

Eficiência de uso de fósforo em plantas de milho inoculadas com *Beauveria bassiana*

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

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

aureo.fonseca@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 *Beauveria bassiana*. 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 *Beauveria* 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 (KOCHIAN 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 microrganismos como ferramenta para o aumento da eficiência de uso nutricional de P por plantas de milho (BLEVINS, 1999). Dentro os microrganismos com potencial agente modulador da dinâmica nutricional, destaca-se a utilização de fungos entomopatogênicos que usualmente são utilizados para o controle de pragas, mas tem demonstrado efeito na absorção de P em plantas, como a *Beauveria bassiana* (TALL; MEYLLING, 2018; VEGA, 2018).

A *Beauveria bassiana* é um dos fungos entomopatogênicos mais utilizados em todo o mundo, por ter a capacidade de infectar e se desenvolver em centenas de espécies de insetos, como lepidópteros, coleópteros, hemípteros, dípteros, himenópteros e ortópteros. Assim, seu uso no controle de pragas nas culturas vem sendo cada vez mais estudado e comum na agricultura por meio de formulações e bioinseticidas a base desse fungo (OLIVEIRA, et al., 2015). Além disso, Xiao et al. (2012) relatam que a grande quantidade de hospedeiros da *Beauveria bassiana*, permite ser utilizada também contra diversos patógenos de doenças humanas.

No controle biológico de pragas, a *Beauveria bassiana* infecta os insetos através da penetração direta de sua cutícula, atuando como inseticidas de contato, ao contrário de vírus e bactérias. Em aplicações químicas e industriais, o fungo ainda tem capacidade de ação como um biocatalisador, acelerando as reações químicas (GASSEN, et al., 2008).

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).

Por ter grande eficiência no controle, com capacidade de infectar, se desenvolver e provocar a morte de centenas de espécies de insetos pragas em diferentes culturas, a *Beauveria Bassiana* é um dos fungos mais utilizados em plantas. No entanto, em algumas ocasiões, tem capacidade de acelerar reações químicas, atuando como um biocatalisador. Dessa forma, ao promover o crescimento das plantas, auxilia a absorção de nutrientes, principalmente, o fósforo, por ter baixa mobilidade no solo e pouca disponibilidade para as plantas.

Sendo assim, com o trabalho objetivou-se verificar a eficiência do uso de fósforo em plantas de milho (*Pennisetum glaucum*) inoculadas com *Beauveria Bassiana*,

a fim de reduzir o uso de adubos fosfatados em sua produção, visto que, o milho é uma cultura sensível à deficiência de P nas fases iniciais de seu desenvolvimento, após o esgotamento do estoque interno da semente.

Metodologia

Produção dos Fungos e preparo das suspensões

Os isolados dos fungos *Beauveria bassiana* (ESALQ-PL63) foram multiplicados em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose e Ágar) + 5 g.L⁻¹ de antibiótico Pentabiotico. A viabilidade dos conídios utilizados nos experimentos será 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 será ajustada para 1×10^8 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 cada fungo (*Beauveria bassiana*), 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.

Análise de plantas

Quando as plantas entraram no 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 na folha diagnose do milho (Raposo et 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 foram 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.

As amostras vegetais serão submetidas à digestão por via úmida, com ácido nítrico (HNO₃) e ácido perclórico (HClO₄), na proporção de 2:1 (v/v). Massas de 0,5 g do material vegetal seco foram pesadas em uma balança digital. As amostras foram colocadas em tubo digestor, acrescidas de 6,0 mL da mistura ácida e tampadas com filme de PVC, permanecendo à temperatura ambiente por um período mínimo de 24 h. Após esse período, as amostras foram transferidas para um bloco digestor, equipado com um condensador de refluxo, iniciando-se o processo a 50°C, e lentamente aumentando a temperatura até atingir a marca de 160°C, permanecendo neste patamar até o volume ser reduzido à metade e cessar o desprendimento do vapor castanho de NO₂. Em seguida, a temperatura foi aumentada gradativamente até 210°C e mantida até cessar o desprendimento do vapor branco de HClO₄ e iniciar o clareamento e a redução do volume do extrato (MALAVOLTA et al., 1997). Após esfriar, os extratos foram transferidos para tubos estéreis tipo Falcon, e o volume foi completado a 50 mL com água ultrapura. Todas as análises serão feitas em triplicata. Os teores de P na parte aérea, determinados por colorimetria.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi 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 foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguindo de estudos de regressão polinomial para as interações significativas e/ou efeito das doses. A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos através das avaliações de altura de plantas (A), diâmetro do caule (B), massa seca das raízes (C) e parte aérea (D), foram evidenciados na figura 1, sendo comparadas as plantas sem inoculação e com inoculação de *Beauveria bassiana*, nas doses de 0, 25, 50, 100 (recomendado) e 120 kg ha⁻¹ (LOBATO e DE SOUSA, 2004).

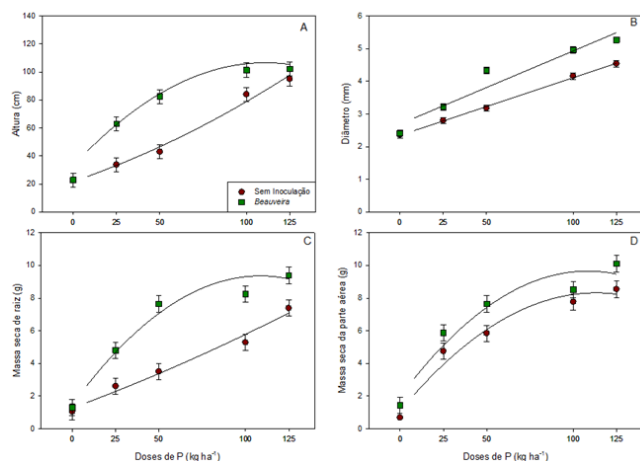


Figura 1. Altura (A), diâmetro (B) e massa seca de raiz (C) e parte aérea (D) de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Beauveria bassiana*.

As plantas em que houve a inoculação do fungo apresentaram relevância significativa. A interação com o microrganismo promoveu maior altura e diâmetro do caule se comparadas com as testemunhas. Assim, Bamišile, *et al.* (2018), reforça o uso de *B. bassiana* como potencial promotor de crescimento, além de aumentar o desenvolvimento e resistência da planta.

Além disso, os aspectos de massa seca das raízes (C) e parte aérea (D) também se mostraram superiores nas plantas inoculadas com o fungo entomopatogênico. A superioridade de massa seca de raízes e da parte aérea mostrou maior relevância à testemunha, principalmente, se comparada em doses mais baixas de fósforo (P). A redução no uso de adubos fosfatados pode ser suprida pelo uso de *B. bassiana*, inoculada a semente, por sua capacidade de potencializar o crescimento de raízes, fator que aumenta a área de contato das raízes, consequentemente, maior absorção do nutriente. Faria e Magalhães (2001), relatam que esses fatos ocorrem pela capacidade desses microrganismos em estimular a produção de fitohormônios na planta e contribuir na translocação e absorção de nutrientes. De acordo com Farias (2018), esses fungos são capazes de produzir e induzir as

plantas a sintetizar auxinas, principal hormônio responsável pelo crescimento de raízes.

A figura 2 apresenta as determinações 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 *Beauveria bassiana*. Assim como nos aspectos acima citados, a inoculação de sementes de milho com *B. bassiana*, resultou em plantas com maior concentração e acúmulo de fósforo nas raízes e na parte aérea, em relação com plantas sem inoculação. Segundo de Souza, *et al.*, (2011), por ter maior exploração física do solo, as hifas do fungo são responsáveis pela solubilização e absorção de P, a aquisição e transporte do nutriente do solo até as raízes se torna mais eficiente, indo além da zona de depleção do nutriente. 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. De Souza, *et al.*, (2011), ainda cita a maior capacidade do fungo em acumular P, através de suas hifas. 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.

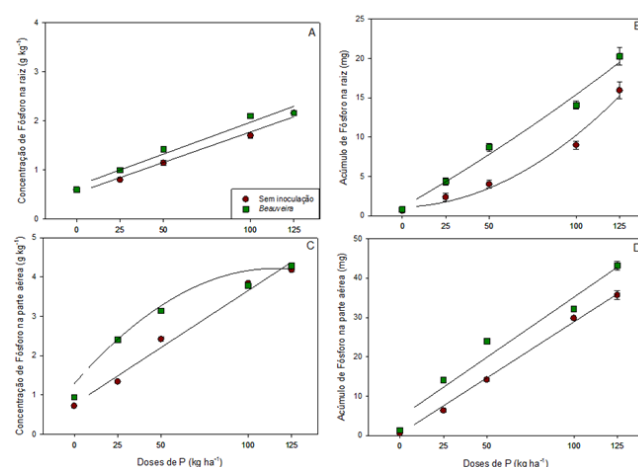


Figura 2. Concentração e acúmulo de fósforo na raiz (A, B) e parte aérea (C, D) de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Beauveria*.

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 *Beauveria*. 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 *Beauveria* não altera as constituições da clorofila.

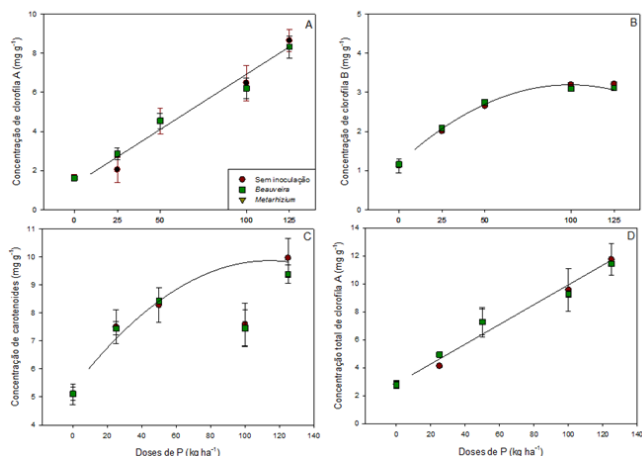


Figura 3. Concentração de clorofila (A); clorofila (B); carotenóides (C) e clorofila total em folhas de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Beauveria*

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 *Beauveria*. 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.

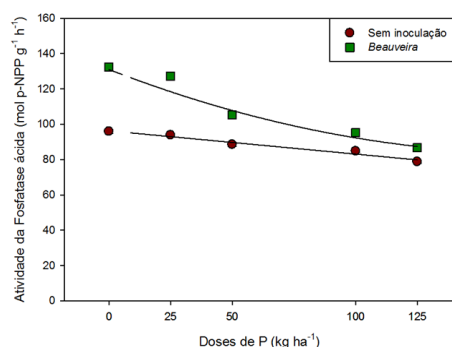


Figura 4. Atividade da fosfatase ácida em folhas de milho cultivado em diferentes doses de fósforo (P) em plantas sem inoculação e com inoculação de *Beauveria*.

Considerações Finais

A inoculação das plantas de milho com *Beauveria* 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.

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. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, 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 agronômico 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.

Phosphorus use efficiency in millet plants inoculated with *Beauveria bassiana*

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 Beauveria bassiana. A greenhouse experiment was carried out in a case-by-case 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*