h	A238	0,23 f	A158	128,06 f
A191	3,54 h	A257	0,21 f	A156	119,71 f
A157	3,48 h	A259	0,20 f	A115	113,19 f
A111	3,47 h	A258	0,19 f	A125	111,50 f
A115	3,37 h	A260	0,18 f	A157	105,09 f
A125	3,28 h				

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

Test. Ni: Meio de cultura não inoculado com fungos e incubado juntos com os demais tratamentos de linhagens.

No experimento com linhagens de *Trichoderma* spp. (Tabela 29) pode-se observar que as linhagens A167, A240, A169, A247, A229, A168, A193, A135, A196, A405, A149 e A263 apresentaram maior produção de massa micelial que as demais. Essas foram seguidas por um segundo grupo de maior massa composto pelas linhagens A410, A406, A482, A460, A411, A459, A407, A404, A403, A481, A468, A483, A282, A408, A480 e A409. O grupo cujas linhagens apresentaram com menor produção de massa micelial foi composto pelas linhagens A336, A341, A342, A399, A377, A358, A357, A359, A360, A401 e A361.

Para o teor de AIA no meio de cultura, o teste de Scott Knott 5% separou 5 grupos de níveis de produção, onde a linhagem que promoveu o maior teor no meio foi a A512. Essa foi seguida por um segundo grupo com as linhagens A169, A282 e A263. O grupo que promoveu menor concentração de AIA ao meio foi o das linhagens A514, A515, A168, A406, A483, A307, A407 e A408, o qual foi inferior a concentração de AIA estimada no meio testemunha não inoculado. Esse fato é atribuído a um excesso de rigor do teste Scott Knott 5%, acreditando-se que os últimos dois grupos separados não devem diferir entre si.

A linhagem que promoveu o maior teor de AIA no meio ($6,48 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi a A512, a qual é da espécie *Trichoderma harzianum*. Apesar disso, essa linhagem promoveu teor inferior de AIA quando comparada com às linhagens de *Trichoderma harzianum* do estudo de Bader et al. (2020), no qual todas as cepas testadas de *Trichoderma harzianum* mostraram capacidade *in vitro* de produzir AIA em teores que variaram de $7,19 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $21,14 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A quantidade de AIA produzida por unidade de massa de micélio indica que as linhagens A361, A401, A360, A359, A357, A358, A512 e A377 foram as que mais produziram AIA por grama de micélio. Em segundo lugar ficaram as linhagens A399, A342, A400, A402, A341, A412, A513, A510, A403, A336, A282 e A511. Em terceiro as linhagens A509, A319, A458, A508, A320, A501, A426, A481, A410, A263, A308, A480, A409, A306, A460, A404, A149, A514, A169, A247 e A515. As linhagens que menos produziram AIA por grama de micélio foram A411, A459, A193, A468, A482, A307, A196, A405, A135, A483, A229, A406, A167, A407, A408, A240 e A168. A diferença entre a linhagem que mais produziu ($A361 = 260 \mu\text{g g}^{-1}$) e a que menos produziu ($A168 = 85 \mu\text{g g}^{-1}$) é da ordem 3 vezes superior.

Muitas linhagens de *Trichoderma* são capazes de produzir compostos reguladores de crescimento que causam mudanças no metabolismo das plantas. Nesse sentido, Gravel et al. (2007) relataram que *Trichoderma atroviride* produziu indóis relacionados ao AIA em condições *in vitro* após a adição de L-triptofano ao meio. Devido a esse fato, no presente estudo foi o meio MEA foi suplementado com esse aminoácido, o que pode ter garantido o sucesso da avaliação. O AIA pode ser sintetizado por meio de duas vias, uma o L-triptofano é usado como o precursor (CONTRERAS et al., 2010) e a outra é independente de triptofano (KOCHAR;SRIVASTAVA, 2012). As vias biossintéticas deste regulador de crescimento em microrganismos e plantas são altamente semelhantes.

Desta maneira, exsudados presentes nos vegetais, como o L-triptofano, estimulam a síntese de AIA por estirpes microbianas que colonizam as plantas, sugerindo a estreita relação simbiótica entre a planta e os microrganismos que ela estimula a produzir AIA (IDRIS et al., 2007). A produção de AIA é um importante traço funcional da simbiose promotora de crescimento, visto que este regulador de crescimento permite a planta maximizar o desenvolvimento do sistema radicular e, por consequência, favorecer sua nutrição (GOSWAMI et al., 2014). Os fungos endofíticos tem papel importante neste contexto, pois são considerados uma fonte de bioativos naturais, entre eles o AIA (KHAN et al., 2010; KOREJO et al., 2014).

Tabela 29. Concentração de ácido indolacético (AIA) no meio de cultura, massa fresca de micélio e quantidade de AIA produzido pelo micélio de linhagens de *Trichoderma* spp. após 120 h de crescimento em extrato de malte líquido suplementado com L-triptofano. Médias em ordem decrescente.

Linhagem	Concentração de AIA no meio ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linhagem	Massa fresca de micélio (g)	Linhagem	AIA produzido pelo micélio ($\mu\text{g g}^{-1}$)
A512	6,48 a	A167	0,97 a	A361	259,71 a
A169	5,49 b	A240	0,93 a	A401	251,20 a
A282	5,48 b	A169	0,88 a	A360	244,31 a
A263	5,32 b	A247	0,87 a	A359	242,60 a
A410	5,19 c	A229	0,85 a	A357	238,44 a
A247	5,16 c	A168	0,84 a	A358	233,46 a
A149	5,12 c	A193	0,83 a	A512	229,31 a
A412	5,04 c	A135	0,82 a	A377	220,65 a
A403	5,00 c	A196	0,80 a	A399	211,96 b
A481	4,93 c	A405	0,79 a	A342	202,79 b
A458	4,89 c	A149	0,78 a	A400	198,87 b
A193	4,76 c	A263	0,78 a	A402	195,26 b
A460	4,74 c	A410	0,75 b	A341	193,89 b
A511	4,69 c	A406	0,75 b	A412	191,03 b
A513	4,66 c	A482	0,71 b	A513	184,19 b
A480	4,60 c	A460	0,71 b	A510	176,35 b
A357	4,56 c	A411	0,71 b	A403	173,45 b
A509	4,56 c	A459	0,70 b	A336	171,42 b
A510	4,50 c	A407	0,70 b	A282	170,86 b
A358	4,47 d	A404	0,69 b	A511	170,19 b
A404	4,46 d	A403	0,69 b	A509	160,61 c
A342	4,44 d	A481	0,68 b	A319	158,69 c
A508	4,42 d	A468	0,68 b	A458	158,41 c
A409	4,40 d	A483	0,68 b	A508	155,67 c
A359	4,38 d	A282	0,67 b	A320	151,71 c
A167	4,34 d	A408	0,67 b	A501	148,38 c
A341	4,31 d	A480	0,66 b	A426	146,73 c
A360	4,29 d	A409	0,65 b	A481	146,47 c
A501	4,29 d	A458	0,63 c	A410	143,53 c
A411	4,27 d	A306	0,62 c	A263	141,54 c
A361	4,21 d	A307	0,59 c	A308	140,85 c
A426	4,14 d	A402	0,59 c	A480	139,78 c
A377	4,13 d	A515	0,59 c	A409	135,91 c
A196	4,12 d	A426	0,58 c	A306	135,31 c
A306	4,08 d	A308	0,58 c	A460	134,30 c
A319	4,05 d	A501	0,58 c	A404	133,26 c
A229	4,05 d	A508	0,58 c	A149	131,54 c
A399	4,04 d	A509	0,57 c	A514	130,76 c
A135	4,04 d	A512	0,57 c	A169	127,96 c
A482	4,04 d	A514	0,56 c	A247	124,70 c
A459	4,02 d	A511	0,56 c	A515	123,34 c
A336	3,97 d	A412	0,54 c	A411	121,10 d
A400	3,97 d	A319	0,53 c	A459	116,94 d
A308	3,96 d	A513	0,53 c	A193	116,91 d
A405	3,96 d	A320	0,52 c	A468	115,92 d
A320	3,92 d	A510	0,51 c	A482	115,78 d
A240	3,91 d	A400	0,49 c	A307	109,95 d

Continua...

Continuação da Tabela 29.

Linhagem	Concentração de AIA no meio ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Linhagem	Massa fresca de micélio (g)	Linhagem	AIA produzido pelo micélio ($\mu\text{g g}^{-1}$)
A468	3,90 d	A336	0,47 d	A196	104,71 d
A401	3,88 d	A341	0,46 d	A405	101,87 d
Test. Ni	3,86 d	A342	0,45 d	A135	99,38 d
A402	3,80 d	A399	0,44 d	A483	96,82 d
A514	3,64 e	A377	0,44 d	A229	96,41 d
A515	3,61 e	A358	0,40 d	A406	96,38 d
A168	3,55 e	A357	0,40 d	A167	92,12 d
A406	3,53 e	A359	0,37 d	A407	91,53 d
A483	3,23 e	A360	0,36 d	A408	88,60 d
A307	3,18 e	A401	0,36 d	A240	87,51 d
A407	3,14 e	A361	0,33 d	A168	85,49 d
A408	2,80 e				

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

Test. Ni: Meio de cultura não inoculado com fungos e incubado juntos com os demais tratamentos de linhagens.

Fungos ‘Dark Septate Endophytes’ são frequentemente relacionados benéficos para as plantas hospedeiras por neutralizar efeitos adversos de estresses. Hou et al. (2021) observaram que os fungos DSE *Paraphoma chrysanthemicola* e *Bipolaris sorokiniana* aumentaram o teor de AIA nas raízes de *Artemisia ordosica* inoculadas em relação as plantas controle sob estresse salino. Outros estudos relatam várias espécies de DSE como produtoras de AIA, promovendo o crescimento das plantas e aumentando a tolerância ao estresse (WAQAS et al., 2012; PRIYADHARSINI; MUTHUKUMAR, 2017; QIANG et al., 2019), sugerindo o potencial que a produção de AIA pelas linhagens de *Periconia macrospinosa* podem promover melhorando situações de estresses, como seca em canaviais.

Espécies de *Trichoderma* também são relatadas ter a capacidade de sintetizar AIA mais comumente que os DSE, como foi visto por Contreras-Cornejo et al. (2009) para *Trichoderma virens* e *Trichoderma atroviride*, as quais sintetizam AIA e derivados que auxiliando no crescimento de raízes laterais em plantas de *Arabidopsis*. Muitas linhagens de *Trichoderma* sintetizam AIA, porém apenas algumas promovem o crescimento das plantas (CARVAJAL et al., 2009).

A produção de reguladores de crescimento vegetal por microrganismos é um mecanismo importante muito associado ao potencial de promoção de crescimento desses microrganismos. A base molecular subjacente a esta produção ainda não é clara (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009, 2011). A promoção do crescimento de raízes por esses reguladores pode implicar em uma maior absorção de fosfato, de forma que duas funções de promoção de crescimento dos microrganismos podem estar associadas, a capacidade de solubilização de fosfato e a produção de AIA (RICHARDSON, 2001). Linhagens com maior produção e síntese de AIA podem estar associadas a maior diminuição da quantidade de fosfato tricálcico *in vitro*, o que pode indicar uma potencial relação entre as cepas que solubilizam fosfato inorgânico serem também boas produtoras de AIA (BADER et al., 2020).

Dentre as linhagens avaliadas no presente trabalho, as que mais solubilizaram fosfato de cálcio e também apresentavam alta produção de AIA foram as linhagens A169 de *Trichoderma* e a linhagem A257 de *Periconia*, a qual embora não tenha apresentado um índice de solubilização tão alto se enquadrado no segundo maior grupo de produtor de AIA. Para aprofundar nesta relação há a necessidade de mais estudos avaliando em um mesmo experimento em meio líquido, em condições iguais de desenvolvimento, como seria a solubilização de fosfato e a produção de AIA das linhagens.

4.6 Análise Geral dos Experimentos

Uma análise geral da velocidade de crescimento das linhagens de *Periconia macrospinoso* nos diferentes experimentos do presente estudo é apresentado na tabela 30. Verifica-se que no meio MEA, após 96 horas de crescimento, que a velocidade de crescimento média das linhagens de *Periconia macrospinoso* variou entre 4,1 a 9,2 mm.dia⁻¹. As linhagens mais rápidas foram A331, A257, A237, A318, A226, A335, A157, A332 e A154 com velocidade de crescimento acima de 8 mm.dia⁻¹. As linhagens mais lentas foram A333, A356, A125, A126 e A163 com velocidade de crescimento abaixo de 6 mm.dia⁻¹.

Tabela 30. Velocidade de crescimento (VC) em mm.dia⁻¹ de linhagens de *Periconia macrospinoso* após 96 h de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) em diferentes experimentos. Médias ordenadas pela VC média dos experimentos.

Experimento								Média dos Experimentos	
Cádmio		Cobre		Zinco		Vinhaça		Linh.	VC média
Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC		
A331	8,8 a	A331	7,3 d	A331	11,0 a	A331	9,6 a	A331	9,2
A257	6,1 d	A257	9,4 a	A257	7,6 c	A257	10,5 a	A257	8,4
A237	7,2 b	A237	9,6 a	A237	9,0 b	A237	7,5 d	A237	8,3
A318	7,4 b	A318	9,4 a	A318	9,2 b	A318	7,0 e	A318	8,2
A226	7,5 b	A226	9,0 b	A226	9,4 b	A226	6,8 e	A226	8,2
A335	7,9 b	A335	7,0 d	A335	9,9 b	A335	7,7 d	A335	8,1
A157	7,2 b	A157	8,6 b	A157	9,0 b	A157	7,5 d	A157	8,1
A332	6,7 c	A332	8,8 b	A332	8,4 c	A332	8,3 c	A332	8,1
A154	6,8 c	A154	7,7 c	A154	8,5 c	A154	8,9 b	A154	8,0
A160	6,9 c	A160	8,9 b	A160	8,7 c	A160	7,1 d	A160	7,9
A191	6,7 c	A191	9,0 b	A191	8,4 c	A191	7,5 d	A191	7,9
A156	6,8 c	A156	7,8 c	A156	8,5 c	A156	8,5 c	A156	7,9
A258	5,9 d	A258	9,4 a	A258	7,4 c	A258	8,9 b	A258	7,9
A315	6,7 c	A315	9,0 b	A315	8,3 c	A315	7,0 e	A315	7,7
A330	6,8 c	A330	7,9 c	A330	8,5 c	A330	7,6 d	A330	7,7
A238	6,7 c	A238	8,5 b	A238	8,3 c	A238	7,4 d	A238	7,7
A329	6,6 c	A329	7,4 d	A329	8,2 c	A329	8,4 c	A329	7,7
A424	6,9 c	A424	7,6 d	A424	8,6 c	A424	7,7 d	A424	7,7
A355	5,5 e	A355	9,5 a	A355	6,8 d	A355	8,7 b	A355	7,6
A159	6,3 d	A159	8,9 b	A159	7,9 c	A159	7,3 d	A159	7,6
A161	6,3 d	A161	7,3 d	A161	7,8 c	A161	8,9 b	A161	7,6
A158	6,6 c	A158	9,7 a	A158	8,2 c	A158	5,8 f	A158	7,6
A447	6,6 c	A447	8,1 c	A447	8,3 c	A447	6,7 e	A447	7,4
A155	5,5 e	A155	7,7 c	A155	6,8 d	A155	9,5 a	A155	7,4
A327	6,3 d	A327	7,4 d	A327	7,8 c	A327	8,0 c	A327	7,4
A314	6,8 c	A314	9,1 a	A314	8,5 c	A314	5,0 g	A314	7,4
A302	6,5 c	A302	8,6 b	A302	8,1 c	A302	6,2 e	A302	7,4
A372	5,8 e	A372	8,0 c	A372	7,2 d	A372	8,4 c	A372	7,3
A162	5,5 e	A162	9,0 b	A162	6,9 d	A162	7,6 d	A162	7,3
A336	5,2 f	A336	8,9 b	A336	6,5 d	A336	8,4 c	A336	7,3
A260	5,4 e	A260	8,8 b	A260	6,8 d	A260	8,1 c	A260	7,3
A328	6,8 c	A328	6,4 e	A328	8,5 c	A328	7,3 d	A328	7,2
A423	6,3 d	A423	7,9 c	A423	7,9 c	A423	6,8 e	A423	7,2
A317	6,6 c	A317	9,5 a	A317	8,2 c	A317	4,5 g	A317	7,2
A259	6,2 d	A259	8,7 b	A259	7,8 c	A259	5,8 f	A259	7,1
A373	6,0 d	A373	8,9 b	A373	7,5 c	A373	5,7 f	A373	7,0

Continua...

Continuação da Tabela 30.

Cádmio		Cobre		Zinco		Vinhaça		Média dos Experimentos	
Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC média
A337	5,6 e	A337	7,6 d	A337	7,0 d	A337	7,8 d	A337	7,0
A224	5,5 e	A224	8,4 b	A224	6,9 d	A224	7,0 e	A224	6,9
A334	3,6 h	A334	9,5 a	A334	4,5 f	A334	10,2 a	A334	6,9
A225	5,7 e	A225	7,6 c	A225	7,1 d	A225	7,2 d	A225	6,9
A164	6,3 d	A164	5,3 f	A164	7,8 c	A164	7,7 d	A164	6,8
A316	6,3 d	A316	8,4 b	A316	7,9 c	A316	4,4 g	A316	6,8
A189	5,5 e	A189	8,2 c	A189	6,9 d	A189	6,4 e	A189	6,8
A115	5,0 f	A115	7,1 d	A115	6,3 d	A115	7,8 d	A115	6,6
A190	5,9 d	A190	7,2 d	A190	7,4 c	A190	5,7 f	A190	6,5
A236	4,8 f	A236	7,6 c	A236	6,0 d	A236	7,6 d	A236	6,5
A111	5,6 e	A111	5,5 f	A111	7,0 d	A111	7,8 d	A111	6,5
A124	5,0 f	A124	7,3 d	A124	6,3 d	A124	6,6 e	A124	6,3
A235	5,3 e	A235	7,2 d	A235	6,6 d	A235	5,9 f	A235	6,3
A499	4,3 g	A499	8,8 b	A499	5,4 e	A499	6,5 e	A499	6,3
A113	5,6 e	A113	5,2 f	A113	7,0 d	A113	6,7 e	A113	6,1
A338	5,0 f	A338	8,2 c	A338	6,3 d	A338	4,9 g	A338	6,1
A333	3,8 h	A333	7,7 c	A333	4,8 f	A333	7,4 d	A333	5,9
A356	4,8 f	A356	6,1 e	A356	6,0 d	A356	6,5 e	A356	5,8
A125	4,5 g	A125	7,6 d	A125	5,6 e	A125	5,4 f	A125	5,8
A126	4,9 f	A126	6,4 e	A126	6,2 d	A126	5,3 f	A126	5,7
A163	3,2 h	A163	2,5 g	A163	3,9 f	A163	6,9 e	A163	4,1

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

Uma análise geral da velocidade de crescimento das linhagens de *Trichoderma* spp. nos diferentes experimentos do presente estudo é apresentado na tabela 31. Verifica-se que no meio MEA, após 48 horas de crescimento (24 no experimento de vinhaça), que a velocidade de crescimento média das linhagens de *Trichoderma* spp. variou entre 14,1 a 38,7 mm.dia⁻¹. As linhagens mais rápidas foram A512, A514, A361, A426, A306 e A501 com velocidade de crescimento acima de 35 mm.dia⁻¹. As linhagens mais lentas foram A341 e A169 com velocidade de crescimento abaixo de 15 mm.dia⁻¹.

Comparando-se a velocidade de crescimento média das linhagens de *Periconia macrospinoso* com as linhagens de *Trichoderma* spp., verificamos que as primeiras tem uma velocidade média de 7,2 mm.dia⁻¹, enquanto as linhagens de *Trichoderma* tem uma velocidade média de 29,2 mm.dia⁻¹, ou seja o crescimento das linhagens de *Trichoderma* é em média 4 vezes mais rápido que das linhagens de *Periconia macrospinoso*. Em placas de Petri de 90 mm utilizadas nos experimentos, as colônias de *Periconia macrospinoso* levariam de 9 a 21 dias (em média 12 dias) para ocupar toda a superfície da placa. as colônias de *Trichoderma* spp. levariam de 2 a 6 dias (em média 3 dias) para ocupar toda a superfície da placa.

Tabela 31. Velocidade de crescimento (VC) em mm.dia-1 de linhagens de *Trichoderma* spp. após 48 h (24 h no experimento de vinhaça) de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) em diferentes experimentos. Médias ordenadas pela VC média dos experimentos.

Experimento								Média dos Experimentos	
Cádmio		Cobre		Zinco		Vinhaça		Linh.	VC média
Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC		
A512	34,5 a	A512	36,6 a	A512	34,5 b	A512	49,3 a	A512	38,7
A514	37,4 a	A514	36,2 a	A514	37,4 a	A514	35,6 d	A514	36,6
A361	33,6 b	A361	35,3 b	A361	33,6 c	A361	39,9 c	A361	35,6
A426	35,5 a	A426	30,9 d	A426	35,5 b	A426	40,3 c	A426	35,5
A306	34,2 a	A306	32,3 c	A306	34,2 b	A306	39,8 c	A306	35,1
A501	34,7 a	A501	33,1 c	A501	34,7 b	A501	37,9 c	A501	35,1
A135	32,7 b	A135	35,7 b	A135	32,7 c	A135	37,7 c	A135	34,7
A511	38,4 a	A511	36,8 a	A511	38,4 a	A511	25,2 f	A511	34,7
A400	31,8 b	A400	29,3 e	A400	31,8 c	A400	45,3 b	A400	34,5
A320	30,9 b	A320	36,4 a	A320	30,9 c	A320	39,2 c	A320	34,4
A307	36,3 a	A307	22,9 h	A307	36,3 a	A307	40,8 c	A307	34,1
A510	36,5 a	A510	36,3 a	A510	36,5 a	A510	25,7 f	A510	33,7
A360	35,9 a	A360	31,5 d	A360	35,9 a	A360	29,4 e	A360	33,2
A319	33,1 b	A319	36,5 a	A319	33,1 c	A319	29,1 e	A319	32,9
A513	35,3 a	A513	26,5 f	A513	35,3 b	A513	33,7 d	A513	32,7
A482	36,4 a	A482	36,6 a	A482	36,4 a	A482	20,6 g	A482	32,5
A410	35,2 a	A410	29,5 e	A410	35,2 b	A410	28,0 e	A410	31,9
A149	31,6 b	A149	30,6 d	A149	31,6 c	A149	33,5 d	A149	31,8
A509	34,0 a	A509	34,2 b	A509	34,0 b	A509	23,3 f	A509	31,4
A402	27,6 c	A402	32,9 c	A402	27,6 d	A402	37,2 c	A402	31,3
A263	35,0 a	A263	26,0 f	A263	35,0 b	A263	28,4 e	A263	31,1
A458	33,9 a	A458	35,9 a	A458	33,9 b	A458	20,3 g	A458	31,0
A240	32,9 b	A240	25,8 f	A240	32,9 c	A240	32,5 d	A240	31,0
A358	36,5 a	A358	36,5 a	A358	36,5 a	A358	14,0 h	A358	30,9
A282	32,4 b	A282	37,0 a	A282	32,4 c	A282	21,6 g	A282	30,9
A468	32,5 b	A468	26,7 f	A468	32,5 c	A468	29,1 e	A468	30,2
A196	31,8 b	A196	36,2 a	A196	31,8 c	A196	20,3 g	A196	30,0
A409	28,4 c	A409	35,2 b	A409	28,4 d	A409	28,0 e	A409	30,0
A412	34,2 a	A412	20,7 i	A412	34,2 b	A412	29,7 e	A412	29,7
A483	34,9 a	A483	20,3 i	A483	34,9 b	A483	28,1 e	A483	29,6
A460	33,1 b	A460	29,8 d	A460	33,1 c	A460	20,1 g	A460	29,1
A481	33,9 a	A481	21,3 i	A481	33,9 b	A481	26,2 f	A481	28,8
A480	36,4 a	A480	19,1 i	A480	36,4 a	A480	22,2 g	A480	28,5
A401	16,9 f	A401	34,8 b	A401	16,9 g	A401	44,3 b	A401	28,2
A406	34,5 a	A406	23,5 h	A406	34,5 b	A406	19,7 g	A406	28,0
A377	22,5 d	A377	32,6 c	A377	22,5 e	A377	34,3 d	A377	28,0
A408	24,1 d	A408	36,8 a	A408	24,1 e	A408	26,5 f	A408	27,9
A508	23,1 d	A508	35,5 b	A508	23,1 e	A508	29,2 e	A508	27,7
A359	24,7 d	A359	37,2 a	A359	24,7 e	A359	23,3 f	A359	27,5
A247	27,0 c	A247	36,2 a	A247	27,0 d	A247	18,9 g	A247	27,3
A515	26,4 c	A515	36,2 a	A515	26,4 d	A515	19,6 g	A515	27,1
A411	32,5 b	A411	19,2 i	A411	32,5 c	A411	24,0 f	A411	27,0
A405	25,9 c	A405	26,3 f	A405	25,9 d	A405	29,0 e	A405	26,8
A167	28,1 c	A167	34,9 b	A167	28,1 d	A167	15,5 h	A167	26,7
A308	23,7 d	A308	36,4 a	A308	23,7 e	A308	21,7 g	A308	26,4
A168	27,2 c	A168	35,0 b	A168	27,2 d	A168	14,1 h	A168	25,9
A459	25,8 c	A459	31,9 c	A459	25,8 d	A459	19,8 g	A459	25,9

Continua...

Continuação da Tabela 31.

Experimentos								Média dos Experimentos	
Cádmio		Cobre		Zinco		Vinhaça		Linh.	VC média
Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC		
A193	24,9 d	A193	33,0 c	A193	24,9 e	A193	20,1 g	A193	25,7
A399	31,2 b	A399	24,7 g	A399	31,2 c	A399	15,7 h	A399	25,7
A357	30,2 b	A357	24,1 g	A357	30,2 c	A357	14,5 h	A357	24,8
A404	22,1 d	A404	25,9 f	A404	22,1 e	A404	26,0 f	A404	24,0
A229	19,7 e	A229	35,9 a	A229	19,7 f	A229	20,3 g	A229	23,9
A461	23,7 d	A461	26,5 f	A461	23,7 e	A461	21,2 g	A461	23,8
A342	25,4 c	A342	32,3 c	A342	25,4 d	A342	10,8 i	A342	23,5
—	—	A407	22,2 h	—	—	A407	22,0 g	A407	22,1
A403	14,6 f	A403	37,2 a	A403	14,6 g	A403	21,6 g	A403	22,0
A341	14,1 f	A341	28,6 e	A341	14,1 g	A341	2,4 k	A341	14,8
A169	7,2 g	A169	34,3 b	A169	7,2 h	A169	7,7 j	A169	14,1

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

Uma análise geral da velocidade de crescimento das linhagens de *Periconia macrospinoso* nas condições de máximo estresse que foram submetidas (doses máximas de cádmio, cobre, zinco e vinhaça) nos diferentes experimentos é apresentada na tabela 32. Verifica-se que nestas condições, após 96 horas de crescimento, a velocidade de crescimento média das linhagens de *Periconia macrospinoso* variou entre 2,4 e 5,6 mm.dia⁻¹. As linhagens mais rápidas, possivelmente que possuem uma tolerância geral a condição de estresse foram A158, A162, A330, A314, A373, A334, A161, A191, A332, A226, A160, A315, A423, A336 e A372 com velocidade de crescimento média acima de 4 mm.dia⁻¹. As linhagens mais lentas foram A317, A335, A155, A235, A260, A338 e A331 com velocidade de crescimento média abaixo de 3 mm.dia⁻¹.

Tabela 32. Velocidade de crescimento (VC) em mm.dia⁻¹ de linhagens de *Periconia macrospinoso* após 96 h de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) suplementado com a dosagem mais elevada de cádmio, cobre, zinco ou vinhaça em diferentes experimentos. Médias ordenadas pela VC média dos experimentos.

Dosagem máxima usada no Experimento								Média dos Experimentos	
500 mg.L ⁻¹ de Cd		1000 mg.L ⁻¹ de Cu		600 mg.L ⁻¹ de Zn		800 mL.L ⁻¹ de vinhaça		Linh.	VC
Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC		
A158	3,8 b	A158	4,7 a	A158	6,2 a	A158	7,7 c	A158	5,6
A162	3,2 c	A162	4,6 a	A162	4,8 a	A162	7,0 c	A162	4,9
A330	2,4 d	A330	4,6 a	A330	5,5 a	A330	6,5 d	A330	4,8
A314	2,9 d	A314	4,0 b	A314	5,6 a	A314	6,4 d	A314	4,7
A373	2,7 d	A373	3,2 c	A373	5,2 a	A373	7,2 c	A373	4,6
A334	2,4 d	A334	4,5 a	A334	0,1 d	A334	11,2 a	A334	4,5
A161	3,7 b	A161	1,5 f	A161	5,5 a	A161	7,5 c	A161	4,5
A191	3,2 c	A191	4,7 a	A191	3,5 b	A191	6,7 d	A191	4,5
A332	4,6 a	A332	2,4 e	A332	3,1 b	A332	7,4 c	A332	4,4
A226	4,9 a	A226	4,1 b	A226	2,1 c	A226	6,3 d	A226	4,4
A160	3,6 b	A160	5,3 a	A160	1,5 c	A160	6,9 c	A160	4,3
A315	2,5 d	A315	2,3 e	A315	5,5 a	A315	6,6 d	A315	4,2
A423	4,4 a	A423	4,3 b	A423	1,7 c	A423	6,6 d	A423	4,2
A336	3,2 c	A336	4,2 b	A336	1,3 d	A336	7,7 c	A336	4,1
A372	2,3 d	A372	2,6 d	A372	4,8 a	A372	6,2 d	A372	4,0
A424	3,4 c	A424	4,0 b	A424	1,7 c	A424	6,5 d	A424	3,9
A257	2,7 d	A257	4,3 b	A257	1,4 d	A257	7,3 c	A257	3,9
A302	1,7 e	A302	2,8 d	A302	5,3 a	A302	5,8 d	A302	3,9

Continua...

Continuação da Tabela 32.

Dosagem máxima usada no Experimento								Média dos Experimentos	
500 mg.L ⁻¹ de Cd		1000 mg.L ⁻¹ de Cu		600 mg.L ⁻¹ de Zn		800 mL.L ⁻¹ de vinhaça			
Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC
A156	2,8 d	A156	2,2 e	A156	3,6 b	A156	6,9 c	A156	3,9
A159	3,4 c	A159	3,6 e	A159	1,7 c	A159	6,5 d	A159	3,8
A356	1,9 e	A356	3,6 e	A356	2,6 c	A356	7,0 e	A356	3,8
A318	3,5 c	A318	3,3 e	A318	1,6 c	A318	6,5 d	A318	3,7
A125	1,6 e	A125	4,0 b	A125	2,9 c	A125	6,5 d	A125	3,7
A189	2,2 e	A189	2,9 d	A189	3,5 b	A189	6,3 d	A189	3,7
A157	4,6 a	A157	2,2 e	A157	1,9 c	A157	6,2 d	A157	3,7
A238	3,0 c	A238	4,1 b	A238	1,6 c	A238	6,0 d	A238	3,7
A316	1,7 e	A316	4,7 a	A316	2,2 c	A316	6,1 d	A316	3,7
A259	2,9 d	A259	3,9 b	A259	1,6 c	A259	6,1 d	A259	3,6
A499	1,4 e	A499	4,4 a	A499	2,5 c	A499	6,1 d	A499	3,6
A126	2,6 d	A126	3,0 d	A126	3,3 b	A126	5,4 e	A126	3,6
A337	3,1 c	A337	4,0 b	A337	1,3 d	A337	6,0 d	A337	3,6
A225	2,8 d	A225	3,5 e	A225	1,4 d	A225	6,6 d	A225	3,6
A328	3,8 b	A328	2,3 e	A328	1,0 d	A328	7,1 e	A328	3,6
A154	1,6 e	A154	2,5 d	A154	2,3 c	A154	7,5 e	A154	3,5
A237	3,2 c	A237	1,9 e	A237	1,8 c	A237	7,0 e	A237	3,5
A327	3,0 c	A327	3,4 e	A327	0,8 d	A327	6,5 d	A327	3,4
A111	2,2 e	A111	3,0 d	A111	3,7 b	A111	4,7 f	A111	3,4
A124	1,9 e	A124	1,9 e	A124	3,3 b	A124	6,3 d	A124	3,4
A333	2,6 d	A333	4,0 b	A333	0,3 d	A333	6,1 d	A333	3,3
A115	1,9 e	A115	2,1 e	A115	3,3 b	A115	5,7 d	A115	3,2
A236	1,0 f	A236	2,6 d	A236	3,0 b	A236	6,4 d	A236	3,2
A163	1,8 e	A163	3,4 e	A163	3,5 b	A163	4,3 f	A163	3,2
A164	2,7 d	A164	4,1 b	A164	1,6 c	A164	4,6 f	A164	3,2
A355	3,4 c	A355	1,8 f	A355	1,4 d	A355	6,3 d	A355	3,2
A447	3,4 c	A447	2,6 d	A447	0,2 d	A447	6,5 d	A447	3,2
A113	2,2 e	A113	1,0 g	A113	3,8 b	A113	5,5 e	A113	3,1
A190	2,8 d	A190	4,2 b	A190	1,4 d	A190	3,9 f	A190	3,0
A258	2,6 d	A258	2,1 e	A258	1,2 d	A258	6,3 d	A258	3,0
A224	2,6 d	A224	2,3 e	A224	1,2 d	A224	6,0 d	A224	3,0
A329	0,0 g	A329	4,2 b	A329	0,8 d	A329	6,9 e	A329	3,0
A317	1,9 e	A317	1,5 f	A317	2,5 c	A317	5,7 d	A317	2,9
A335	0,0 g	A335	1,5 f	A335	1,0 d	A335	8,9 b	A335	2,9
A155	0,9 f	A155	1,8 f	A155	1,8 c	A155	6,6 d	A155	2,8
A235	2,6 d	A235	2,8 d	A235	1,0 d	A235	4,6 f	A235	2,8
A260	2,4 d	A260	2,2 e	A260	1,2 d	A260	5,3 e	A260	2,8
A338	2,7 d	A338	1,3 f	A338	1,0 d	A338	5,1 e	A338	2,5
A331	0,0 g	A331	0,3 g	A331	1,1 d	A331	8,2 b	A331	2,4

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

Uma análise geral da velocidade de crescimento das linhagens de *Trichoderma* spp. nas condições de máximo estresse que foram submetidas (doses máximas de cádmio, cobre, zinco e vinhaça) nos diferentes experimentos do presente estudo é apresentado na tabela 33. Verifica-se que nestas condições, após 48 horas de crescimento (24 no experimento de vinhaça), que a velocidade de crescimento média das linhagens de *Trichoderma* spp. variou entre 0,5 a 18,5 mm.dia⁻¹. As linhagens mais rápidas, possivelmente que possuem uma tolerância geral a condição de estresse foram A240, A468, A511, A512, A406, A501, A361 e A514 com velocidade de crescimento média acima de 15 mm.dia⁻¹. As linhagens mais lentas foram A169 e A341 com velocidade de crescimento média abaixo de 5 mm.dia⁻¹.

Tabela 33. Velocidade de crescimento (VC) em mm.dia⁻¹ de linhagens de *Trichoderma* spp. após 48 h (24 h no experimento de vinhaça) de crescimento em meio extrato de malte-ágar (MEA) suplementado com a dosagem mais elevada de cádmio, cobre, zinco ou vinhaça em diferentes experimentos. Médias ordenadas pela VC média dos experimentos.

Dosagem máxima usada no Experimento								Média dos Experimentos	
300 mg.L ⁻¹ de Cd		1000 mg.L ⁻¹ de Cu		400 mg.L ⁻¹ de Zn		800 mL.L ⁻¹ de vinhaça		Linh.	VC
Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC
A240	7,7 e	A240	18,9 a	A240	26,9 a	A240	20,5 d	A240	18,5
A468	19,6 b	A468	9,4 e	A468	21,7 b	A468	19,5 d	A468	17,5
A511	17,2 b	A511	17,1 b	A511	17,8 d	A511	13,9 f	A511	16,5
A512	11,2 d	A512	20,6 a	A512	5,1 i	A512	29,0 b	A512	16,5
A406	29,2 a	A406	8,7 e	A406	12,2 f	A406	14,5 f	A406	16,1
A501	5,3 f	A501	19,7 a	A501	11,2 f	A501	27,2 b	A501	15,8
A361	8,1 e	A361	18,9 a	A361	7,3 h	A361	27,2 b	A361	15,4
A514	16,6 b	A514	5,4 g	A514	13,3 f	A514	25,6 b	A514	15,2
A405	19,0 b	A405	2,2 h	A405	15,8 e	A405	22,2 d	A405	14,8
A480	15,1 c	A480	11,0 d	A480	20,0 c	A480	12,5 g	A480	14,7
A263	15,5 c	A263	0,8 i	A263	20,4 c	A263	21,9 d	A263	14,7
A196	11,8 d	A196	12,8 c	A196	17,6 d	A196	16,1 e	A196	14,6
A409	15,3 c	A409	2,9 h	A409	17,4 d	A409	21,5 d	A409	14,3
A306	12,0 d	A306	1,9 h	A306	18,2 d	A306	24,2 c	A306	14,1
A460	18,1 b	A460	4,4 g	A460	17,2 d	A460	16,5 e	A460	14,0
A357	8,9 e	A357	17,8 b	A357	19,7 c	A357	8,4 h	A357	13,7
A482	10,0 d	A482	11,2 d	A482	19,5 c	A482	14,1 f	A482	13,7
A320	8,1 e	A320	5,5 g	A320	10,2 g	A320	30,2 a	A320	13,5
A400	10,5 d	A400	0,1 i	A400	10,3 g	A400	32,7 a	A400	13,4
A481	12,3 d	A481	1,1 i	A481	23,1 b	A481	16,7 e	A481	13,3
A412	13,4 c	A412	0,0 i	A412	16,3 e	A412	21,2 d	A412	12,7
A402	10,4 d	A402	0,0 i	A402	14,9 e	A402	24,9 c	A402	12,5
A359	10,3 d	A359	12,6 c	A359	14,1 e	A359	12,7 g	A359	12,4
A404	19,2 b	A404	0,0 i	A404	12,3 f	A404	18,1 e	A404	12,4
A307	16,3 b	A307	4,4 g	A307	10,2 g	A307	18,4 e	A307	12,3
A461	14,0 c	A461	3,2 g	A461	15,2 e	A461	16,6 e	A461	12,2
A483	10,1 d	A483	0,9 i	A483	21,4 b	A483	16,5 e	A483	12,2
A513	11,7 d	A513	3,8 g	A513	9,6 g	A513	23,8 c	A513	12,2
A411	18,9 b	A411	0,0 i	A411	13,1 f	A411	16,7 e	A411	12,2
A459	10,3 d	A459	4,9 g	A459	17,9 d	A459	15,0 f	A459	12,0
A377	3,0 f	A377	13,7 c	A377	10,8 f	A377	20,4 d	A377	12,0
A426	10,9 d	A426	2,7 h	A426	9,0 g	A426	24,9 c	A426	11,9
—	—	A407	7,6 f	—	—	A407	15,9 e	A407	11,7
A168	18,3 b	A168	0,2 i	A168	17,6 d	A168	9,7 h	A168	11,5
A458	17,3 b	A458	0,0 i	A458	16,6 d	A458	11,3 g	A458	11,3
A360	9,4 e	A360	8,4 e	A360	6,1 h	A360	21,3 d	A360	11,3
A410	6,8 e	A410	1,4 h	A410	19,5 c	A410	17,0 e	A410	11,2
A135	7,7 e	A135	7,6 f	A135	6,9 h	A135	22,4 d	A135	11,2
A408	10,7 d	A408	0,0 i	A408	15,7 e	A408	18,0 e	A408	11,1
A510	15,1 c	A510	0,6 i	A510	9,6 g	A510	18,7 e	A510	11,0
A399	4,6 f	A399	12,3 c	A399	16,3 e	A399	9,7 h	A399	10,7
A358	12,9 c	A358	11,4 d	A358	9,1 g	A358	9,2 h	A358	10,6
A247	15,9 c	A247	0,8 i	A247	12,2 f	A247	13,5 f	A247	10,6
A509	13,8 c	A509	2,3 h	A509	7,7 h	A509	16,3 e	A509	10,1
A193	7,5 e	A193	11,5 d	A193	8,4 g	A193	12,7 g	A193	10,0
A167	16,5 b	A167	0,0 i	A167	9,2 g	A167	12,7 g	A167	9,6
A401	6,0 f	A401	1,0 i	A401	8,2 g	A401	22,5 d	A401	9,4

Contiuna...

Continuação da Tabela 33.

Dosagem máxima usada no Experimento								Média dos Experimentos	
Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC	Linh.	VC
A229	14,2 c	A229	0,0 i	A229	8,2 g	A229	14,9 f	A229	9,3
A282	8,5 e	A282	2,3 h	A282	8,9 g	A282	17,0 e	A282	9,2
A403	7,8 e	A403	11,1 d	A403	4,0 i	A403	13,6 f	A403	9,1
A508	8,9 e	A508	2,5 h	A508	4,3 i	A508	19,5 d	A508	8,8
A319	7,8 e	A319	0,1 i	A319	9,7 g	A319	17,2 e	A319	8,7
A149	3,8 f	A149	0,7 i	A149	10,9 f	A149	18,3 e	A149	8,4
A308	4,8 f	A308	3,7 g	A308	6,4 h	A308	17,0 e	A308	8,0
A515	4,7 f	A515	5,4 g	A515	6,3 h	A515	12,2 g	A515	7,2
A342	8,0 e	A342	0,0 i	A342	6,6 h	A342	11,8 g	A342	6,6
A169	0,0 g	A169	0,0 i	A169	7,7 h	A169	11,7 g	A169	4,8
A341	0,8 g	A341	0,5 i	A341	0,0 j	A341	0,8 i	A341	0,5

Médias seguidas por mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott 5%.

A aparência e desenvolvimento da colônia de algumas linhagens de *Periconia macrospinoso* e *Trichoderma* spp. em relação às doses de excesso de metal são apresentadas a seguir nas Figuras 6, 7 e 8.

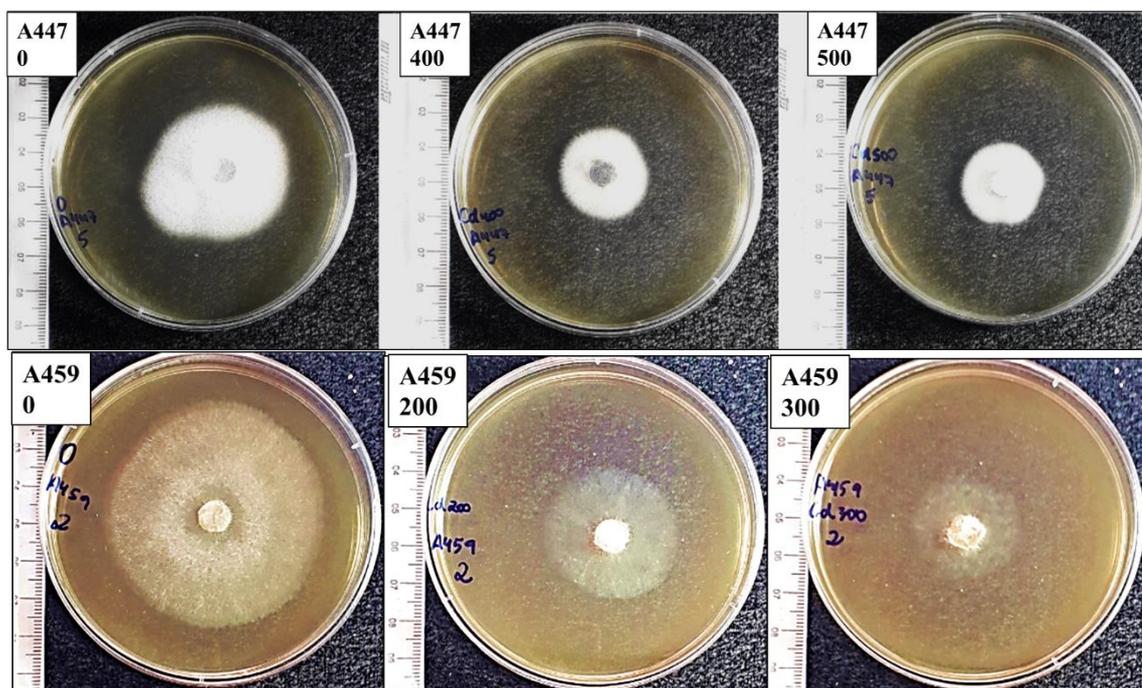


Figura 7. Aparência e desenvolvimento de colônia de linhagens de *Periconia macrospinoso*, e *Trichoderma* spp. em meio Extrato de Malte-Agar (MEA) com três níveis de cádmio especificados abaixo da identificação da linhagem em mg.L⁻¹ de Cd no meio. Fotos exemplificando a linhagem A447 de *Periconia macrospinoso* e a linhagem A459 de *Trichoderma virens*. Autor da foto: SILVA, L. C. (2021).

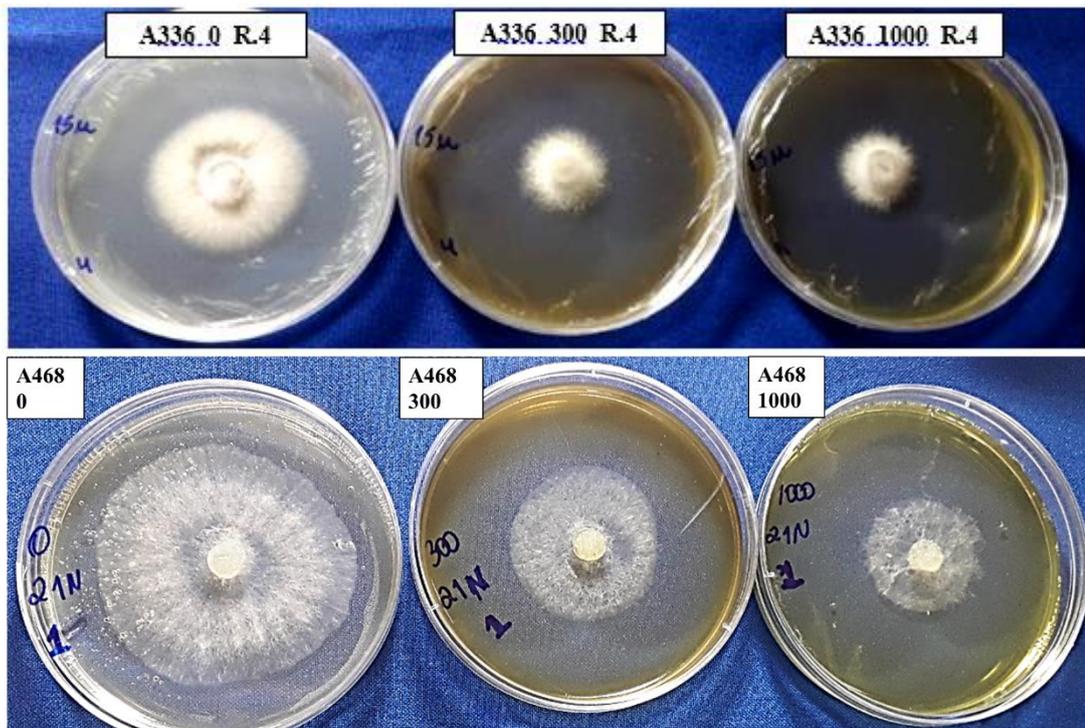


Figura 8. Aparência e desenvolvimento de colônia de linhagens de *Periconia macrospinosa*, e *Trichoderma* spp. em meio Extrato de Malte-Agar (MEA) com 0, 300 e 1000 mg.L⁻¹ de Cu no meio. Fotos exemplificando a linhagem A336 de *Periconia macrospinosa* e a linhagem A468 de *Trichoderma asperellum*. Autor da foto: SILVA, L. C. (2021).

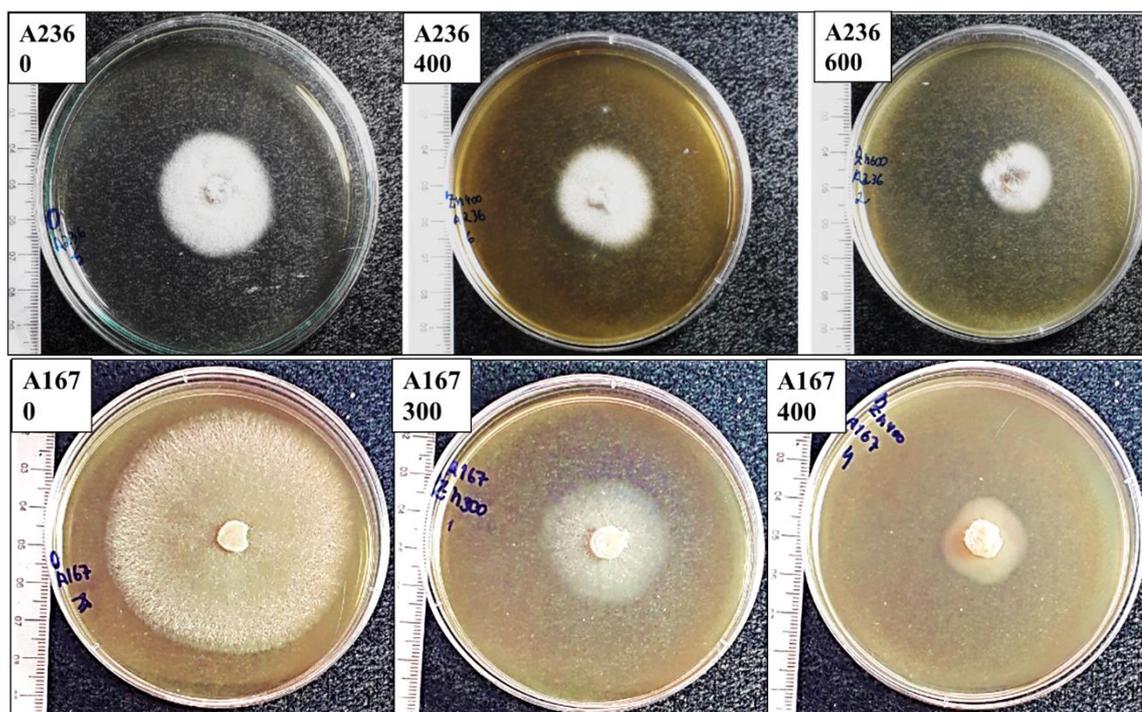


Figura 9. Aparência e desenvolvimento de colônia de linhagens de *Periconia macrospinoso*, e *Trichoderma* spp. em meio Extrato de Malte-Agar (MEA) com três níveis de zinco especificados abaixo da identificação da linhagem em mg.L⁻¹ de Zn no meio. Fotos exemplificando a linhagem A236 de *Periconia macrospinoso* e a linhagem A167 de *Trichoderma hamatum*. Autor da foto: SILVA, L. C. (2021).

5. CONCLUSÕES

Trinta e oito por cento das linhagem de *Periconia macrospinosa* e 19% das linhagens de *Trichoderma* spp estudadas apresentaram capacidade de solubilizar fosfato de cálcio em meio de Pikovskaya ágar (PVK).

Entre as linhagens de *Periconia macrospinosa*, A356 e A155 foram as mais eficientes em solubilizar fosfato de cálcio, com um índice de solubilização superior ao isolado de A521 de *Aspergillus niger*.

Entre as linhagens de *Trichoderma* spp., A169 e A513 foram as mais eficientes em solubilizar fosfato de cálcio, sendo que a primeira não diferiu o índice de solubilização do isolado A521 de *Aspergillus niger*.

Entre as linhagens de *Periconia macrospinosa* e de *Trichoderma* spp., A358, um isolado de *Trichoderma harzianum*, foi a única linhagem capaz de solubilizar fosfato de alumínio em meio de Pikovskaya ágar (PVK).

A linhagem A521 de *Aspergillus niger* foi uma testemunha positiva de solubilização eficiente, pois foi a única a solubilizar tanto fosfato de cálcio quanto fosfato de alumínio, ambos com um índice de solubilização considerado mediano.

Entre as linhagens de *Periconia macrospinosa*, as que apresentaram o maior índice de tolerância para o nível mais alto de excesso de cádmio (500 mg.L^{-1}) foram A333, A334, A332, A336, A423, A163, A355, A226 e A157, sendo todas classificadas como de moderada tolerância apesar do alto nível de Cd.

Entre as linhagens de *Trichoderma* spp., as que apresentaram o maior índice de tolerância para o nível mais alto de excesso de cádmio (300 mg.L^{-1}) foram A404, A406 e A229, sendo todas classificadas como de alta tolerância a este nível de Cd.

Entre as linhagens de *Periconia macrospinosa*, as que apresentaram o maior índice de tolerância para o nível mais alto de excesso de cobre (1000 mg.L^{-1}) foram A163 e A164, sendo que a primeira apresentou uma tolerância muito alta e a segunda uma tolerância alta a esse nível de cobre.

Entre as linhagens de *Trichoderma* spp., as que apresentaram o maior índice de tolerância para o nível mais alto de excesso de cobre (1000 mg.L^{-1}) foram A357, A240, A480 e A501, sendo todas classificadas como de moderada tolerância a este nível de cobre.

Entre as linhagens de *Periconia macrospinosa*, as que apresentaram o maior índice de tolerância para o nível mais alto de excesso de zinco (600 mg.L^{-1}) foram A163, A158, A161, A162, A373, A372, A315, A314, A330 e A302, sendo todas classificadas como de alta tolerância a este nível de zinco.

Entre as linhagens de *Trichoderma* spp., as que apresentaram o maior índice de tolerância para o nível mais alto de excesso de zinco (400 mg.L^{-1}) foram A169 e A 240, sendo que a primeira apresentou uma tolerância muito alta e a segunda uma tolerância alta a esse nível de zinco.

Entre as linhagens de *Periconia macrospinosa*, as que apresentaram o maior índice de tolerância para o nível mais alto de excesso de vinhaça (800 mL.L^{-1}) foram A316, A158, A317, A314, A373, A335, A334, A125, A356, A259, A126, A338 e A423, sendo todas classificadas como de muito alta tolerância a este nível de vinhaça.

Entre as linhagens de *Trichoderma* spp., as que apresentaram o maior índice de tolerância para o nível mais alto de excesso de vinhaça (800 mL.L^{-1}) foram A169 e A342, sendo classificadas como de muito alta tolerância a este nível de vinhaça.

Tanto as linhagens de *Periconia macrospinosa*, quanto as de *Trichoderma* spp. apresentaram grande tolerância ao excesso de vinhaça, sendo que apenas duas linhagens (A401 e A307) de *Trichoderma* foram classificadas como de baixa tolerância, sugerindo adaptação dos fungos endofíticos de cana-de-açúcar a esse resíduo aplicado às lavouras.

Entre as linhagens de *Periconia macrospinosa*, as que produziram maior quantidade de ácido indolacético por unidade de massa de micélio foram A257 e A226, sendo a produção entre 567 e 638 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Entre as linhagens de *Trichoderma* spp., as que produziram maior quantidade de ácido indolacético por unidade de massa de micélio foram A361, A401, A360, A359, A357, A358, A512 e A377, sendo a produção entre 220 e 260 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Em meio extrato de malte-ágar (MEA), a velocidade de crescimento das colônias de *Periconia macrospinosa* foi em média 4 vezes mais lento que das linhagens de *Trichoderma* spp., sendo em média 7,2 e 29,2 mm.dia^{-1} , respectivamente para cada grupo.

As linhagens de *Periconia macrospinosa* apresentam maior tolerância aos estresses causados pelo excesso de metais (cádmio, cobre e zinco) e vinhaça que as linhagens de *Trichoderma* spp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.T. da E.; GONÇALVES, C.; PATERNIANI, M.E.A.G.Z.; TUCCI, M.L.S.; CASTRO, C.E.F. de (Ed.). Instruções agrícolas para as principais culturas econômicas. 7.ed. **Revisão e atual.** Campinas: IAC, 452p. 2014.
- ALGHUTHAYMI, M. A.; ALMOAMMAR, H.; RAI, M.; SAID-GALIEV, E.; ABD-ELSALAM, A. Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. **Biotechnology, Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 221-236, 2015.
- ALMEIDA, F.P. Interferência dos fungos na adubação do solo pela vinhaça. Boletim nº 5 do **Instituto Zimotécnico da ESALQ**, Piracicaba, SP, 1953.
- ALORI, E.T.; GLICK, B.R.; BABALOVA, O.O. Solubilização de fósforo microbiano e seu potencial para uso em agricultura sustentável. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p. 1-8, 2017.
- ALTOMARE, C.; NORVELL, W. A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n.7, p. 2926-2933, 1999.
- ANAND, P.; ISAR, J.; SARAN, S.; SAXENA, R. K. Bioacumulação de cobre por *Trichoderma viride*. **Tecnologia de Biorecursos**, v.97, p. 1018-1025, 2006.
- ASHRAF, M. A., HUSSAIN, I., RASHEED, R., IQBAL, M., RIAZ, M., AND ARIF, M. S. Advances in microbe-assisted reclamation of heavy metal contaminated soils over the last decade: a review. **Journal of Environmental Management**, v.198, p. 132-143, 2017.
- AYAD,F.; MATALLAH-BOUTIBA, A.; ROUANE-HACEN, O.; BOUDERBALA, M.; BOUTIBA, Z. Tolerância de *Trichoderma* sp. aos Metais Pesados e Sua Atividade Antifúngica no Ambiente Marinho Argelino. **Jornal da Marinha Biologia e Oceanografia**, v.7, n.3, p.1-11, 2018.
- AZEVEDO, J. L. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: *Microbial Diversity and Biotechnology*. **Food Security, Springer**, New Delhi, p. 17-22, 2014.
- BADAWI, F. S. F.; BIOMY, A. M. M.; DESOKY, A. H. Peanut plant growth and yield as influenced by co-inoculation with *Bradyrhizobium* and some rhizo-microorganisms under sandy loam soil conditions. **Annals of Agricultural Science**, v. 56, p. 17-25, 2011
- BAKRI, M. M. Tri-calcium and zinc phosphates solubilization by *Aspergillus niger* and its relation to organic acids production. **BioNanoScience**, v.9, n.2, p.238-244, 2019.
- BANIK, S.; DEY, B. K. Available phosphate content of an Alluvial soil as influenced by inoculation of some isolated phosphatesolubilizing microorganisms. **Plant Soil**, v.69, p.353-364, 1982.
- BARBOSA, E. A. A.; ARRUDA, F. B.; PIRES, R. C. M.; SILVA, T. J. A. Da.; SAKAI, E. Cana-de-açúcar fertirrigada com vinhaça e adubos minerais via irrigação por gotejamento

subsuperficial: Ciclo da cana-planta. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 9, p. 952-958, 2012.

BARDIYA, M. C.; GAUR, A. C. Isolation and screening of microorganisms dissolving low-grade rock phosphate. **Folia Microbial.**, v.19, p.386-389, 1974.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Enhanced solubilization of iron and calcium phosphates by *Aspergillus niger* by the addition of alcohols. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, n.2, p.181-189, 2013.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. Solubilização do fosfato de ferro em meio de cultura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p.529-535, 2008.

BATISTA, H. R. F. **Avaliação de metodologias para a caracterização química da vinhaça em função do tempo de armazenamento**. Instituto Federal Goiano, TCC, 39p., 2021.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M.J.; BAKKER, P. A.H.M. The Rhizosphere Microbiome and Plant Health. **Trends in Plant Science**,v.17, n.8, p. 478-486, 2012.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; RAMOS, C.A. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

BOLSANELLO, J; VIEIRA, J.R. Caracterização da composição química dos diferentes tipos de vinhaça da região de Campos-RJ. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.96, p.45-59, 1980.

CAIXETA, L.B.; PEDROSA, E. M. R.; GUIMARÃES, L. M. P.; BARROS, P. Â.; ROLIM, M. M. Variações no solo e nematofauna após o corte da cana-de-açúcar e aplicação da vinhaça. **Research/Investigación**, v. 41, n. 2, p.271-280, 2011.

CAMARGO, R. de. O. Desenvolvimento da flora microbiana nos solos tratados com vinhaça. **Instituto Zimotécnico da ESALQ**, Boletim Piracicaba, SP, n. 9, p. 44, 1954.

CAÑARTE, G. V. C.; ROJAS, C. A. C.; BEJARANO, L. D. C. Capacidad solubilizadora de fosfato de aluminio por hongos rizosféricos aislados de un Andisol colombiano. **Ciências Agrárias**, v.14, N.2, p. 218-227, 2018.

CARD, S.; JOHNSON, L.; TEASDALE, S.; CARADUS, J. Decifrando o comportamento dos endófitos: a ligação entre a biologia dos endófitos e os agentes de controle biológico eficazes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, 2016.

CARVAJAL, L. H.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 615-631, 2009.

CARVALHO, P.C.T.; EIRA, A.F.; PELLEGRINO, D. Solubilização quantitativa de fosfatos insolúveis, por algumas espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. **An. ESALQ**, 26:173-185, 1969.

CAZETTA, M. L.; COLABONE-CELLIGOI, M. A. P. Aproveitamento do melão e Vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 26, n. 2, p. 105-112, 2005.

CEPEDA, M.; GAMBOA, A.; VALÊNCIA, H.; LOZANO, A. Hongos solubilizadores de fosfatos minerales aislados de la rizósfera de Espeletia grandiflora del páramo El Granizo. Bonilla, M. Bogotá, CO. Universidade nacional da Colômbia. p. 89-106, 2005.

CERRI, C.C.; POLO, A.; ANDREAUX, F.; LOBO, M. C.; EDUARDO, B.P. **Resíduos orgânicos da agroindústria canvieira: 1. Características físicas e químicas**. STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.6, n.3, p.34-37, 1988.

CETESB. **Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. 3ª Ed., 15p., 2ª vs, 2015. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2013/11/NTC-P4.231_Vinha%C3%A7a_-Crit%C3%A9rios-e-procedimentos-para-aplica%C3%A7%C3%A3o-no-solo-agr%C3%ADcola-3%C2%AA-Ed-2%C2%AA-VERS%C3%83O.pdf> Acesso em: 20 de setembro de 2020. Acesso em: 19 de novembro de 2021.

CHOLKE, S. S.; MAHALE, S. D.; DAREKAR, K. P.; DAITHANKAR, R. N. Production and Optimization of Citric Acid by *Aspergillus Niger* Isolated from Rotted Onion Bulb. **International Research Journal of Engineering and Technology (IRJET)**, v.6, n.4, p.2075-2079, 2019.

CHUN-CHAO, C.; YU-LIN K, CHEN-CHING. C.; WEI-LIANG, C. Solubilização de fosfatos inorgânicos e promoção de crescimento de planta por *Aspergillus niger*. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p. 575-584, 2007.

CLARKE, B. B.; WHITE JR, J. F.; HURLEY, R. H.; TORRES, M. S.; SUN, S.; HUFF, D. R. Endophyte-mediated suppression of dollar spot disease in fine fescues. **Plant Disease**, v.90, p.994-998, 2006.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.159-182, 2002.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento**, março/2021. Brasília, 2021.

CONAB, COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Imprensa/Notícias e Levantamento de Safras**. 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 14 de setembro de 2020

CONAB. Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. Boletim de safra. 64p., 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>, Acesso em: 08 de março de 2022.

CONTRERAS, A. R.; DORANTES, A. R.; VILLAFÁN, S. M.; JIMÉNEZ, S. P.; TOVAR, A. R.; ZÚÑIGA, L. A. G. Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. **Polibotânica**, v.1, n. 29, p. 131-147, 2010.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACIAS-RODRIGUEZ, L.; BELTRÁN-PEÑA, E.; HERRERA-ESTRELLA, A.; LOPEZ-BUCIO, J. Trichoderma-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. **Plant Signaling & Behavior**, v.6, p.1554-1563, 2011.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v.149, 1579-1592, 2009.

CORTEZ, L. A. B.; ROSELL, C. E. V.; JORDAN, R. A.; LEAL, M. R. L. V.; LORA, E. E. S. R & D needs in the industrial production of vinasse. In: CORTEZ, L. A. B. (Ed). Surgarcane bioethanol: **R&D for productivity and sustainability**, São Paulo: Blucher, p. 619-636, 2014.

COUALLIER, E. M.; PAYOT, T.; BERTIN, A. P.; LAMELOISE, M. L. Recycling of distillery effluents in alcoholic fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.133, p. 217-237, 2006.

DARMAL, N. S.; SINGH, R. B.; RAI, R. Isolation of phosphate solubilizers from different sources. **Curl'. Sci.**, v.58, p.570-571, 1989.

DENG, Z.; CAO, L. Fungal endophytes and their interactions with plants in phytoremediation: a review. **Chemosphere**, v.168, p.1100-1106, 2017.

DEVAY, J. E.; LUKEZIC, F. L.; SINDEN, S. L. INGLÊS, H. E COPLIN, D. L. Um biocida produzido por isolados patogênicos de *Pseudomonas syringae* e seu possível papel no cancro bacteriano doença dos pessegueiros. **Phytopathology**, v.58, p.95-101, 1968.

DHILLON, G. S.; BRAR, S. K.; KAUR, S.; VERMA, M. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. **Journal Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 1, 49-73. 2012.

DILENDRA, C.; SHWETA, S.; YOGESH, K. D.; LEENA, V.; PANKAJ, K. S. Isolation Of *Aspergillus Niger* From *Allium Cepa* Bulb And Production Of Citric Acid From It. **International Research Journal of Engineering and Technology**, v.5, n.1, p. 144-147, 2014.

DOYLE, L. M. G.; SCHARF, R.; SILVA FILHO, G. N. Avaliação da população e do potencial de microrganismos solubilizadores de fosfatos de solos cultivados com fruteiras temperadas em Santa Catarina. **Biotemas**, v. 2, p. 59-76, 1990.

EBELING, A. G.; ANJOS, L. H. C. D.; PEREZ, D. V.; PEREIRA, M. G.; VALLADARES, G. S. Relação entre acidez e outros atributos químicos em solos com teores elevados de matéria orgânica. **Bragantia**, v. 67, p. 429-439, 2008

EL-GHANDOUR, I. A.; ABDEL, O. A.; MOUSA, A. M.; HUSSEIN, H. G.; EASA, S. M. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Fungus *in vitro*. **Journal of Nuclear Technology in Applied Science**, v.6, n. 2, p. 93-105, 2018.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, p. 1235-1250, 2011.

FARIAS, P. S. A.; SENÁBIO, J. A.; SOARES, M. A.; SILVA, F. G.; CUNHA, A. P. A.; SOUCHIE, E. L. Assessment of functional traits in the assemblage of endophytic fungi of *Anacardium othonianum* Rizzini. **Pakistan Journal of Botany**, v. 48, n. 3, p.1241-1252, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIRA, A.; KIDO, E. A.; ALMEIDA, R. S. Identifying sugarcane expressed sequences associated with nutrient transporters and peptide metal chelators. **Genetics and Molecular Biology**, v.24 n.1/4, p. 207-220, 2001.

FONTANETTI, C. S.; BUENO, O. C. Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. 1ed. Bauru, SP: Canal 6, v. 1, p. 103-124, 2017.

FORS, O. R.; PATREZE, C. M.; BERBARA, R.L.L.; CARNEIRO, M.A.C.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J. Dark Septate Endophytic Fungi Associated with Sugarcane Plants Cultivated in São Paulo. **Brazilian Diversity**, v.12, n. 351, p. 1-21. 2020.

FORS, R.O. **Endófitos fúngicos radiculares associados à cana-de- açúcar no estado de São Paulo, Brasil**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Tese, 144 f., 2020.

FRANCO, A; MARQUES, M. O.; MELO, W. J. Sugarcane grown in an oxisol amended with sewage sludge and vinasse: Nitrogen contents in soil and plant. **Scientia Agricola**, v.65, p.408-414, 2008.

FREIRE, F. das C. O.; VASCONCELOS, F.; COUTINHO, I. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA**, v. 16, n. 1, 2014.

GADD, G. M. Fungal production of citric and oxalic acid: importance in metal speciation, physiology and biogeochemical processes. **Advances in Microbial Physiology**, v.41, p.47-92, 1999.

GADD, G. M. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. **Experientia**, v. 46, p. 834-840, 1990.

GILL, S. S.; GILL, R.; TRIVEDI, D. K.; ANJUM, N. A.; SHARMA, K. K.; ANSARI, M. W.; ANSARI, A. A.; JOHRI, A. K.; PRASAD, R.; PEREIRA, E.; VARMA, A.; TUTEJA, N. *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 332, 2016.

GOLDSBROUGH, P. B. Metal Tolerance in Plants: the role of phytochelatin and metallothioneins. In: TERRY, N.; BANUELOS, G.S. (Ed). **Phytoremediation of contaminated soils and water**, Florida: CRC Press, p.221-233, 1998.

GOMEZJURADO, M. E. G. **Solubilização de fosfato por fungos do solo e eficiência de sua inoculação em caupi e milho.** UFLA, Dissertação, 79p., 2011.

GOSWAMI, D.; PITHWA, S.; DHANDHUKIA, P.; THAKKER, J. N. Delineando *Kocuria turfanaensis* 2M4 como um PGPR credível: Uma nova bactéria produtora de IAA isolada de deserto salino. **Journal of Plant Interactions.** , v. 9, p. 566 – 576, 2014 .

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

GRÜNIG, C. R.; QUELOZ, V.; SIEBER, T.N.; HOLDENRIEDER, O. Dark septate endophytes (DSE) of the *Phialocephala fortinii* s.l. – *Acephala applanata* species complex in tree roots: classification, population biology, and ecology. **Botany**, v.86, p.1355–1369, 2008.

GUPTA, N.K.; SENGUPTA, A.; GUPTA, A.; SONAWANE, J. R.; SAHOO, H. Biosorption-an alternative method for nuclear waste management: A critical review. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p.2159-2175, 2018.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G. N.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. “O papel do solo microorganismos na melhoria da nutrição P das plantas, **Plant and Soil**, v.245, n.1, p.83-93, 2002.

HAMAYUN, M.; KHAN, S. A.; AHMAD, N.; TANG, D.S.; KANG, S.M.; NA,C.I.; SOHN, E. Y.; HWANG, Y. H.; SHIN, D. H.; LEE, B. H.; KIM, J. G.; LEE, I. J. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growthpromoting endophyte from the roots of *Glycine max*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, p. 627–632, 2009.

HANINE, H.; MOURGUES, J.; MOLINIER, J. Aconitic acid removal during cane juice clarification. **International Sugar Journal**, v.92, p.219-220, 1990.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2004.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 43, 2004.

HEFNAWY, M. A.; GHARIEB, M. M.; EISSA, O. A.; AMMAR., A. M. Evaluation and optimization of rock phosphate and tri-calcium phosphate solubilization by some soil fungi. **Egyptian Journal of Experimental Biology (Botany)**, v.5, p.75–84, 2009.

HERMANN, E. R.; CÂMARA, G. M. S. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. Piracicaba. **STAB**, v. 17, p 32-34, 1999.

HERMOSA, R.; VITERBO, A.; CHET, I.; MONTE, E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. **Microbiology**, v. 158, p.17-25, 2012.

HLIHOR, R. M.; DIACONU, M.; LEON, F.; CURTEANU, S.; TAVARES, T. E.; GAVRILESCU, M. Análise experimental e predição matemática da remoção de Cd(II) por biossorção usando máquinas de vetor de suporte e algoritmos genéticos. **New Biotechnology**, v. 32, p. 358-368, 2015.

HONG-YUAN, W.; SHEN L, L.I.; MEI, Z.; JI-ZONG, Z.; TIAN-ZHI, R.; ING-QUAN, F.; HONG-BIN, L. Preparação e utilização de biofertilizantes de fosfato usando resíduos agrícolas. **Journal of Integrative Agriculture**, v.14, n.1, p. 158-167, 2015.

HOU, L.; LI, X.; HE, X.; ZUO, Y.; ZHANG, D.; ZHAO, L. Effect of dark septate endophytes on plant performance of *Artemisia ordosica* and associated soil microbial functional group abundance under salt stress. **Applied Soil Ecology**, v.165, p. 103-998, 2021.

HOYOS-CARVAJAL, L.; ORDUZ, S.; BISSETT, J. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Trichoderma*. **Biological control**, v.51, p.409-416, 2009.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v.33, p. 163–173. 2008.

IDRIS, E. E. S.; IGLESIAS, D. J.; TALON, M.; BORRIS, R. A produção dependente de triptofano de ácido indol-3-acético (IAA) afeta o nível de promoção de crescimento de plantas por *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Mol Planta Microbio Interage**. 2007.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.257-263, 1995.

JANZEN, R. A.; ROOD, S. B.; DORMAAR, J. F.; MCGILL, W. B. *Azospirillum brasilense* produz gibber- ellin em cultura pura em meio quimicamente definido e em co-cultura em palha. **Biol do solo Biochem**, v.2, p.1061–1064, 1992.

JUNQUEIRA, C. A. R.; MOLINA-JUNIOR, V. E.; LOSSARDO, L. F.; FELICIO, B. C.; MOREIRA JUNIOR, O.; FOSCHINI, R. C.; MENDES, R. M.; LORANDI, R. Identificação do potencial de contaminação de aquíferos livres por vinhaça na bacia do Ribeirão do Pântano, Descalvado (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 39, n. 3, p. 507-518, 2009.

KAPOOR, A.; VIRARAGHAVAN, T.; CULLIMORE, D, R. Effect of phosphatesolubilizing bacteria and vesicular- arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v.26, n.2, p. 79-87, 1997.

KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n.3, p.787-795, 2010.
KEYSER, H. H.; MUNNS, D. N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. **Soil Science Society of America Journal**, v. 43, p. 519-523, 1979.

KHAN, R.; SHAHZAD, S.; CHOUDHARY, M. I.; KHAN, S.A.; AHMAD, A. Communities of endophytic fungi in medicinal plant *Withania Somnifera*. **Pakistan Journal of Botany**, v.42, n.2, p.1281-1287, 2010.

KHATER, A. E. M. Uranium and heavy metals in Phosphate Fertilizers. Uranium, Mining And Hydrogeology, [s.l.], **Springer Berlin Heidelberg**, p. 193-198, 2008.

KOCHAR, M.; SRIVASTAVA, S. Colonização de superfície por *Azospirillum brasilense* SM na melhora do crescimento dependente de ácido indol-3-acético em sorgo. **Journal of Basic Microbiology**, v.52, p.123-131, 2012.

KOK, K. H.; KARIM, M. I. A; ARIFF, A. Bioremoval of Cadmium, Lead, and Zinc using Non-living biomass of *Aspergillus flavus*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.4, p. 849-853, 2001.

KOREJO, F.; ALI, S.A.; SHAFIQUE, H.A.; SULTANA, V.; ARA, J.; EHTESHAMUL-HAQUE, S. Antifungal and antibacterial activity of endophytic *Penicillium* species isolated from *Salvadora* species. **Pakistan Journal of Botany**, v.46, n.6, p.2313-2318, 2014.

KUCEY, R. Aumento da absorção de fósforo por trigo e feijão de campo inoculado com uma cepa de *Penicillium bilaji* fosforossolubilizante e com fungos micorrízicos vesicular-arbusculares. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2699-2703, 1987.

LEAL, J. E. T.; GINAK, S. G.; ROSSI, M. M.; MUTTON, M. J. R.; MUTTON, M. A. Influência da cigarrinha-das-raízes *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae) e seus métodos de controle sobre a produtividade e a qualidade da cana-de-açúcar. **Nucleus**, Ituverava, ed. esp., p. 55-64, 2008.

LEITÃO, V. O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1083-1088, 2010.

LOPER, J. E. E.; SCHROTH, M. N. Influence of bacterial fontes de ácido indol-3-acético no alongamento da raiz da beterraba sacarina. **Phytopathology**, v. 76, p. 386-389, 1986.

LUCON, C. M. M. *Trichoderma*: o que é, para que serve e como usar corretamente na lavoura. São Paulo: **Instituto Biológico**, p. 35, 2014.

LUDOVICE, M. T. F. **Estudo do efeito poluente da vinhaça infiltrada em canal condutor de terra sobre o lençol freático**. Dissertação (Mestrado em engenharia Civil) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MANDYAM, K.G.; JUMPPONEN, A. Mutualism parasitism paradigm synthesized from results of root-endophyte models. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2015.

MASCARUA-ESPARZA, M. A.; VILLA-GONZALEZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Redução do acetileno e Produção de ácido indolacético por isolados de *Azospirillum* de plantas cactáceas. **Solo de planta**, v. 106, p. 91–95, 1988.

MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. In: BORÉM, A. (Org.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, MG: Ed. UFV, v.1, p. 205 - 252, 1999.

MENDES, G.; VASSILEV, N. B.; BONDUKI, V. H.; SILVA, I. R.; RIBEIRO, J. I. JR.; COSTA, M. D. Inhibition of *Aspergillus niger* phosphate solubilization by fluoride released from rock phosphate. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n.16, p. 4906–4913, 2013.

MENDES, G. O.; FREITAS, A. L. M.; PEREIRA, O. L.; SILVA, I. R., VASSILEV, N. B.; COSTA, M. D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 239-249, 2014.

MENDOZA-MENDOZA, A.; ZAID, R.; LAWRY, R.; HERMOSA, R.; MONTE, E.; HORWITZ, B.; MUKHERJEE, P. K. Molecular dialogue between *Trichoderma* and roots. Role of the fungal secretome. **Fungal Biology Reviews**, v. 32, n. 2, p. 62-85, 2018.

MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. *Trichoderma*: Uso na agricultura. **EMBRAPA**, Brasília, p. 538, 2019.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*, 2nd:edn Editora UFLA, Lavras. 2006.

BRIGDEN, K.; STRINGER, R.; SANTILLO, D. Heavy metal and radionuclide contamination of fertilizer products and phosphogypsum waste produced by The Lebanese Chemical Company. Greenpeace Research Laboratories, Department of Biological Sciences, University of Exeter 16p., 2002.

NAHAS, E. Microrganismos de solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, v. 61, n. 3, p. 267-275, 2002.

NARSIAN, V.; PATEL, H. H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 559-565, 2000.

NEVES, C. P.; LIMA, I. T.; DOBEREINER, J. Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Rio de Janeiro, v. 7, p.131-136, 1983.

OELMÜLLER, R.; SHERAMETI, I.; TRIPATHI, S.; VARMA, A. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. **Symbiosis**, v. 49, n. 01, p. 1-17, 2009.

OLADIPO, O. G.; AWOTOYEB, O. O.; OLAYINKAC, A.; BEZUIDENHOUTA, C. C.; MABOETA, M. S. Heavy metal tolerance traits of filamentous fungi isolated from gold and gemstone mining sites. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.4 9, p.29-37, 2018.

OLIVEIRA, A. G., CHAGAS-JUNIOR, A. F., SANTOS, G. R., MILLER, L. O.; CHAGAS, L. F. B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.7, n.3, p.149-155, 2012.

OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A.; MARRIEL, I. E.; LANA, U. G. P.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C.T.; SCHAFFERT, R. E. Vera Maria Carvalho Alves Microrganismos solubilizadores de fosfato isolados da rizosfera de genótipos de milho em plantio direto e convencional. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento-Embrapa**, 28f. 2008.

OMAR, S. A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p.211-218, 1998.

OMAY, S. H.; SCHMIDT, W. A.; MARTIN, P.; BANGERTH, F. Produção de ácido indolacético pelo rizo- bactéria esfera *Azospirillum brasilense* Cd em condições in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 187-192, 1993.

OWNLEY, B. H.; GWINN, K. D.; VEGA, F. E. Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. **BioControl**, v. 55, p. 113–128, 2010.

PANDEY, A. DAS, N; KUMAR, B; RINU, K; TRIVEDI, P. Solubilização de fosfato por *Penicillium* spp. isolado de amostras de solo da região indiana do Himalaia. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 24, p. 97-102, 2008.

PANT, A.; SAIKIA, S. K.; SHUKLA, V.; ASTHANA, J.; AKHOON, B. A.; PANDEY, R. β -Caryophyllene modulates expression of stress response genes and mediates longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Experimental Gerontology**, v. 57, p. 81–95, 2014.

PEIFFER, J. A.; SPOR, A.; KOREN, O.; JIN, Z.; TRINGE, S. G.; DANGL, J. L.; BUCKLER, E. S.; LEY, R. E. Diversity and Heritability of the Maize Rhizosphere Microbiome under Field Conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.110, n.16, p. 6548-6553, 2013.

PETROVIĆ, J. J.; DANILOVIĆ, G.; ĆURČIĆ, N.; MILINKOVIĆ, M.; STOŠIĆ, N.; PANKOVIĆ, D.; RAIČEVIĆ, V. Copper tolerance of Trichoderma species. **Archives of Biological Sciences**, Belgrade, v. 66, n. 1, p. 137-142, 2014.

POTSHANGBAM, M., DEVI, SI, SAHOO, D., STROBEL, G.A. Caracterização funcional de comunidade de fungos endófitos associada com *Oryza sativa* L. e *Zea Mays* L. **Microbiology**, v. 8, n. 325, 2017.

PRADHAN, N.; SUKLA, L.B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, p. 850-854, 2005.

PRADO, E. A. F.; VITORINO, A. C. T.; OLIVEIRA, W. H.; ESPINDOLA, D. L. P.; ARANTES, H. P. Índice de dispersão de agregados de um Latossolo Vermelho distroférico cultivado com cana sob aplicação de vinhaça. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, p. 2347-2356, 2014.

PRADO, R. M. Nutrição de plantas. **Editora UNESP**, p. 407, 2008.

PRIYADHARSINI, P.; MUTHUKUMAR, T. The root endophytic fungus *Curvularia geniculata* from *Parthenium hysterophorus* roots improves plant growth through phosphate solubilization and phytohormone production. **Fungal Ecology**, 27, p. 69-77, 2017/06/01/ 2017.

QIANG, X.; DING, J.; LIN, W.; LI, Q.; XU, C.; ZHENG, Q.; LI, Y. Alleviation of the detrimental effect of water deficit on wheat (*Triticum aestivum* L.) growth by an indole acetic acid-producing endophytic fungus. **Plant and Soil**, v.439, n. 1, p. 373-391, 2019.

RAMALHO, J. F. G. **Metais Pesados em solos com diferentes usos agrícolas no Estado do Rio de Janeiro. Seropédica.** TESE. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 160p., 1996.

RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of *microalgae Scenedesmus* sp in. ethanol vinasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, n. 5, p. 630-635, 2014.

RAWAT, R.; TEWARI, L. Effects of abiotic stress on phosphate solubilization by biocontrol fungus *Trichoderma* sp. **Current Microbiology**, v. 62, p. 1521-1526, 2011.

RICHARDSON, A. E.. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Functional Plant Biology**, v.28, p.897–906, 2001.

RICHARDSON, A; BAREA, J; MCNEILL, A; PRIGENT, C. Aquisição de fósforo e nitrogênio na rizosfera e promoção do crescimento vegetal por microrganismos. **Plant and Soil**, v. 321, p. 305-339, 2009.

RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C.; CASAGRANDE, D. V. I.; YOSHIRO, B. Plantio de cana-de-açúcar: estado da arte. **Livroceres**, ed. 2, 216 p., 2006.

ROBERTS, T. L.; JOHNSTON, A. E. Eficiência e gestão do uso de fósforo na agricultura. **Resources, Conservation & Recycling**, v.105, p.275-281, 2015.

SADEGHI, S. H.; HAZBAVI, Z.; HARCHEGANI, M. K. Controllability of runoff and soil loss from small plots treated by vinasse-produced biochar. **Science of The Total Environment**, 541, p. 483-490, 2016.

SANTOS, T. M. C.; SANTOS, M. A. L.; SANTOS, C. G.; SANTOS, V. R.; PACHECO, D. S. Fertirrigação com vinhaça e seus efeitos sobre evolução e liberação de CO₂ no solo. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 1, p. 141- 145, 2009.

SARWAR, M, KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 282–285, 1995.

SATI, S. C.; PANT, P. Avaliação da solubilização de fosfato por hifomiceto aquático endofítico *Tetracladium setigerum*. **Symbiosis**, v.77, n. 2, p. 141-145, 2018.

SESHADRI, S.; IGNACIMUTHU, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilization by different *Aspergillus niger* strains. **Chemical Engineering Communications**, v. 191, n. 8, p. 1043–1052, 2004.

SHARMA, S. B.; SAYYED, R. Z.; TRIVEDI, M. H.; GOBI, T. A. Phosphate Solubilizing Microbes: Sustainable Approach for Management Phosphorus Deficiency in Agricultural Soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 587, p. 1-14, 2013.

SHI, F.; ZHU, Y. Application of statistically-based experimental designs in medium optimization for spore production of *Bacillus subtilis* from distillery effluent. **Biocontrol**, v. 52, p. 845-853, 2007.

SILVA, D. T.; MARTINS, M. D. Qualidade microbiológica do solo fertirrigado com vinhaça. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 273 – 282, 2011.

- SILVA, F. A. **Diversidade de fungos endofíticos de clones de *Paullinia cupana* (mart.) ducke e avaliação de seus traços funcionais e potencial biotecnológico.** Dissertação, UFMT, Cuiabá, MT, 2016.
- SILVA, J. P. N.; SILVA, M. R. N. **Noções da Cultura da Cana-de-Açúcar.** Inhumas: Tecnologia de Goiás/IFG-Inhumas e a Universidade Federal de Santa Maria para o Sistema Escola Técnica Aberta do Brasil e-Tec Brasil. Ed. 21, 105 p. 2012.
- SILVA-FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 311-319, 2000.
- SOUCHIE, E. L., ABOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato in vitro por microrganismos rizosféricos de Guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.
- SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Phosphate solubilization in solid and liquid media by soil bacteria and fungi. **Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília**, v. 40, n. 11, p. 1149-1152, 2005.
- SOUZA, J. K. C.; MESQUITA, F.O.; NETO, J. D.; SOUZA, M. M. A.; FARIAS, C. H. A.; MENDES, H. C.; NUNES, R. M. A. Fertirrigação com vinhaça na produção de cana de açúcar. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 7-12, 2015.
- SURICO, G.; COMAI, L. E; KOSUGE, T. Pathogenicity of cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *Savastanoi* e seu indol mutantes deficientes em ácido acético em oliva e espiroideira. **Physiological Plant Pathology**, v. 74, p. 49- 493, 1984.
- TANASOVA, M.; STURLA, S. J. Chemistry and biology of acylfulvenes: sesquiterpene-derived antitumor agents. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 6, p. 3578– 3610, 2012.
- THOMPSON, J. F.; SCHAEFER, S. C.; MADISON, J. T. Role of aconitate isomerase in trans-aconitate accumulation plants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 3684-3688, 1997.
- TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Substâncias de crescimento de plantas produzidas por *Azospirillum brasilense* e seu efeito no crescimento do milho (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–102, 1979.
- TING, S. Y.; JIOE, A. E. In vitro assesment of antifungal activities of antagonist fungi towards pathogenic *Ganoderma boninense* under metalstress. **Biological Control**, v. 96, p. 57-63, 2016.
- TONOLI, F. C. **Adaptação de leveduras para fermentação com alto teor alcoólico.** Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Dissertação, p. 77, 2017.
- TORRES-JÚNIOR, C. V.; LEITE, J.; SANTOS, C. E. de R. e S.; FERNANDES JUNIOR, P. I.; ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e desempenho simbiótico de rizóbios de amendoim do Sudesteregião do Brasil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 6, p. 566-577, 2014.
- TSAVKELOVA, E.; OESER, B.; OREN-YOUNG, L.; ISRAELI, M.; SASSON, Y.; TUDZYNSKI, B.; SHARON, A., Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated *Fusarium* species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, p. 48-57, 2012.

VERGARA, C.; ARAUJO, K.; JÚNIOR, I.; ZILLI, J. Caracterização morfofisiológica de isolados de fungos “dark septate”. **As Ciências Biológicas nas Dimensões Humanista, crítica e reflexiva**, p. 124-135, 2019.

VITORINO, L. C., SILVA, F. G., SOARES, M. A., SOUCHIE, E. L., COSTA, A. C.; LIMA, W. C. Solubilization of calcium and iron phosphate and in vitro production of Indoleacetic acid by Endophytic isolates of *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae). **International Research Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 47-54, 2012.

VOLL, E.; FRANCHINI, J. C.; CRUZ, R. T. da; GAZZIERO, D. L. P.; BRIGHENTI, A. M.; ADEGAS, F. S. Chemical interactions of *Brachiaria plantaginea* with *Commelina benghalensis* and *Acanthospermum hispidum* in soybean cropping systems. **Journal of Chemical Ecology**, v. 30, p. 1467-1475, 2004.

WANG, Y. Y.; LI, P. S.; ZHANG, B. X.; WANG, Y. P.; MENG, J.; GAO, Y. F.; HE, X. M.; HU, X. M. Identification of phosphate-solubilizing microorganisms and determination of their phosphate-solubilizing activity and growth-promoting capability. **Bioresources**, v. 15, n.2, p. 2560-2578, 2020.

WAQAS, M.; KHAN, A. L.; KAMRAN, M.; HAMAYUN, M.; KANG, S. M.; KIM, Y. H.; LEE, I. J. Endophytic Fungi Produce Gibberellins and Indoleacetic Acid and Promotes Host-Plant Growth during Stress. **Molecules**, 17, n. 9, 2012.

WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; HELYAR, K. R. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 655- 665, 1999.

YADAV, J.; VERMA, J. P.; TIWARI, K. N. Plant Growth Promoting Activities of fungi and their Effect on Chickpea Plant Growth. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 291-299, 2011.

YASSER, M. M.; MOUSA, A. S. M.; MASSOUD, O. N.; NASR, S. H. Solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing fungi isolated from Egyptian soils. **Journal of Biology and Earth Sciences**, v. 4, n. 1, p. 83-90, 2014.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2557-2561, 2007.

ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; FRANKENBERGER, W. T. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: aplicações e perspectivas na agricultura. **Advances in Agronomy**, v. 81, p. 97-168, 2003.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, M.; SHI, X.; ZHAO, Z. Dark Septate Endophyte (DSE) Fungi Isolated from Metal Polluted Soils: Their Taxonomic Position, Tolerance, and accumulation of heavy metals in vitro. **The journal of microbiology**, v.46, n.6, p.624-632, 2008.

ZHU, J.; LI, M.; WHELAN, M. Ativadores de fósforo contribuem para a disponibilidade de fósforo legado em solos agrícolas: uma revisão. **Ciência do Ambiente Total**, v. 612, p. 522-537, 2018.