

Inoculação com *Metarhizium anisopliae* incrementa a dinâmica de fósforo em plantas de milho

Gustavo Henrique Chaves de Matos Trovato¹, Aureo Henrique Hubinger Fonseca¹, Luiz Henrique Costa Mota¹, Elcio Ferreira Santos¹

¹Instituto Federal de Mato Grosso do Sul – IFMS-MS

gustavo.trovato@estudante.ifms.edu.br, elcio.santos@ifms.edu.br

Resumo

A área cultivada com milho no Brasil cresce todos os anos. Porém, a produtividade e o crescimento dessa espécie é limitado por diversos fatores, entre eles a baixa disponibilidade de fósforo (P). Nesse sentido, insere-se o uso de microrganismos como ferramenta para o aumento da eficiência de uso de P. Desta forma, objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficiência de absorção e uso de P por plantas de milho inoculadas com *Metarhizium anisopliae*. Foi desenvolvido um experimento em casa de vegetação em delineamento experimental ao caso com cinco repetições em esquema fatorial 5 x 2 (cinco doses de P x 2 condições (com e sem o fungo)). A inoculação das plantas de milho com *Metarhizium* possibilitou a maior absorção de P e consequente maior crescimento das plantas. Destaca-se que a inoculação não influenciou a concentração de pigmentos fotossintéticos, porém incrementou a atividade da fosfatase ácida de folhas de plantas de milho.

Palavras-chave: endofíticos; *Pennisetum Americanum*; fungos

Introdução

O fósforo (P) é um elemento essencial para o desenvolvimento dos vegetais, sendo componente estrutural e atuando em processos biológicos e metabólicos como transmissão de energia, síntese de membrana e nucleotídeos, fotossíntese e transdução de sinal (PLAXTON; LAMBERS, 2015). Porém, ele é fortemente fixado em minerais e matéria orgânica do solo, resultando em problemas de disponibilidade para as plantas, principalmente em solos ácidos altamente intemperizados de áreas tropicais (KOCHAN et al., 2004). Com o aumento dos custos de fertilizantes e as preocupações com diminuição das reservas de rocha fosfática, o uso de P pelas culturas deve ser tornar mais sustentável e eficiente (NOVAIS et al., 2007). Nesse sentido, insere-se o uso de fungos entomopatogênicos como ferramenta para o aumento da eficiência de uso nutricional de P por plantas de milho (BLEVINS, 1999).

O estudo dos fungos entomopatogênicos para controle de insetos praga já é bastante conhecido e estudado a anos. No entanto, nos últimos anos, vem se descobrindo novas utilidades dos entomopatógenos além do controle das pragas. Neste sentido, os fungos entomopatogênicos pode viver parte do seu ciclo de vida de forma endofítica nas

plantas, sem causar nenhuma doença na planta hospedeira (VEGA et al., 2009), desta forma pode atuar de maneira preventiva contra ao ataque de pragas e doenças a longo prazo, atuando também na melhoria do crescimento das plantas e na dinâmica nutricional de plantas (BAMISILE et al., 2018). Dentre os fungos entomopatogênicos com potencial para uso no manejo nutricional de plantas destacam-se o *Metarhizium anisopliae*.

O *Metarhizium anisopliae* é uma das espécies mais estudadas sobre o controle biológico de pragas, sendo uma maneira mais sustentável, de custo mais baixo e alta eficiência no controle, se comparado aos inseticidas químicos utilizados nos dias atuais. Além do efeito no controle de pragas o uso de *Metarhizium anisopliae* também promove a promoção de crescimento das plantas por diversos fatores, dentre eles a melhoria na absorção de nutrientes como fósforo (BEHIE et al., 2012; BEHIE e BIDOCHKA, 2014).

A simbiose das plantas com microrganismos é uma estratégia adaptativa para a deficiência de P nos solos (SPATAFORA et al., 2016), de modo que os fungos podem atuar como ponte entre o P e as raízes das plantas, além de modificações hormonais que influenciam a expressão de transportadores de alta afinidade em raízes e vasos condutores (COOKE, 1977). Os principais mecanismos que fungos proporcionam maior absorção de P pelas plantas envolvem a maior exploração física do solo em função das suas hifas, que permitem a absorção para além da zona de depleção do nutriente (SMITH; READ, 2010), a absorção de P solúvel, não lábil (MEDINA et al., 2006; CARDOSO et al., 2006) e orgânico (FENG et al., 2003).

Desse modo, trabalhos que avaliem a inoculação com fungos entomopatogênicos no aumento da eficiência de uso de P em plantas de milho durante a fase inicial do desenvolvimento constitui em uma possível estratégia para redução do uso de adubos fosfatadas na agricultura brasileira. Nesse caso, o objetivo do projeto foi verificar a inoculação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a cultura do milho (*Pennisetum glaucum*), analisando a absorção e eficiência do uso de fósforo nas plantas em casa de vegetação.

Metodologia

Produção dos Fungos e preparo das suspensões

Os isolados de *Metarhizium anisopliae* (ESALQ-1037) foram multiplicados em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar) + 5 g.L⁻¹ de antibiótico Pentabiótico. A viabilidade dos conídios utilizados nos experimentos foi determinada 24 horas antes da utilização nos experimentos seguindo a metodologia de Oliveira et al. (2015). Para o preparo das suspensões fúngicas foram utilizadas solução de Tween 80® a 0,01% (v/v) adicionadas as placas de multiplicação dos fungos e por meio de diluição seriada a concentração foi ajustada para 1 x 10⁸ conídios viáveis.mL⁻¹ com auxílio da câmara de Neubauer.

Preparo das unidades experimentais

O experimento foi desenvolvido no Instituto Federal de Mato Grosso (IFMS), em Nova Andradina, MS. A unidade experimental utilizada foi constituída por um vaso de 3 kg preenchido com 2,5 kg de um solo de textura arenosa. Para tal, amostras da camada superficial (de 0 a 20 cm de profundidade) foram coletadas na cidade de Nova Andradina. Antes da instalação dos experimentos, as amostras de solo, depois de coletadas, foram secas ao ar e passadas em peneira de 4 mm de abertura de malha. Posteriormente, subamostras, denominadas de terra fina seca ao ar (TFSA), foram passadas em peneira de 2 mm de abertura de malha, homogeneizadas, amostradas e caracterizadas quanto aos aspectos físico-químicos.

Condução experimental

O experimento foi montado em delineamento inteiramente aleatorizado com 4 repetições por tratamento em esquema fatorial 5 X 2, sendo avaliada a interação de cinco doses de P₂O₅ (0, 25, 50, 100 (recomendado) e 120 kg ha⁻¹) e duas formas de inoculação (com e sem inoculação) para o fungo (*Metarhizium anisopliae*), com cinco repetições. A doses de P foram escolhidas de acordo com a recomendação para milho segundo Sousa e Lobato (2004). A inoculação dos fungos ocorreu via semente no dia da semeadura. Para inoculação da suspensão fúngica nas sementes, grupos de 10 sementes foram embebidas em 50 mL da suspensão por um período de 2 horas, após esse período as mesmas foram peneiradas para retirar o excesso de suspensão e deixadas sobre um papel filtro até ficarem completamente secas, posteriormente foi realizada a semeadura, sendo colocada 4 sementes por vaso, como controle serão aplicado o mesmo experimento embebendo a sementes apenas em solução de Tween 80® a 0,01% (v/v).

Análise de plantas

Quando as plantas atingiram o estágio reprodutivo, foi mensurada a altura e diâmetro das plantas. Com o objetivo de avaliar a disponibilidade fisiológica do P influenciada pela assimilação de P e inoculação com fungos, foi realizada a atividade da fosfatase ácida nas folhas de milho

(Raposoet al. 2004). Nesse mesmo tecido vegetal foram avaliadas as concentrações de clorofila a, clorofila b e carotenoides conforme o descrito por Lee et al. (1987).

Posteriormente, a parte aérea e as raízes das plantas serão coletadas, lavada em água corrente, acondicionada em sacos de papel e colocados em estufa com circulação forçada de ar, mantida a 60 °C por 72 h. Após seco, todo o material foi pesado, para obtenção da massa seca, moído em moinho tipo Willey, dotado de peneira de 40 mesh, homogeneizado e, posteriormente, acondicionado em sacos de polietileno, devidamente identificados, e armazenado em câmara seca até o momento das análises.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental será inteiramente casualizado, arranjando em esquema fatorial (5 x 2), sendo cinco doses de fósforo e duas formas de inoculação, com cinco repetições, totalizando 50 unidades experimentais. Os resultados serão submetidos à análise de variância (ANOVA), seguindo de estudos de regressão polinomial para as interações significativas e/ou efeito das doses. A análise estatística será realizada utilizando o programa estatístico SAS.

Resultados e Discussão

A figura 1 ilustra a comparação de doses com a inoculação do fungo *Metarhizium anisopliae* e sem a inoculação. Demonstrando os resultados das avaliações de altura de plantas (A), diâmetro do caule (B), massa seca das raízes (C) e parte aérea (D), em doses de 0, 25, 50, 100 (recomendado) e 120 kg ha⁻¹ (LOBATO e DE SOUSA, 2004). Para a cultura do milho plantas inoculadas com a presença de *Metarhizium anisopliae* observou-se relevância significativa, e a sua interação com o microrganismo promoveu maior altura e diâmetro do caule se comparadas com as testemunhas. Elena, et. al, (2011), demonstrou um aumento na altura de planta, peso de massa seca de raízes e da parte aérea em plantas inoculadas com *Metarhizium anisopliae* na cultura do tomate (*Solanum lycopersicum*). O autor ainda relata que o fungo *Metarhizium anisopliae* pode ser usado como potencial promotor de crescimento, aumentando a resistência da planta e seu desenvolvimento. Em relação aos pesos de massa seca de raiz e parte aérea, demonstrou que a inoculação com o *Metarhizium anisopliae* aumentou significativamente em relação à testemunha, principalmente, se comparada em doses mais baixas de fósforo. Sasan e Bidocka (2012), relatam que a colonização da raiz de gramas por fungos de *Metarhizium*, leva a um expressivo crescimento do sistema radicular, que por sua vez, pode resultar em uma maior interação entre hifas dos fungos e raízes das plantas. Em consequência do maior crescimento de raízes, a planta apresenta maior crescimento da parte aérea. Um efeito bem comum sobre o desenvolvimento das raízes é o aumento significativo das suas raízes laterais e formações de pelos radiculares identificados em plantas tratadas com fungos do gênero

Metarhizium, quando comparado com plantas que não foram tratadas (SASAN; BIDOCCA, 2012).

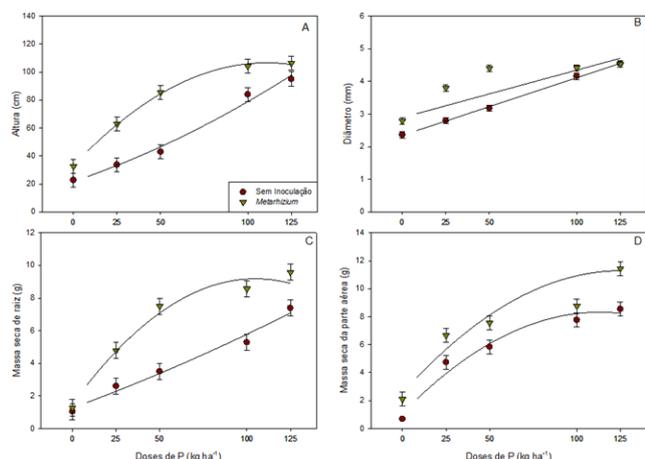


Figura 1. Altura (A), diâmetro (B) e massa seca de raiz (C) e parte aérea (D) de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Metarhizium*.

Na figura 2, são expressos os resultados de concentração e acúmulo de fósforo na raiz (A, B) e parte aérea (C, D) de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Metarhizium anisopliae*. Os valores em plantas inoculadas com o fungo foram superiores aos encontrados na testemunha, o que resultou em plantas com maior concentração e acúmulo de fósforo nas raízes e na parte aérea. Souza, *et al.*, (2011), define a interação entre as plantas e o fungo como responsável pela solubilização e absorção de maior quantidade de P, por ter maior exploração física do solo, as hifas do fungo são capazes de ultrapassar a zona de depleção do nutriente. O autor ainda cita que a aquisição e transporte do nutriente do solo até as raízes se torna mais eficiente. Sendo assim, por ter maior área de contato das raízes com o solo, aumentando a solubilização e absorção de fósforo (P). Dessa forma, ao aumentar a solubilização e absorção de fósforo (P), pela maior área de contato das raízes com o solo, ocorre o acréscimo das concentrações de fósforo na raiz e parte aérea. Além disso, é possível observar estabilidade na concentração de fósforo na parte aérea das plantas inoculadas, do que as plantas sem inoculação, em doses mais altas, não mostrando diferenças significativas entre 100 e 120 kg ha⁻¹.

A figura 3 expõe os dados de concentração de clorofila (A), clorofila (B), carotenóides (C) e clorofila total em folhas de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Metarhizium*. Os resultados obtidos se mostraram semelhantes entre os dois tratamentos, não diferenciando as concentrações de clorofila (A), clorofila (B), carotenóides (C) e clorofila total. Sendo assim, nesses aspectos, a inoculação com

Metarhizium anisopliae não altera as constituições da clorofila.

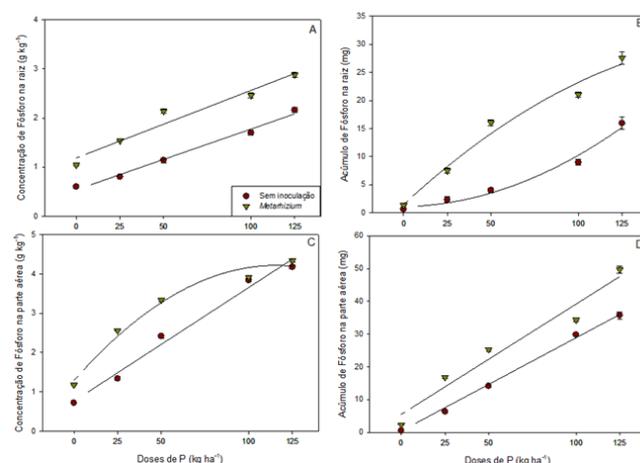


Figura 2. Concentração e acúmulo de fósforo na raiz (A, B) e parte aérea (C, D) de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Metarhizium*.

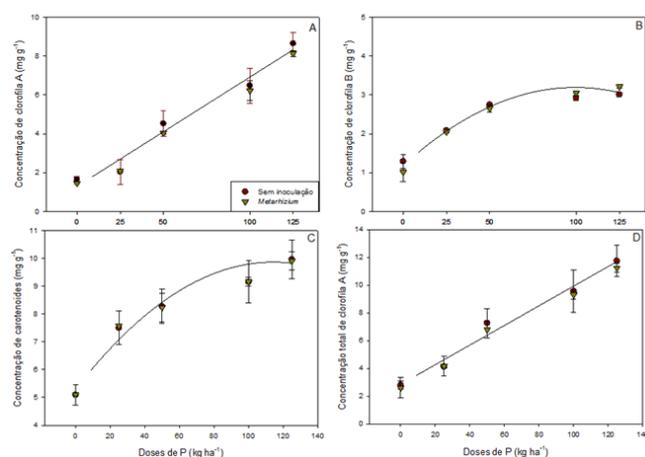


Figura 3. Concentração de clorofila (A); clorofila (B); carotenóides (C) e clorofila total em folhas de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Metarhizium*

Na figura 4, está representada a atividade da fosfatase ácida em folhas de milho cultivadas em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Metarhizium anisopliae*. A atividade da fosfatase ácida em plantas de milho inoculadas com o fungo foram superiores às plantas sem inoculação, principalmente nas doses mais baixas de fósforo. De acordo com Bonilla, (2015), os fungos entomopatogênicos são potenciais produtores de fosfatase ácida, fator que aumenta a resposta da planta sobre o fósforo, visto que, estas enzimas desempenham um papel fundamental na mobilização e aquisição de fosfato. Dessa forma, ao verificar maior atividade da fosfatase ácida nos

tratamentos com fungos, foi possível considerar uma maior resposta entre a necessidade do fósforo e a atividade das enzimas para solubilizar e deixar o nutriente prontamente disponível para a planta.

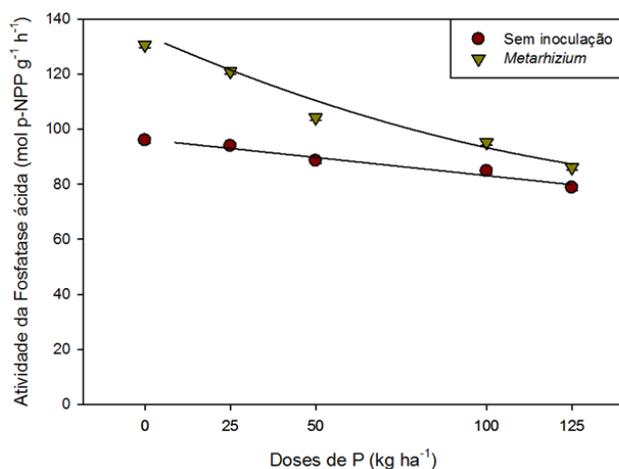


Figura 4. Atividade da fosfatase ácida em folhas de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Metarhizium*.

Considerações Finais

A inoculação das plantas de milho com *Beauveria* possibilitou a maior absorção de P e conseqüente maior crescimento das plantas. Destaca-se que a inoculação não influenciou a concentração de pigmentos fotossintéticos, porém incrementou a atividade da fosfatase ácida de folhas de plantas de milho.

Agradecimentos

Ao Programa de Iniciação Científica e Tecnológica do Instituto Federal de Mato Grosso do Sul e CNPq (IFMS) pela concessão de bolsa ao primeiro autor e apoio financeiro para execução do projeto.

Referências

BAMISILE, B. S.; DASH, C. K.; AKUTSE, K. S.; KEPPANAN, R.; AFOLABI, O. G.; HUSSAIN, M.; QASIM, M.; WANG, L. Prospects of endophytic fungal entomopathogens as biocontrol and plant growth promoting agents: An insight on how artificial inoculation methods affect endophytic colonization of host plants. *Microbiological Research*, v. 217, p. 34-50, 2018.

BLEVINS, D. G. Por que as plantas precisam de fósforo? *Informações Agrônomicas*, Piracicaba, n. 87, p. 4-5, 1999.

BONILLA, G. A. E. Efeito da inoculação de bactérias mobilizadoras de fósforo na compostagem e no

desenvolvimento da cana-de-açúcar. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2015.

CARDOSO, I. M.; BODDINGTON, C.; JANSSEN, B. H.; OENEMA, O.; KUYPER, T. W. Differential access to phosphorus pools of an Oxisol by mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, New York, v. 37, p. 1-15, 2006.

COOKE, R. et al. *The biology of symbiotic fungi*. New York: John Wiley and Sons., 1977.

DE SOUZA, F. A.; GOMES, E. A.; DE VASCONCELOS, M. J. V.; DE SOUSA, S. M. Micorrizas arbusculares: perspectivas para aumento da eficiência de aquisição de fósforo (P) em Poaceae-gramíneas. *Embrapa Milho e Sorgo*. Sete Lagoas, MG. 2011.

FARIA, M. R de; MAGALHÃES, B. P. O uso de fungos entomopatogênicos no Brasil. *Biociência*, v. 22, n. 1, p. 18-21, 2001.

FARIAS, C. P. Fungos promotores do crescimento vegetal e da fitorremediação de metais pesados em combinação com biochar. 2018.

FENG, G.; SONG, Y. C.; LI, X. L.; CHRISTIE, P. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 22, p. 139-148, 2003.

GASSEN, M. H.; BATISTA FILHO, A.; ZAPPELINI, L. O.; WENZEL, I. M. Efeito de agrotóxicos utilizados na cultura da goiaba sobre o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arq. Inst. Biol.*, v. 75, p. 327-342, 2008.

KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PINEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 55, p. 459-493, 2004.

LEE, D.W.; BRAMMEIER, S.; SMITH, A.P. The selective advantages of anthocyanins in developing leaves of mango and cacao. *Biotropica*, Washington, v. 19, n. 1, p. 40-49, 1987.

MEDINA, A.; VASSILEV, N.; BAREA, J. M.; AZCON, R. The growth-enhancement of clover by *Aspergillus*-treated sugar beet waste and *Glomus mosseae* inoculation in Zn contaminated soil. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, v. 33, p. 87-98, 2006.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV/DPS, 1999. 399 p.

OLIVEIRA, M. A. D.; ZUCARELI, C.; FERREIRA, A. S.; DOMINGUES, A. R.; SPOLAOR, L. T.; NEVES, C. S. Adubação fosfatada associada à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desempenho agrônomico do

milho. Revista de Ciências Agrárias, Belém, v. 38, n. 1, p. 18-25, 2015.

SMIT, A. L.; BINDRABAN, P. S.; SCHRÖDER, J. J.; CONJIN, J. G.; VAN DER MEER, H. G. Phosphorus in agriculture: global resources, trends and developments. Plant Research International, Wageningen, n. 282, 2009. Disponível em: <https://edepot.wur.nl/12571>. Acesso em: 24 fev. 2021.

SOUSA, D. M. G.; LOBATO, E; Cerrado: correção do solo e adubação. Embrapa Informação Tecnológica; Planaltina, DF. Embrapa Cerrados. Brasília, DF, p. 416. 2004.

SPATAFORA, J. W.; CHANG, Y.; BENNY, G. L.; LAZARUS, K.; SMITH, M. E.; BERBEE, M. L.; JAMES, T. Y. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. Mycologia, New York, v. 108, n. 5, p. 1028-1046, 2016.

TALL, S.; MEYLING, N.V. Probiotics for Plants? Growth Promotion by the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* Depends on Nutrient Availability. Microbial Ecology, v. 76, p. 1002–1008, 2018.

VEGA, F.E. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. Mycologia, v. 110, p. 4–30, 2018.

XIAO, G; YING, S. H; ZHENG, P; WANG, Z. L; ZHANG, S; XIE, X. Q; SHANG, Y; LEGER, R. J. S; ZHAO, G; WANG, C; FENG, M. G. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. Scientific reports, 2:1-10, 2012.

Inoculation with *Metarhizium anisopliae* increases phosphorus dynamics in millet plants

Abstract: *The area cultivated with millet in Brazil grows every year. However, the productivity and growth of this species is limited by several factors, including the low availability of phosphorus (P). In this sense, the use of microorganisms is inserted as a tool to increase the efficiency of P use. In this way, the objective of this work was to evaluate the efficiency of absorption and use of P by millet plants inoculated with Metarhizium anisopliae. A greenhouse experiment was carried out in a case-by-case experimental design with five replications in a 5 x 2 factorial scheme (five doses of P x 2 conditions (with and without the fungus). It is noteworthy that the inoculation did not influence the concentration of photosynthetic pigments, but it increased the activity of acid phosphatase in the leaves of millet plants.*

Keywords: *endophytes; Pennisetum Americanum; fungi*