

**HEND PEREIRA DE OLIVEIRA**

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE FERTILIZANTES FOSFATADOS  
ENRIQUECIDOS COM *Trichoderma harzianum*: EFEITOS NO CRESCIMENTO  
INICIAL DE PLANTAS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Samuel Vasconcelos Valadares

Coorientador: Edson Marcio Mattiello

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

O48p  
2021

Oliveira, Hend Pereira de, 1991-  
Produção e avaliação de fertilizantes fosfatados  
enriquecidos com *Trichoderma harzianum*: efeitos no  
crescimento inicial de plantas de milho / Hend Pereira de  
Oliveira. – Viçosa, MG, 2021.

1 dissertação eletrônica (52 f.): il.

Orientador: Samuel Vasconcelos Valadares.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2021.082>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Milho - Crescimento. 2. Fertilizantes fosfatados.  
3. Eficiência. 4. Fosfatos - Solubilidade. 5. Superfosfatos.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Solos.  
Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas.  
II. Título.

CDD 22. ed. 633.15895

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto CRB6 252


**HEND PEREIRA DE OLIVEIRA**

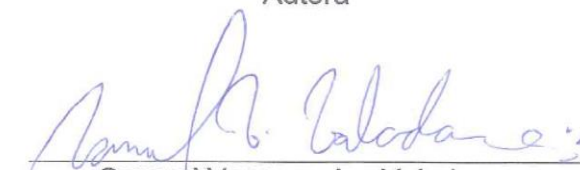
**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE FERTILIZANTES FOSFATADOS  
ENRIQUECIDOS COM *Trichoderma harzianum*: EFEITOS NO CRESCIMENTO  
INICIAL DE PLANTAS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de julho de 2021.

Assentimento:

  
Hend Pereira de Oliveira  
Autora

  
Samuel Vasconcelos Valadares  
Orientador

*A Deus, por tudo e por tanto.  
Aos meus pais, pelo amor e dedicação.  
Aos meus irmãos todos aqueles que se alegram por essa conquista.*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me concedido a fé e saúde, perseverança e inspiração.

Aos meus pais João e Cláudia por todo amor e dedicação.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio através da concessão da bolsa de estudos.

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

Ao professor Samuel Vasconcelos Valadares, pela orientação, por acreditar em meu trabalho e por sempre me motivar a fazê-lo da melhor forma.

Ao professor Edson Marcio Mattiello, pela coorientação, pelas valiosas sugestões durante o trabalho, sobretudo no período de planejamento do trabalho.

Ao meu noivo Raphael Melo pela ajuda, sugestões, motivação e por compartilhar dos meus sonhos.

Aos meus irmãos Halaine e Wender, minhas referências em foco, perseverança e dedicação.

A todos amigos dos laboratórios de Fertilidade do solo e de Fertilizantes que me ajudaram na execução deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para o êxito deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)*

## RESUMO

OLIVEIRA, Hend Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2021. **Produção e avaliação de fertilizantes fosfatados enriquecidos com *Trichoderma harzianum*: efeitos no crescimento inicial de plantas de milho.** Orientador: Samuel Vasconcelos Valadares. Coorientador: Edson Marcio Mattiello.

O fósforo (P) é um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento de plantas em solos tropicais. A aplicação de fertilizantes fosfatados é uma prática fundamental para a reposição de P ao solo visando aumentar sua disponibilidade para as culturas agrícolas. Esforços contínuos para melhorar a eficiência de uso de fertilizantes fosfatados são também essenciais para garantir a sustentabilidade da produção de alimentos, fibras, madeira e energia nessas áreas. Uma estratégia promissora para o aumento da eficiência da adubação fosfatada é o uso de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF). Muitos desses organismos podem ser utilizados para aumentar a disponibilidade de P no solo, bem como sua aquisição pelas plantas, dentre outros efeitos benéficos. No presente estudo foram produzidos fertilizantes fosfatados enriquecidos ou não com o fungo *Trichoderma harzianum*. No primeiro capítulo, diferentes concentrações do fungo foram adicionadas ao Fosfato Natural Reativo de Marrocos. No segundo capítulo, o fungo foi adicionado ao superfosfato triplo, com a presença e ausência de revestimento. A planta teste utilizada para avaliar as respostas dos fertilizantes produzidos foi o milho (*Zea mays*) cultivado em casa de vegetação. Ao fim dos experimentos, as plantas de milho foram avaliadas quanto ao seu crescimento (parte aérea e raízes) e conteúdo de P. Além disso, foram realizadas determinações de pH e da atividade de fosfatases (ácida e alcalina) no solo. O enriquecimento do fosfato natural reativo de Marrocos com *Trichoderma harzianum* proporcionou aumento no conteúdo de P e na matéria seca total das plantas em 33 e 21%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (sem adição do fungo). A adição de *Trichoderma harzianum* ao superfosfato triplo também aumentou o conteúdo de P e crescimento inicial das plantas. A matéria seca total das plantas e o seu conteúdo de P aumentaram 25 e 56%, respectivamente, no tratamento que o fertilizante foi enriquecido com *Trichoderma harzianum*, comparativamente ao tratamento controle.

Palavras-chave: Microrganismos solubilizadores de fosfato. Eficiência de adubação.  
Fosfato natural reativo. Superfosfato triplo.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Hend Pereira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2021. **Production and evaluation of phosphate fertilizers enriched with *Trichoderma harzianum*: effects on the initial growth of corn plants.** Advisor: Samuel Vasconcelos Valadares. Co-advisor: Edson Marcio Mattiello.

Phosphorus (P) is one of the most limiting nutrients for plant growth in highly weathered tropical soils. The application of phosphate fertilizers is a fundamental practice for replacing P to the soil in order to increase its availability for agricultural crops. Ongoing efforts to improve the efficiency of phosphate fertilizer use are also essential to ensure the sustainability of food, fiber, wood and energy production in these areas. A promising strategy for increasing the efficiency of phosphate fertilization is the use of phosphate solubilizing microorganisms (PSM). The PSM helps to promote plant growth and phosphorus absorption. In the present study, we aimed to produce phosphate fertilizers enriched with the fungus *Trichoderma harzianum*. In the first chapter, different concentrations of the fungus were added to rock phosphate (Moroccan phosphate rock). In the second chapter, the fungus was added to triple superphosphate with and without a previous coating with Arabic gum. Corn plants (*Zea mays*) were used in the study as test plants. The enrichment of reactive Moroccan phosphate with *Trichoderma harzianum* provided an increase in phosphorus content and total plant dry matter of 33% and 21%, respectively, compared to the control treatment (without addition of any fungus). The addition of *Trichoderma harzianum* to triple superphosphate also increased plant growth and P uptake by plants. The total plant dry matter and phosphorus content increased by 25% and 56%, respectively.

Keywords: Phosphate solubilizing microorganism. Fertilization efficiency. Reactive rock phosphate. Triple superphosphate.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	12
CAPITULO 1 .....	15
PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE FOSFATO NATURAL REATIVO ENRIQUECIDO COM <i>Trichoderma harzianum</i> : EFEITOS NO CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO .....	15
1. INTRODUÇÃO .....	18
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1 Produção e caracterização dos fertilizantes .....	19
2.2 Avaliação dos fertilizantes em casa de vegetação .....	20
2.3 Análises das plantas .....	22
2.4 Análise enzimática .....	23
2.5 Eficiência agrônômica dos fertilizantes.....	23
2.6 Análise de dados.....	23
3. RESULTADOS .....	24
4. DISCUSSÃO .....	30
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
CAPITULO 2 .....	35
PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUPERFOSFATO TRIPLO ENRIQUECIDOS COM <i>Trichoderma harzianum</i> : EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO.....	35
1. INTRODUÇÃO .....	37
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1 Produção e caracterização dos fertilizantes .....	38
2.2 Avaliação dos fertilizantes em casa de vegetação .....	39
2.3 Análise das plantas .....	41
2.3 Análise enzimática .....	41
2.4 pH em água.....	42
2.5 Análises de dados e estatística .....	42
3. RESULTADOS .....	42
3.1 Características biométricas das plantas de milho sob o efeito da adição de superfosfato triplo e <i>Trichoderma harzianum</i> .....	42
3.2 Aquisição de P pelas plantas de milho adubadas com superfosfato triplo e <i>Trichoderma harzianum</i> .....	44

3.3 Atividade enzimática e pH do solo cultivado com pelas plantas de milho adubadas com superfosfato triplo e <i>Trichoderma harzianum</i> .....	45
4. DISCUSSÃO .....	47
5. CONCLUSÃO.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

O fosforo é um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento das plantas no planeta, notadamente nas regiões tropicais, onde os solos são, em sua maioria, muito intemperizados, pobres em P e ricos em óxidos de Fe e Al, com elevada capacidade de fixação desse nutriente (RAIJ, 1991; NOVAIS e SMYTH, 1999). Portanto, nesses locais, a aplicação de fertilizantes fosfatados é fundamental para que as culturas, anuais e perenes, possam expressar seu potencial genético.

Os fertilizantes fosfatados usados na agricultura são, em sua maioria, fontes solúveis produzidas a partir da acidificação das rochas fosfáticas, recurso esse não renovável (GOEDERT e SOUSA, 1986; RAMOS et al., 2009). Devido à alta solubilidade desses fertilizantes, grande parte do P é rapidamente adsorvido na fração mineral do solo, formando compostos indisponíveis para a maioria das plantas (OLIVEIRA et al., 2014; KAPRI e TEWARI, 2010).

A utilização de boas práticas de uso de P, já bem consolidadas, a exemplo da aplicação localizada de fertilizantes fosfatados e aplicação do fertilizante no momento mais apropriado (JING et al., 2010; RESENDE et al., 2006) é essencial para melhorar a eficiência da adubação fosfatada em solos tropicais. Adicionalmente, deve ser realizado um esforço contínuo para que essas práticas sejam aprimoradas.

Os microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) podem melhorar a eficiência da fertilização fosfatada para diferentes grupos de culturas. Esses organismos são capazes de produzir carboxilatos na rizosfera das plantas (SPAGNOLETTI, 2017; GOUVEIA et al., 2019), com efeito na solubilização de formas menos lábeis de P, bem como reduzindo sua adsorção na fase sólida do solo. Os MSF podem também produzir enzimas (fosfatases) que atuam na despolimerização de formas orgânicas de P (GOUVEIA et al., 2019; SOUZA et al., 2016; KAPRI e TEWARI, 2010) e estimular o crescimento vegetal, por meio da produção de fitohormônios (ZAVALA-GONZALEZ, 2015), como as auxinas, que estimulam o crescimento radicular, contribuindo para maior exploração do solo e maior aquisição de água e nutrientes, notadamente os nutrientes menos móveis no solo, como o P (GOUVEIA et al., 2019; VASSILEVA et al., 2010; PAIVA et al., 2018).

Os fungos do gênero *Trichoderma* são reconhecidos por serem agentes de controle biológico das plantas (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009) e aumentar a produtividade de plantas de interesse agrícola (CHAGAS et al., 2017; YEDIDIA et al.,

2011; RIBAS, et al., 2016). Espécies de *Trichoderma* são capazes de produzir metabólitos capazes de promover o crescimento vegetal (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009; CHAGAS et al., 2017) e aumentar a solubilização de formas menos lábeis de P (OLIVEIRA et al., HARMAN et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a adição de *Trichoderma harzianum* em um fosfato natural aumenta a sua eficiência, comparada a seu uso isolado. E se *Trichoderma harzianum* também possui a capacidade de aumentar a eficiência de fertilizante fosfatado solúvel.

Para atingir os objetivos, foram realizados dois experimentos em casa de vegetação e os resultados são apresentados em dois capítulos:

- Capítulo 1: Produção e avaliação de fosfato natural reativo enriquecido com *Trichoderma harzianum*: efeitos no crescimento inicial de plantas de milho
- Capítulo 2: Produção e avaliação de superfosfato triplo enriquecidos com *Trichoderma harzianum*: efeitos no crescimento inicial de plantas de milho.

## 2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAGAS, L. F. B., CHAGAS JUNIOR, A. F., SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 4, n. 3, p.97–102, 2017.
- 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, n. 3, p. 1579–1592, 2009.
- GOEDERT, W.J., SOUSA, D.M.G. Avaliação preliminar de fosfato com acidulação parcial. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.10, p. 75-80, 1986.
- GOUVEIA, A. S. *et al.* Understanding How *Pochonia chlamydosporia* Increases Phosphorus Availability. **Geomicrobiologia Journal**, v.36, n. 8 , p. 747-751, 2019.
- HARMAN, G. E., PETZOLDT, R., COMIS, A., & CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 147–153, 2004.

- JING, J. *et al.* Localized application of phosphorus and ammonium improves growth of maize seedlings by stimulating root proliferation and rhizosphere acidification. **Field Crops Research**, v. 119, n. 2, p. 355–364, 2010.
- KAPRI, A., TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp.. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n. 3, 2010.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 399p, 1999.
- OLIVEIRA, G. M. *et al.* Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n.1, p. 239–249, 2014.
- PAIVA, C. A. O. *et al.* Inoculantes de microrganismos promotores de crescimento em milho: transferindo a diversidade do laboratório para o campo. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, **227**, Embrapa Milho e Sorgo, 2018.
- RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba, Potafos. 343p, 1991.
- RAMOS, S.J. *et al.* Biomass production and phosphorus use of forage grasses fertilized with two phosphorus sources. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 33, p. 335-343, 2009.
- RESENDE, Á. V. de *et al.* Resposta do milho a fontes e modos de aplicação de fósforo durante três cultivos sucessivos em solo da região do Cerrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 458–466, 2006.
- RIBAS, P. P.; RECH, R.; MATSUMURA, A. T. S.; SAND, S. T. V. D. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, p. 70-75, 2016.
- SOUZA, A. A. *et al.* *Trichoderma harzianum* produces a new thermally stable acid phosphatase, with potential for biotechnological application. **PLoS ONE**, v. 11, n.3, p. 1–18, 2016.
- SPAGNOLETTI, F.N. *et al.* Darkseptate endophytes presente different potential to solubilize calcium, iron and aluminum phosphates. **Applied Soil Ecology**, v. 111, p. 25–32, 2017.
- VASSILEVA, M. *et al.* Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 1287-1299, 2010.
- YEDIDIA, I., SRIVASTVA, A.K., KAPULNIK, Y., CHET, I.. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant Soil**, v. 235, p. 235–242, 2001.

ZAVALA-GONZALEZ, E.A. *et al.* Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. **Ann Applied Biology** 166:472–483, 2015.

## CAPITULO 1

### PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE FOSFATO NATURAL REATIVO ENRIQUECIDO COM *Trichoderma harzianum*: EFEITOS NO CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO

#### Resumo

Espécies do gênero *Trichoderma* possuem grande importância na agricultura por atuarem no controle de doenças e na promoção do crescimento vegetal por meio da produção de fitohormônios e solubilização de nutrientes indisponíveis à planta, principalmente o fósforo (P), podendo representar uma opção para aumentar a eficiência de adubação com fontes pouco solúveis de P, como os fosfatos naturais. Assim, este trabalho teve o objetivo de produzir fertilizantes contendo fosfato natural reativo (Fosfato Natural Reativo de Marrocos) enriquecido com *Trichoderma harzianum* e avaliar seus efeitos no desempenho inicial e na aquisição de P por plantas de milho. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, com cinco repetições. Os tratamentos foram distribuídos em arranjo fatorial (fatorial duplo), com um tratamento adicional. Duas doses de fosfato natural reativo de Marrocos (FNR) (0 e 150 mg/dm<sup>3</sup> de P) foram combinadas com quatro concentrações do fungo *Trichoderma harzianum* (0, 500, 1000 e 1500 unidades formadoras de colônia (UFC)). O tratamento adicional recebeu a aplicação de fonte solúvel (superfosfato triplo) na dose de 150 mg/dm<sup>3</sup> de P. As plantas foram coletadas quarenta dias após a semeadura para avaliações biométricas e nutricionais. Adicionalmente foram feitas avaliações do pH e da atividade enzimática do solo. *Trichoderma harzianum* na presença do FNR proporcionou aumento, em comparação à não inoculação, no conteúdo de P e na matéria seca total das plantas de 33 e 21% respectivamente, para dose de máxima eficiência física. Já a inoculação na ausência do FNR não proporcionou incrementos no crescimento e conteúdo de P das plantas. Houve aumento da atividade das enzimas fosfatase ácida e fosfatase alcalina e houve redução do pH do solo na presença de *Trichoderma harzianum*, indicando a maior liberação de ácidos orgânicos que contribuem para solubilização do P. Os resultados deste estudo demonstram que a adição de *Trichoderma harzianum* pode ser um importante aditivo para melhorar a eficiência agrônômica de fosfatos naturais reativos.

**Palavras chave:** Microrganismos solubilizadores de fosfato. Fosfato natural. Eficiência de adubação.

## Abstract

*Trichoderma* species have great importance in agriculture as they act in the control of phytopathogens and in the promotion of plant growth through the production of phytohormones and solvability of nutrients unavailable to the plant, mainly phosphorus. This work aimed to produce fertilizers containing Natural Reactive Phosphorus (NRP) from Morocco enriched with *Trichoderma harzianum* and to evaluate its effects on initial performance and phosphorus acquisition by corn plants. The experiment was carried out in a randomized block, with five replications. The treatments were distributed in a double factorial arrangement, with an additional treatment. Two doses of NRP (0 and 150 mg/dm<sup>3</sup> of phosphorus) were combined with four concentrations of *Trichoderma harzianum* (0, 500, 1000 and 1500 colony formation units (UFC)). The additional treatment received the application of a soluble source (triple superphosphate) at a dose of 150 mg/dm<sup>3</sup> of phosphorus. After 40 days after sowing, the plants were collected for biometric and nutritional evaluations, in addition to evaluations of pH and enzymatic activity from soil. *Trichoderma harzianum*, in the presence of NRP, provided an increase in phosphorus content and in the total plant dry matter of 33 and 21% respectively, for maximum efficiency dose. The activity of acid phosphatase and alkaline phosphatase enzymes increased and there was a reduction in soil pH in the presence of *Trichoderma harzianum*, indicating greater release of organic acids that contribute to solvability of phosphorus. On the other hand, inoculation in the absence of NRP did not increase the growth and phosphorus content of the plants. For commercial production of fertilizers, the results of this study demonstrate that the addition of *Trichoderma harzianum* can be an important adjuvant to compose a mixture with FNR.

**Key words:** Phosphate solubilizing microorganisms. Rock phosphate. Fertilization efficiency.

## 1. INTRODUÇÃO

O fósforo é um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento das plantas no mundo, notadamente nas regiões tropicais, onde os solos são, em sua maioria, muito intemperizados, pobres em P e têm elevada capacidade de fixação desse nutriente (RAIJ, 1991; NOVAIS e SMYTH, 1999). Portanto, elevadas doses de P são aplicadas no solo para atender a demanda das plantas (MENDES e REIS JUNIOR, 2003).

A adoção de boas práticas de uso de P (ex.: aplicação localizada das fontes de P; aplicação do fertilizante no momento mais adequado, de acordo com a cultura; utilização de fontes granuladas; aumento do aporte de matéria orgânica do solo) (JING et al., 2010; RESENDE et al., 2006; KANG et al., 2009) é essencial para melhorar a eficiência da adubação fosfatada em solos tropicais. Adicionalmente, deve ser realizado um esforço contínuo para que essas práticas sejam aprimoradas.

O uso de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) é uma estratégia para melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo (NARLOCH, et al., 2002; GOLDSTEIN, 1986; KIM, 1998). Os MSF apresentam capacidade de solubilizar formas pouco lábeis de P, tornando-as disponíveis para as plantas (TANDON et al., 2020; NARLOCH et al., 2002; WHITELAW, 1999). Os principais mecanismos conhecidos envolvidos na solubilização de P por MSF são a produção de ácidos orgânicos (ácido cítrico, lático, fórmico, málico, dentre outros) (GOUVEIA et al., 2019; NARLOCH et al., 2002; WHITELAW, 1999); e produção de enzimas que atuam na despolimerização de formas orgânicas de P (ex. fosfatases ácidas e alcalinas) (GOUVEIA et al., 2019; SOUZA et al., 2016; KAPRI e TEWARI, 2010).

Os MSF também podem aumentar a aquisição de P pelas plantas por meio da promoção do crescimento vegetal (ZAVALA-GONZALEZ, 2015; CONTRERAS-CORNEJO, et al., 2009; THONAR, et al., 2017). Alguns MSF podem, por exemplo, produzir reguladores de crescimento vegetal que, dentre outros efeitos benéficos, estimulam o crescimento de raízes, contribuindo para a maior aquisição de P e outros nutrientes pelas plantas (PAIVA et al., 2018; LÓPEZ-BUCIO et al., 2015; CONTRERAS-CORNEJO, et al., 2009). Estudos com MSF foram realizados em diversas culturas de interesse agrícola como soja (BONONI et al., 2020), sorgo (SABER et al., 2017), e milho (HARMAN et al., 2004; MERCL et al., 2020; EL-KATATNY e IDRES, 2014) mostrando efeitos na promoção do crescimento vegetal.

Fungos do gênero *Trichoderma* podem trazer benefícios as plantas cultivadas, ao atuar como agentes de biocontrole de doenças (SHORESH et al., 2010; THONAR et al., 2017) e como promotores de crescimento de plantas (HARMAN, 2011; HARMAN, 2004; VERGARA et al., 2019) por meio da síntese de fitohormônios (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2014; THONAR et al., 2014), e da exsudação de substâncias capazes de aumentar o acesso da planta a nutrientes, sobre tudo, o fósforo (LÓPEZ-BUCIO et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi produzir fertilizante a partir da adição de concentrações crescentes de *Trichoderma harzianum* em fosfato natural reativo e avaliar seu efeito no crescimento e aquisição de P por plantas de milho.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Produção e caracterização dos fertilizantes**

Concentrações crescentes (0, 500, 100 e 1500 unidades formadoras de colônias (UFCs)) do produto comercial a base de *Trichoderma harzianum* isolado IBLF 006 (Ecotrich®) foram adicionadas ao fertilizante fosfatado (Fosfato Natural Reativo de Marrocos). O superfosfato triplo (sem adição do *Trichoderma harzianum*) foi utilizado como tratamento controle.

A granulometria dos fertilizantes foi determinada utilizando uma peneira (abertura de 200 mesh). Os teores de P nos fertilizantes foram determinados por meio da extração em ácido nítrico (P total), ácido cítrico (Fosfato natural reativo) e citrato neutro de amônio (Superfosfato triplo) (MAPA, 2007) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Caracterização dos fertilizantes quanto aos seus teores.

Fertilizantes (1)	P <sub>Total</sub> (2)	P Solúvel (% do P <sub>Total</sub> )	
		P Ácido cítrico (3)	P CNA (4)
		-----%-----	
FNR + 0 UFC	12,4	25,0	-
FNR + 500 UFC	12,2	25,4	-
FNR + 1000 UFC	12,0	24,2	-
FNR + 1500 UFC	11,9	21,9	-
Superfosfato triplo	20,6	-	94,2

(1) FNR + 0 UFC - Fosfato natural de Marrocos; FNR + 500 UFC - Fosfato natural de Marrocos com adição de *Trichoderma harzianum* na concentração de 500 UFC; FNR + 1000 - Fosfato natural de Marrocos com adição de *Trichoderma harzianum* na concentração de 1000 UFC; FNR + 1500 UFC - Fosfato natural de Marrocos com adição de *Trichoderma harzianum* na concentração de 1500 UFC.

(2) P<sub>Total</sub> – P extraído em ácido nítrico.

(3) P<sub>Ácido cítrico</sub> – Porcentagem do P<sub>Total</sub> extraído em ácido cítrico.

(4) P<sub>CNA</sub> – Porcentagem do P<sub>Total</sub> extraído em citrato neutro de amônio.

As concentrações de *Trichoderma harzianum* utilizadas foram calculadas com base nas especificações apresentadas pelo fabricante do produto comercial utilizado no estudo. Adicionalmente, foi coletada uma amostra do produto utilizado no estudo (0,02 g) que foi plaqueada em meio semi-seletivo para *Trichoderma* (ELAD), para verificação, por meio de avaliação morfológica, das estruturas fúngicas características de espécies do gênero *Trichoderma*.

## 2.2 Avaliação dos fertilizantes em casa de vegetação

Para a avaliação dos fertilizantes foram utilizadas plantas de milho, híbrido simples BM 709 Pro, cultivadas durante quarenta dias em casa de vegetação, no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (20°45'14"S, 42°52'55"O; 650 m altitude). O trabalho foi conduzido em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial, com um tratamento adicional (2x4+1), com cinco repetições.

Os tratamentos consistiram de duas doses de fosfato natural reativo de Marrocos (FNR) (0 e 150 mg/dm<sup>3</sup> de P) combinadas com quatro concentrações de

*Trichoderma harzianum* (0, 500, 1000 e 1500 UFC). O tratamento adicional foi com a aplicação de fonte solúvel (superfosfato triplo) na dose de 150 mg/dm<sup>3</sup> de P.

As plantas foram cultivadas em vasos de 2 dm<sup>3</sup>, contendo solo retirado de horizonte subsuperficial de uma área de LATOSSOLO VERMELHO distrófico de textura argilosa (Tabela 2).

**Tabela 2:** Caracterização química e física do solo utilizado para o cultivo das plantas de milho.

pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al <sup>3+</sup>	CTC	Arg	MOS
H <sub>2</sub> O	--- mg dm <sup>-3</sup>	--		----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	-----		pH 7,0	%	g kg <sup>-1</sup>
4,73	1,4	11,0	0,29	0,12	0,59	2,60	3,04	47,3	0,66

pH em água (1:2,5); P, Na, K: extrator Mehlich-1; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>: extrator KCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>); H+Al: extrator de acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>; CTC pH 7,0: capacidade de troca catiônica a pH 7,0= soma de bases + (H+Al); Arg%= conteúdo de argila - Embrapa (1997), adaptado de Ruiz (2005); MOS: matéria orgânica do solo.

O solo usado para o preenchimento dos vasos recebeu uma mistura de carbonato de Cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e carbonato de Magnésio (MgCO<sub>3</sub>) em uma relação molar de 3:1 com para elevar a saturação por bases a 70%. O solo permaneceu incubado por 15 dias, após o período de incubação o solo atingiu o pH de 6,5. O P foi aplicado na semeadura (0 ou 150 mg dm<sup>3</sup> de P) e os demais nutrientes aplicados em cinco parcelamentos: 0, 7, 14, 21 e 28 dias após o semeio (Tabela 3).

**Tabela 3:** Nutrientes e quantidades totais aplicadas por fertirrigação, conforme recomendações de Novais et al., (1991).

Nutriente	N	K	S	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
Dose (mg kg <sup>-1</sup> )	100,00	150,00	40,00	0,81	1,33	1,55	3,66	0,15	4,00

Foram semeadas dez sementes em cada vaso e o número de plantas foi reduzido a seis após cinco dias depois da emergência das plantas. Durante o experimento, as plantas foram irrigadas diariamente com água desmineralizada.

Quarenta dias após o semeio a parte aérea foi coletada, e levada a estufa de circulação forçada de ar na temperatura 60 °C até atingir peso constante. Em seguida, o material foi pesado para a determinação da matéria seca da parte aérea (MSPA). As raízes foram separadas do solo, lavadas em água corrente, secas em estufa de circulação forçada na temperatura de 60 °C, pesadas para determinação da matéria seca da raiz (MSR). Em cada unidade experimental foi coletada uma amostra da raiz (aproximadamente 30%) e acondicionada em frascos contendo álcool 30% para conservação. Foram retiradas amostras de solo da camada de 0-10 cm, utilizando uma sonda de metal com diâmetro de 3 centímetros. As amostras foram transportadas e mantidas em refrigeração de 4 °C até a realização das análises enzimáticas.

### 2.3 Análises das plantas

As raízes foram dispostas em uma cuba acrílica de 30 cm x 40 cm de comprimento, contendo 1000 mL de água destilada e em seguida foram colocadas sobre o Scanner EPSON® LA2400.

O comprimento da raiz (CR), área projetada da raiz (APR), superfície total da raiz (STR) e quantidade de raízes finas (<0,5 mm) (RF) foram avaliados por meio do sistema de análise de imagens WinRHIZO PRO 2009 (Regent Instruments, model: WinRHIZO Pro 2009, Québec, Canada).

Em seguida, as raízes foram secas em estufa de circulação forçada de ar, à 60°C, até peso atingir constante. Foi calculada a matéria seca total (MST) através da soma da MSPA e MSR. Os materiais vegetais secos foram moídos e digeridos com solução nitroperclórica (4:1). O teor de P foi determinado usando um ICP-OES (710 ICP-OES, Agilent Technologies, Califórnia, EUA).

Foram calculados os valores de eficiência de utilização do P - EUP (SIDDIQUI & GLASS, 1981) e eficiência de recuperação do P- ER conforme a equações 1 e 2.

$$EUP = (MST)^2 / C-T \text{ (g}^2\text{mg}^{-1}\text{)} \quad \text{Eq. 1}$$

$$ER = (C-T - C-T \text{ 0P}) / D-P_{\text{SOLO}} \times 100(\%) \quad \text{Eq. 2}$$

Em que: o MST é a matéria seca total; C-T é o conteúdo total de P na planta; C-T 0P é o conteúdo de P nas plantas do tratamento sem a adição de P e D-P<sub>SOLO</sub> é dose de P adicionada ao solo.

#### 2.4 Análise enzimática

As atividades das enzimas fosfatase ácida (AFACI) e fosfatase alcalina (AFACA) foram determinadas em espectrofotômetro por meio da reação colorimétrica do p-nitrofenol liberado pelas enzimas após a incubação de 1 g de solo a 37°C por 1 hora, na presença do substrato: p-nitrofenolfosfato (0,025 mol L<sup>-1</sup>) em solução tampão pH (6,5 e 11,0) respectivamente para AFACI e AFACA (TABATABAI 1994).

#### 2.5 Eficiência agronômica dos fertilizantes

O índice de eficiência agronômica dos fertilizantes (IEA) foi calculada utilizando a equação 3, descrita por BARNES e KAMPRATH (1975).

$$IEA = (MSPA - MSPA_{CONT}) / (MSPA_{ST} - MSPA_{CONT}) \times 100(\%) \quad \text{Eq. 3}$$

Em que o MSPA é a matéria seca da parte aérea; MSPA<sub>CONT</sub> é a matéria seca da parte aérea do tratamento controle e MSPA<sub>ST</sub> é a matéria seca da parte aérea do tratamento com o ST.

#### 2.6 Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância ( $P < 0,05$ ). Para avaliação das premissas da ANOVA foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett. As respostas das plantas às concentrações de *Trichoderma harzianum* foram avaliadas por meio da análise de regressão. Os tratamentos com e sem FNR foram comparados ao tratamento adicional (ST) pelo teste de Dunnett, ao nível de 5% de probabilidade. O software R (R Development Core Team, 2010) foi usado para todas análises.

### 3. RESULTADOS

Houve efeito positivo do fosfato natural (FNR 150) no crescimento e conteúdo de P nas plantas (Figura 1A e 1B). Já a maior atividade das enzimas fosfatase ácida (AFACI) e fosfatase alcalina (AFACA) foi obtida nos tratamentos com ausência do fosfato natural (FNR 0) (Figuras 1C e 1D).

De forma geral, a presença de *Trichoderma harzianum*, na presença ou ausência de fosfato natural, proporcionou incremento no conteúdo de P na planta, eficiência de uso de P (Tabela 5), a atividade enzimática e no índice de eficiência agrônômica (Figura 1). O mesmo resultado foi constatado para o do crescimento de plantas de milho (Tabela 4). A matéria seca da raiz e a eficiência de recuperação de P aumentaram linearmente com a adição do *Trichoderma harzianum* (Tabela 4 e 5). Já os valores de pH em água reduziram com o aumento das concentrações de *Trichoderma harzianum*. Esses efeitos foram mais pronunciados quando o fungo foi aplicado junto ao fosfato natural (FNR 150) (Figura 1F).

**Tabela 4-** Equações de regressão referentes a matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), relação raiz/parte aérea (MSR/MSPA), comprimento da raiz (CR), área projetada da raiz (APR), raízes finas (RF), em resposta a inoculação de concentrações crescentes de *Trichoderma harzianum* (0, 500, 1000 e 1500 UFC) na ausência (0 mg/dm<sup>3</sup> de P) e presença (150 mg/dm<sup>3</sup> de P) de fosfato natural de Marrocos.

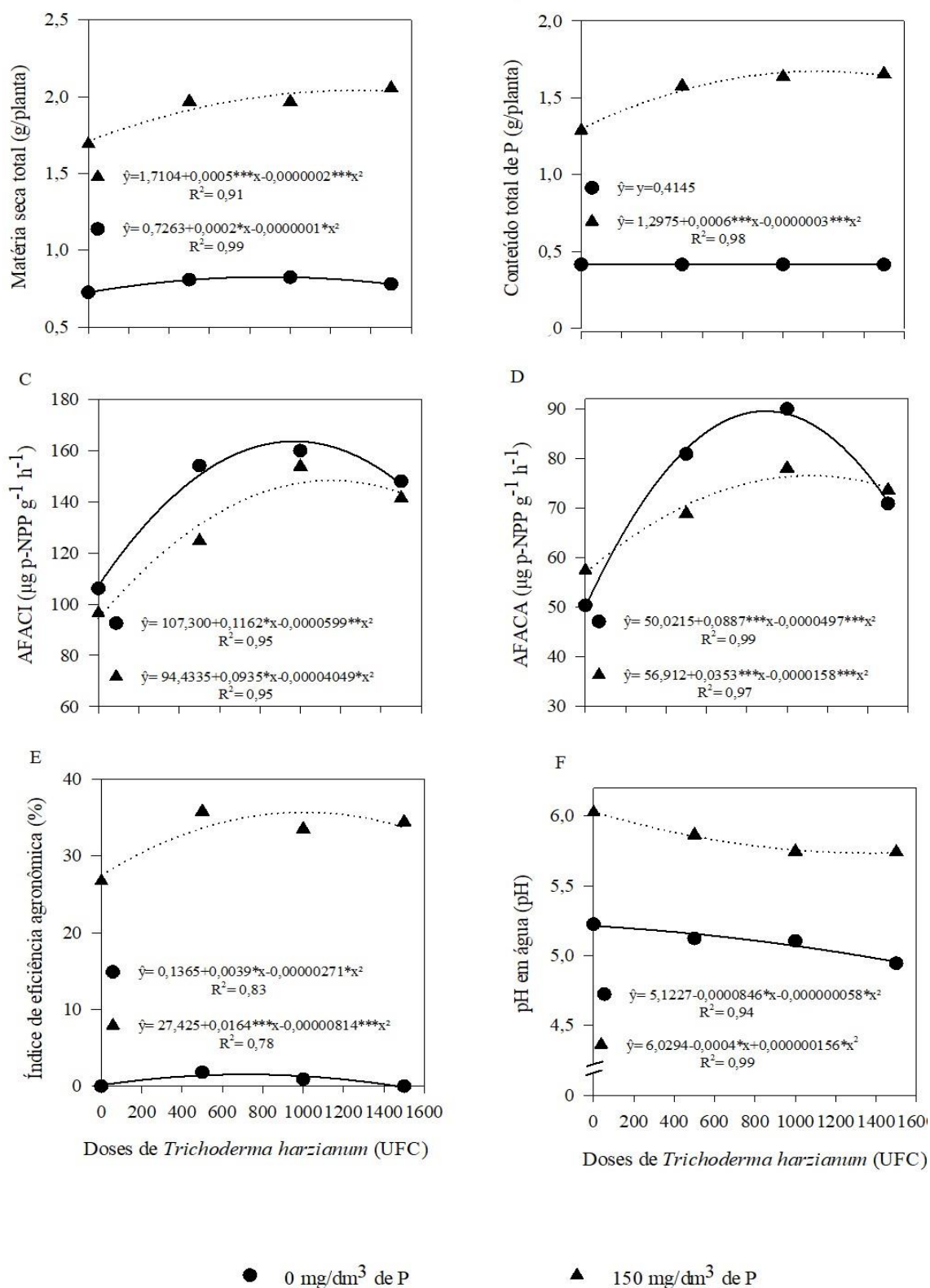
Doses	Variáveis	Equações	R <sup>2</sup>
0 mg/dm <sup>3</sup> de P	MSPA (g/planta)	$\hat{y} = 0,3490 + 0,0001^*x - 0,00000006^{**}x^2$	0,89
	MSR (g/planta)	$\hat{y} = 0,3762 + 0,0001^{**}x - 0,00000006^{***}x^2$	0,97
	MSR/MSPA (g/planta)	$\hat{y} = 1,0630 + 0,0001^{**}x$	0,82
	CR (cm)	$\hat{y} = \bar{y} = 4898,56$	
	APR (cm <sup>2</sup> )	$\hat{y} = \bar{y} = 167,64$	
	RF (cm)	$\hat{y} = \bar{y} = 814,33$	0,84
150 mg/dm <sup>3</sup> de P	MSPA (g/planta)	$\hat{y} = 0,9524 + 0,0004^{***}x - 0,0000002^{***}x^2$	0,83
	MSR (g/planta)	$\hat{y} = 0,7597 + 0,0001^{**}x$	0,98
	MSR/MSPA (g/planta)	$\hat{y} = 0,7951 + 0,0001^{***}x - 0,0000001^{***}x^2$	0,87
	CR (cm)	$\hat{y} = 6840,7767 + 5,6587^*x - 0,0028^{**}x^2$	0,99
	APR (cm <sup>2</sup> )	$\hat{y} = 231,0599 + 0,1829^*x - 0,00009^{**}x^2$	0,99
	RF (cm)	$\hat{y} = 1,4899 + 1,0785^*x - 0,0005^{**}x^2$	0,99

\* Significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,01$ ), \*\* significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,05$ ) e \*\*\* significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,1$ ).

**Tabela 5-** Equações de regressão referentes ao conteúdo de P da parte aérea (C-PA), conteúdo de P da raiz (C-R), eficiência de uso de P (EUP) e eficiência de recuperação de P (ER) em resposta a inoculação de concentrações crescentes de *Trichoderma harzianum* (0, 500, 1000 e 1500 UFC) na ausência (0 mg/dm<sup>3</sup> de P) e presença (150 mg/dm<sup>3</sup> de P) de fosfato natural de Marrocos.

Doses	Variáveis	Equações	R <sup>2</sup>
0 mg/dm <sup>3</sup> de P	C-PA (g/planta)	$\hat{y} = 0,2340 + 0,00006^{***}x - 0,00000005^{***}x^2$	0,88
	C-RA (g/planta)	$\hat{y} = \bar{y} = 0,1747$	
	EUP (g <sup>2</sup> /mg P <sup>-1</sup> )	$\hat{y} = \bar{y} = 1,48$	0,82
	ER (%)	$\hat{y} = \bar{y} = 0,08$	0,97
150 mg/dm <sup>3</sup> de P	C-PA (g/planta)	$\hat{y} = 0,8847 + 0,0004^{***}x - 0,0000002^{***}x^2$	0,89
	C-RA (g/planta)	$\hat{y} = 0,4127 + 0,0002^{**}x - 0,00000009^{***}x^2$	0,98
	EUP (g <sup>2</sup> /mg P <sup>-1</sup> )	$\hat{y} = 2,2395 + 0,0002^{***}x - 0,00000003^{***}x^2$	0,69
	ER (%)	$\hat{y} = 1,033 + 0,0012^{***}x$	0,79

\* Significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,01$ ), \*\* significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,05$ ) e \*\*\* significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,1$ ).



**Figura 1:** Efeito da inoculação concentrações crescentes de *Trichoderma harzianum* na matéria seca total (A); conteúdo total de P (B); atividade da fosfatase ácida (C); atividade da fosfatase alcalina (D); índice de eficiência agrônômica (E) e pH em água (F) de plantas de milho em resposta a inoculação crescente de *Trichoderma harzianum* 0, 500, 1000 e 1500 UFC na ausência (0 mg/dm<sup>3</sup> de P) e na presença (150 mg/dm<sup>3</sup>) de fosfato natural de Marrocos.

\* Significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,01$ ), \*\* significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,05$ ) e \*\*\* significativo pelo teste  $t$  ( $P=0,1$ ).

Para a MST, a dose de máxima eficiência física (MEF), calculada a partir das equações de regressão, foi de 1250 UFC para os tratamentos com fosfato natural reativo (FNR 150). Para a dose associada à MEF, houve incremento de 21% no crescimento das plantas em relação ao tratamento controle. Para as plantas que não receberam FNR, a dose associada à MEF foi de 1000 UFC para os tratamentos sem fosfato natural reativo (FNR 0).

A aplicação conjunta de *Trichoderma harzianum* e fosfato natural reativo de Marrocos, não resultou em diferenças significativas para as variáveis CR, APR, STR e RF quando comparados ao tratamento adicional com superfosfato triplo (ST). Também não foram observadas diferenças significativas na comparação dos tratamentos com o tratamento adicional quanto à eficiência de uso de P (Tabela 6).

Nos tratamentos onde houve a adição de *Trichoderma harzianum*, para ambas as doses de FNR (FNR 0 e FNR 150), a atividade das fosfatases ácida e alcalina (AFACI e AFACA) foram superiores a tratamento adicional.

Para o pH, não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento adicional e a dose de FNR 0, independente da adição de *Trichoderma harzianum*. Já para a dose FNR 150, os valores de pH foram superiores ao tratamento adicional, independente da adição de *Trichoderma harzianum*, como demonstrado na (Tabela 6).

**Tabela 6:** Médias da matéria seca total (MST), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), relação raiz/parte aérea (MSR/MAPA), comprimento da raiz (CR), área projetada da raiz (APR), raízes finas, <0,5 mm, (RF); do estado nutricional: conteúdo de P da parte aérea (C-PA), conteúdo de P da raiz (C-R), conteúdo de P total (C-T); e atividade das enzimas fosfatase ácida (AFACI) e fosfatase alcalina (AFACA), índice de eficiência agronômica (IEA), índice de eficiência de uso do P (EUP) e pH em água (pH) das plantas de milho em resposta a inoculação a inoculação crescente de *Trichoderma harzianum* 0, 500, 1000 e 1500 UFC na ausência (0 mg/dm<sup>3</sup> de P) e presença (150 mg/dm<sup>3</sup>) de fosfato natural de Marrocos comparadas ao tratamento com superfosfato triplo (150 mg/dm<sup>3</sup>).

Variável	150 mg/dm <sup>3</sup> de P					0 mg/dm <sup>3</sup> de P			
	ST	0 UFC	500 UFC	1000 UFC	1500 UFC	0 UFC	500 UFC	1000 UFC	1500 UFC
MST (g/planta)	3,83	1,69*	1,97*	2,01*	2,05*	0,73*	0,81*	0,82*	0,78*
MSPA (g/planta)	2,56	0,94*	1,14*	1,09*	1,11*	0,35*	0,39*	0,37*	0,35*
MSRA (g/planta)	1,27	0,76*	0,83*	0,87*	0,94*	0,38*	0,42*	0,45*	0,43*
MSR/MSPA (g/planta)	0,50	0,81*	0,73*	0,80*	0,86*	1,09*	1,07*	1,21*	1,26*
CR (cm)	10017,26	6818,71*	9031,67 <sup>ns</sup>	9614,70 <sup>ns</sup>	9009,05 <sup>ns</sup>	5143,46*	717,59*	5171,49*	4561,70*
APR (cm <sup>2</sup> )	349,26	229,86*	303,51 <sup>ns</sup>	319,92 <sup>ns</sup>	303,15 <sup>ns</sup>	174,91*	164,33*	183,02*	148,28*
RF (cm)	1798,64	1125,84*	1546,51 <sup>ns</sup>	1758,45 <sup>ns</sup>	1641,18 <sup>ns</sup>	918,49*	823,65*	908,02*	606,75*
C-PA (g/planta)	4,46	0,87*	1,08*	1,19*	1,09*	0,24*	0,25*	0,26*	0,22*
C-RA (g/planta)	1,58	0,42*	0,52*	0,57*	0,57*	0,16*	0,21*	0,15*	0,18*
C-T (g/planta)	6,04	1,29*	1,60*	1,73*	1,66*	0,40*	0,46*	0,41*	0,40*
AFACI (µg p-NPP g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	94,91	96,55 <sup>ns</sup>	124,69*	153,75*	141,40*	117,81 <sup>ns</sup>	154,04*	159,93*	147,96*

continua

pH	5,07	6,03*	5,86*	5,75*	5,74*	5,22 <sup>ns</sup>	5,12 <sup>ns</sup>	5,10 <sup>ns</sup>	4,94 <sup>ns</sup>
IEA (%)	100,00	26,70*	35,75*	33,48*	34,39*	0,00*	1,81*	0,90*	0,00*
EUP (g <sup>2</sup> /mg P <sup>-1</sup> )	2,43	2,21 <sup>ns</sup>	2,43 <sup>ns</sup>	2,34 <sup>ns</sup>	2,53 <sup>ns</sup>	1,33*	1,43*	1,64*	1,52*
ER (%)	7.24	1,17*	1,70*	1,65*	3,15*	0,01*	0,02*	0,06*	0,22*

\*Difere do tratamento adicional (ST) pelo teste de Dunnett a 5%.

<sup>ns</sup>: Não difere do tratamento adicional (ST) pelo teste de Dunnett a 5%.

#### 4. DISCUSSÃO

A utilização do FNR com *Trichoderma harzianum* favoreceu a aquisição de P e o crescimento inicial de plantas de milho, melhorando a eficiência agrônômica do fertilizante.

A maior solubilização do FNR em função da liberação gradativa de ácidos orgânicos pelo fungo aplicado junto ao fertilizante provavelmente influenciou no maior crescimento e aquisição de fósforo pelas plantas de milho. Os ácidos orgânicos estão diretamente relacionados à solubilização de formas menos disponíveis de P (WHITELAW, 1999; KAPRI e TEWARI, 2010; CHAGAS et al., 2017). A redução do pH do solo após a aplicação conjunta do fosfato natural e do fungo indica que ocorre alterações químicas no solo. Adicionalmente, a maior atividade de fosfatases também está associada a solubilização de formas orgânicas de P no solo, por estas enzimas catalisarem a hidrólise de formas orgânicas de P (SOUZA et al., 2016; KAPRI e TEWARI, 2010).

Os maiores efeitos da aplicação do fungo no crescimento das plantas foram observados nas raízes, principalmente nas raízes finas (Tabelas 4 e 6), o que favorece a aquisição de nutrientes pelas plantas, notadamente os menos móveis no solo, como o P. Resultados semelhantes foram obtidos por Harman et al., (2004) que observaram que plantas de milho inoculadas com *Trichoderma harzianum* apresentam incrementos no crescimento de raízes finas de até 100% nos primeiros 10 dias após a semeadura no campo.

O maior desenvolvimento das raízes nas plantas inoculadas com *Trichoderma harzianum* pode ser resultante, dentre outros efeitos, da liberação de reguladores de crescimento vegetal (ex.: auxina) nas rizosfera das plantas, bem como do aumento da disponibilidade de P (principalmente) e outros nutrientes em decorrência da solubilização de formas menos lábeis/trocáveis desses elementos no solo (THONAR et al., 2017; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009; HARMAN et al., 2004; LUCON, 2019).

O efeito positivo da aplicação de *Trichoderma* no crescimento de radicular das plantas, também foi observado em plantas de *Arabidopsis* (Cornejo et al., 2009) e sorgo (Saber et al., 2017) e esses mesmos autores atribuíram o maior crescimento radicular das plantas à produção de reguladores de crescimento vegetal pelo fungo estudado.

O maior crescimento das raízes finas das plantas que se associam com *Trichoderma harzianum* pode também estar associado à acidificação rizosférica. A acidificação do meio inibe o crescimento da raiz primária, e, em resposta, há estímulo da produção de raízes laterais (KAPRI e TEWARI, 2010; CHAGAS et al., 2017; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2014). A aplicação da concentração 1250 UFC (FNR 150), concentração com a qual foi obtida o rendimento máximo da MST, resultou decréscimo pH em 5% e com a aplicação da concentração de 1000 UFC (FNR 0) um decréscimo de 4%. Resultados semelhantes foram observados por Ribas et al., (2016) em ensaio *in vitro*, onde isolados de *Trichoderma* spp. demonstraram potencial em reduzir pH do meio.

A adição de *Trichoderma harzianum* ao FNR, além de melhorar a aquisição de P pelas plantas, melhorou a eficiência de utilização do P absorvido (EUP). Embora uma maior aquisição de P esteja, via de regra, associada à redução nos valores de EUP, isso não foi observado nesse estudo. Esses resultados, indicam que a maior eficiência agrônômica, indicada pelos valores de IEA obtida no FNR adicionado de *Trichoderma harzianum* comparativamente ao fertilizante sem a adição de *Trichoderma*, deve-se não somente à maior aquisição de P pelas plantas, mas também à otimização do uso do P absorvido pelas plantas.

Os resultados deste trabalho demonstram que o enriquecimento de FNR com *Trichoderma harzianum* melhora substancialmente o efeito desse tipo de fonte de P. Essa tecnologia, de fácil aplicação, tem grande potencial, após avaliação em campo, para aplicação em sistemas de produção onde essa fonte de P é utilizada.

## **5. CONCLUSÃO**

O enriquecimento de fosfato natural reativo de Marrocos com o fungo *Trichoderma harzianum* melhora a aquisição de P e favorece o crescimento inicial de plantas de milho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARNES, J.S.; KAMPRATH, E.J. Availability of North Carolina rock phosphate applied to soils. Raleigh: North Carolina State University. **Agricultural Experiment Station**. Technical bulletin, 229, P. 23, 1975.
- BONONI, L. *et al.* Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, v. 10, n.1, p. 1–13, 2020.
- CHAGAS, L. F. B., CHAGAS JUNIOR, A. F., SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 4, n. 3, p.97–102, 2017.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., ALFARO-CUEVAS, R.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma* spp. Improve growth of arabidopsis seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na<sup>+</sup> elimination through root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 6, p. 503–514, 2014.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A., MACÍAS-RODRÍGUEZ, L., CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. (2009). *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, n. 3, 1579–1592, 2009.
- EL-KATATNY, M. H., & IDRES, M. M. Effects of Single and Combined Inoculations with *Azospirillum brasilense* and *Trichoderma harzianum* on Seedling Growth or Yield Parameters of Wheat (*Triticum vulgare* L., Giza 168) and Corn (*Zea mays* L., Hybrid 310). **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, n.12, p. 1913–1936, 2014.
- GOLDSTEIN, A.H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **Am. Journal Alternative Agriculture**, v. 1, p. 51-57, 1986.
- GOUVEIA, A. S. *et al.* (2019) Understanding How Pochonia chlamydosporia Increases Phosphorus Availability. **Geomicrobiologia Journal**, v. 36, n. 8 , p. 747-751, 2019.
- HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: New tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, v. 3, p. 647–649, 2011.
- HARMAN, G. E., PETZOLDT, R., COMIS, A., & CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 147–153, 2004.
- JING, J. *et al.* Localized application of phosphorus and ammonium improves growth of maize seedlings by stimulating root proliferation and rhizosphere acidification. **Field Crops Research**, v. 119, n. 2, p. 355–364, 2010.

- KANG, J.; HESTERBERG, D.; OSMOND, D. L. Soil Organic Matter Effects on Phosphorus Sorption: A Path Analysis. **Soil Science Society of America Journal**, v. 73, n. 2, p. 360–366, 2009.
- KAPRI, A.; TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, 2010.
- KIM, K. Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, p. 79-87, 1998.
- LÓPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. Current Opinion in **Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 280–287, 2003.
- LUCON, C. M. M.. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. **Instituto Biológico/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal**, 2009.
- Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de defesa Agropecuária. – Brasília: MAPA 2017, P. 240.
- MENDES, I. C.; REIS JÚNIOR, F. B. Micro-organismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. **Embrapa**, 2003.
- MERCL, F. *et al.* Improved phosphorus fertilisation efficiency of wood ash by fungal strains *Penicillium* sp. PK112 and *Trichoderma harzianum* OMG08 on acidic soil. **Applied Soil Ecology**, v. 147, 2020.
- NARLOCH, C.; OLIVEIRA; V.L.; ANJOS, J.T.; SILVA FILHO, G.N. Respostas da cultura do rabanete à inoculação com fungos solubilizador res de fosfatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p.841-845, 2002.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 399, 1999.
- PAIVA, C. A. O. et al. Inoculantes de microrganismos promotores de crescimento em milho: transferindo a diversidade do laboratório para o campo. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 227, Embrapa Milho e Sorgo, 2018.
- RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. Potafos. 343, 1991.

- RESENDE, Á. V. *et al.* Resposta do milho a fontes e modos de aplicação de fósforo durante três cultivos sucessivos em solo da região do Cerrado. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 458–466, 2006.
- SABER, W. I. A.; GHONEEM, K. M.; RASHAD, Y. M.; AL-ASKAR, A. A. *Trichoderma harzianum* WKY1: an indole acetic acid producer for growth improvement and anthracnose disease control in sorghum. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 5, p. 654–676, 2017
- SHORESH, M.; HARMAN; G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 21–43, 2010.
- SOUZA, A. A. *et al.* *Trichoderma harzianum* produces a new thermally stable acid phosphatase, with potential for biotechnological application. **PLoS ONE**, v. 11, n.3, p. 1–18, 2016.
- TABATABAI, M.A. **Soil enzymes**. In: WEAVER, R.W. *et al.*, eds. Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties, Madison, Soil Science Society of America, 1994. v.5. p.775-833.
- TANDON, A. *et al.* Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. **Journal of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 791–798, 2020.
- THONAR, C. *et al.* Potential of three microbial bio-effectors to promote maize growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2017.
- VERGARA, C. *et al.* Plant-mycorrhizal fungi interaction and response to inoculation with different growth-promoting fungi. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 54, 2019.
- WHITELAW, M. A. Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69(C), p. 99–151, 1999.
- ZAVALA-GONZALEZ, E.A. *et al.* Some isolates of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* promote root growth and reduce flowering time of tomato. *Annual Applied Biology*, v. 166, p. 472–483, 2015.

## CAPITULO 2

### PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE SUPERFOSFATO TRIPLO ENRIQUECIDOS COM *Trichoderma harzianum*: EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE MILHO

#### Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do enriquecimento de superfosfato triplo com *Trichoderma harzianum* na aquisição de fósforo (P) e crescimento inicial de plantas de milho. Para isso, foi instalado um experimento em casa de vegetação durante vinte e cinco dias utilizando quatro tratamentos: fertilização com superfosfato triplo (ST); superfosfato triplo revestido com goma arábica (ST+GM); superfosfato triplo com adição de *Trichoderma harzianum* (ST+Th); superfosfato triplo revestido com goma arábica e adição de *Trichoderma harzianum* (ST+GM+Th). Ao final do experimento foram determinadas a massa da matéria seca total das plantas; área projetada pela raiz; comprimento da raiz e raízes finas (<0,5 mm). Também foram avaliados conteúdo de P no tecido vegetal, atividade das fosfatases ácida e alcalina e pH do solo. Houve aumento de 56% no conteúdo total de P na planta nos tratamentos com *Trichoderma harzianum*. A adição do fungo também aumentou o crescimento inicial das plantas de milho. Nos tratamentos com superfosfato triplo com adição de *Trichoderma harzianum* (ST+Th) houve incremento da matéria seca total e do comprimento da raiz das plantas (25 e 21%, respectivamente), em relação ao tratamento controle, sem o fungo. O uso da goma arábica não afetou o crescimento e aquisição de P pelas plantas de milho, na presença ou ausência do *Trichoderma harzianum*. O enriquecido do superfosfato triplo com apenas o *Trichoderma harzianum* sem revestimento, foi o tratamento que apresentou os melhores resultados.

Palavras-chave: Microrganismos solubilizadores de fosfato. Uso eficiente do fósforo. Fertilizantes fosfatados.

## CHAPTER 2

### PRODUCTION AND EVALUATION OF TRIPLE SUPERPHOSPHATE ENRICHED WITH *Trichoderma harzianum*: EFFECTS ON THE INITIAL GROWTH OF CORN PLANTS

#### Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of triple superphosphate enrichment with *Trichoderma harzianum* on phosphate (P) acquisition and initial growth of maize plants. For this, an experiment was installed in a greenhouse for twenty-five days using four treatments: fertilization with triple superphosphate (TS); gum arabic coated triple superphosphate (TS+GM); triple superphosphate with addition of *Trichoderma harzianum* (TS+Th); triple superphosphate coated with gum arabic and addition of *Trichoderma harzianum* (TS+GM+Th). At the end of the experiment, the total dry matter mass of the plants was determined; root projected area; root length and fine roots (<0.5 mm). The P content in plant tissue, acid and alkaline phosphatase activities and soil pH were also evaluated. There was an increase of up to 56% in the total P content in the plant in treatments with *Trichoderma harzianum*. The addition of the fungus also increased the initial growth of corn plants. In the treatments with *Trichoderma harzianum* and triple superphosphate (TS+Th), there was an increase in the total dry matter and root length of the plants (25 and 21%, respectively) compared to the control treatment, without the fungus. The use of gum arabic to coat the fertilizer, in the presence or absence of *Trichoderma harzianum*, showed similar results to its non-use for most of the analyzed variables. The triple superphosphate enriched with *Trichoderma harzianum* without coating showed superior results compared to the other treatments.

**Key words:** Phosphate solubilizing microorganisms. Phosphorus use efficiency. Phosphorus fertilizers.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfatos no solo tem sido apontada como alternativa para aumentar a eficiência de uso de fertilizantes fosfatados em diferentes sistemas de produção de alimentos, fibras, energia e madeira (NARLOCH et al., 2002; BONINI et al., 2020; SHANKARAIAH et al., 2000). Diversos microrganismos do solo possuem a capacidade de promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios e solubilização de formas menos disponíveis de P e outros nutrientes (GOUVEIA et al., 2019; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009; WHITELAW, 1999).

Os fungos da espécie *Trichoderma harzianum* são reconhecidos por serem agentes de controle de pragas e doenças de plantas (SHORESH et al., 2010; THONAR et al., 2017) e aumentar a produtividade de plantas de interesse agrícola (CHAGAS et al., 2017; YEDIDIA et al., 2001; RIBAS et al., 2016). Esses efeitos são decorrentes da capacidade do fungo sintetizar substâncias promotoras de crescimento vegetal (OLIVEIRA et al., 2014; CHAGAS et al., 2017; CONTRERAS-CORNEJO et al., 2014) e solubilizar formas menos lábeis de P (HARMAN et al., 2004; NARLOCH et al., 2002; GOLDSTEIN et al., 1986).

A eficiência da inoculação pode ser obtida com o uso de produtos adesivos, como a goma arábica, que permitem aumentar a fixação do inoculo e a proteção do microrganismo durante o armazenamento e sobrevivência no solo até surgimento de raízes (SAHU e BRAHMAPRAKASH, 2016). A goma arábica foi utilizada como meio de revestimento em sementes de soja por Salema et al. (1982) e Smith, (1995) conferindo maior adesão e maior sobrevivência do *Rizhobium*. Também foi utilizada em feijão por MERCANTE et al., (1992), durante o processo de inoculação das sementes, a fim de melhorar a fixação do inoculo. Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram a aplicação de revestimentos para melhorar a aderência dos microrganismos promotores do crescimento aos grânulos de fertilizantes solúveis.

As hipóteses desse trabalho são que o enriquecimento de um fertilizante fosfatado solúvel com um microrganismo promotor de crescimento vegetal pode aumentar a aquisição de P e o crescimento inicial do milho, e que o revestimento dos grânulos com goma arábica pode potencializar os efeitos benéficos da inoculação.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento inicial do milho ao adicionar *Trichoderma harzianum* (microrganismo solubilizador de fosfato e promotor

de crescimento vegetal) com e sem a presença de revestimento (goma arábica) em um fertilizante fosfatado solúvel (superfosfato triplo).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Produção e caracterização dos fertilizantes**

Os fertilizantes foram preparados a partir do recobrimento do superfosfato triplo pelo produto comercial a base de *Trichoderma harzianum* isolado IBLFA 006 (Ecotrich®). Para isso foi utilizado um prato granulador. O recobrimento do superfosfato triplo ocorreu pelo movimento de rotação do prato granulador, onde os grânulos foram envolvidos por um filme superficial de água ou solução de goma arábica (20%), de acordo com cada tratamento: superfosfato triplo (ST) e superfosfato triplo + goma arábica (ST+GM) respectivamente. Para os tratamentos superfosfato triplo + *Trichoderma harzianum* (ST+Th) e superfosfato triplo + goma arábica + *Trichoderma harzianum* (ST+GM+Th), foram adicionados *Trichoderma harzianum* na concentração de 1500 UFC, sendo que o último recebeu a adição de goma arábica (20%). Ao fim do processo os grânulos dos fertilizantes foram secos ao ar por 24 horas. Em cada fertilizante produzido, foram retiradas amostras para determinação do teor de P extraído pelo método do ácido nítrico e P solúvel em citrato neutro de amônio (MAPA, 2007) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Caracterização dos fertilizantes quanto aos teores de P.

Fertilizantes <sup>(1)</sup>	P <sub>Total</sub> <sup>(2)</sup>	P Solúvel (% do P <sub>Total</sub> )
		P <sub>CNA</sub> <sup>(3)</sup>
		-----%-----
ST	19,88	95,0
ST + GM	19,36	-
ST + Th	19,39	-
ST + GM + Th	19,46	-

<sup>(1)</sup> ST – Superfosfato triplo; ST + GM – Superfosfato triplo com adição de goma arábica (20%); ST + Th -Superfosfato triplo com adição de *Trichoderma harzianum*; ST + GM + Th – Superfosfato triplo, fosfato natural de Marrocos com adição de goma arábica e *Trichoderma harzianum*.

<sup>(2)</sup> P total – P extraído em ácido nítrico.

<sup>(3)</sup> P<sub>CNA</sub> – Porcentagem do P<sub>Total</sub> extraído em citrato neutro de amônio.

A concentração de *Trichoderma harzianum* foi calculada com base no rótulo do produto comercial utilizado no estudo. Adicionalmente, foi coletada uma amostra do produto utilizado (0,02 g) que foi plaqueada em meio semi-seletivo para *Trichoderma* (ELAD), para verificação, por meio de avaliação morfológica, das estruturas fúngicas características de fungos do gênero *Trichoderma spp.*

## 2.2 Avaliação dos fertilizantes em casa de vegetação

O estudo foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (20°45'14"S, 42°52'55"O; 650m altitude). Foram utilizadas plantas de milho, híbrido BM 709 Pro, cultivadas durante vinte e cinco dias. O trabalho foi conduzido em um delineamento de blocos casualizados com quatro tratamentos: ST, ST+GM, ST+Th e ST+GM+Th, e cinco repetições.

As plantas foram cultivadas em vasos de 2 dm<sup>3</sup>, contendo solo retirado de horizonte subsuperficial de uma área de LATOSSOLO VERMELHO distrófico de textura argilosa, em que as propriedades químicas e físicas das amostras de solo são caracterizadas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Caracterização química e física do solo utilizado para o cultivo das plantas de milho.

pH	P	K	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H+Al <sup>3+</sup>	CTC	Arg	MOS
H <sub>2</sub> O	--- mg dm <sup>-3</sup> --			----- cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			pH 7,0	%	g kg <sup>-1</sup>
	-								1
4,73	1,4	11,0	0,29	0,12	0,59	2,60	3,04	47,3	0,66

pH em água (1:2,5); P, Na, K: extrator Mehlich-1; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Al<sup>3+</sup>: extrator KCl (1,0 mol L<sup>-1</sup>); H+Al: extrator de acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>; CTC pH 7,0: capacidade de troca catiônica a pH 7,0= soma de bases + (H+Al); Arg%= conteúdo de argila - Embrapa (1997), adaptado de Ruiz (2005); MOS: matéria orgânica do solo.

O solo usado para o preenchimento dos vasos recebeu uma mistura de carbonato de Cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e carbonato de Magnésio (MgCO<sub>3</sub>) em uma relação molar de 3:1 com o objetivo de elevar a saturação por bases para 70%. O solo permaneceu incubado por 15 dias, recebendo irrigações diárias. Após o período de incubação o solo atingiu o pH de 6,5. O P foi aplicado na semeadura (150 mg/dm<sup>-3</sup> de P) e os demais nutrientes aplicados em cinco parcelamentos: 0, 4, 8, 12 e 16 dias após o semeio (Tabela 3).

**Tabela 3:** Nutrientes e quantidades totais aplicadas por fertirrigação, conforme orientações de Novais et al. (1991).

Nutriente	N	K	S	B	Cu	Fe	Mn	Mo	Zn
Dose (mg kg <sup>-1</sup> )	100,00	150,00	40,00	0,81	1,33	1,55	3,66	0,15	4,00

Foram semeadas dez sementes em cada vaso e o número de plantas foi reduzido a seis após cinco dias depois da imergência das plantas. Durante o experimento, os vasos foram irrigados diariamente com água desmineralizada, mantendo a umidade próxima a capacidade de campo.

Vinte e cinco dias após o semeio foram coletadas a parte aérea, levada a estufa de ventilação forçada na temperatura 60°C até atingir peso constante. Em seguida o material vegetal foi pesado para a determinação da matéria seca da parte aérea (MSPA). As raízes foram separadas do solo, lavadas em água corrente, secas em

estufa de circulação forçada na temperatura de 60° C, pesadas para determinação da matéria seca da raiz (MSR). Foram coletadas amostras de raiz em cada unidade experimental (aproximadamente 30%) e armazenadas em frascos contendo álcool 30% para conservação e posterior análise morfológica por meio do programa WinRHIZO PRO 2009 (Regent Instruments, model: WinRhizo Pro 2009, Québec, Canada). Foram retiradas amostras de solo da camada de 0-10 cm, utilizando uma sonda, as amostras foram transportadas e mantidas em refrigeração de 4°C até a realização das análises da atividade das enzimas fosfatase ácida e alcalina.

### **2.3 Análise das plantas**

O comprimento da raiz (CR), área projetada da raiz (APR), superfície total da raiz (STR) e quantidade de raízes finas (<0,5 mm) (RF) foram avaliados por meio do sistema de análise de imagens WinRHIZO PRO 2009. As raízes foram colocadas em uma cuba acrílica de 30 cm x 40 cm de comprimento, contendo 1000 mL de água destilada sobre o Scanner EPSON® LA2400. Foram dispostas dispersas ao longo da cuba verificando a total imersão delas e evitando sobreposição entre as raízes. Em seguida, as raízes foram secas em estufa de circulação forçada de ar, à 60°C, até peso atingir constante. Foi calculada a matéria seca total (MST) através da soma da MSPA e MST.

Os materiais vegetais secos foram moídos e digeridos com solução nitroperclórica. O teor de P no extrato foi determinado utilizando ICP-OES (710 ICP-OES, Agilent Technologies, Califórnia, EUA).

### **2.3 Análise enzimática**

As atividades das enzimas fosfatase ácida (AFACI) e fosfatase alcalina (AFACA) foram determinadas de acordo com TABATABAI (1994), utilizando a determinação colorimétrica do p-nitrofenol liberado pelas enzimas após a incubação de 1 g de solo a 37°C por 1 hora, na presença do substrato p-nitrofenolfosfato (0,025 mol L<sup>-1</sup>) em solução tampão pH (6,5 e 11,0) respectivamente para AFACI e AFACA.

## 2.4 pH em água

Para a determinação do pH em água, foi utilizada a relação de 1:2,5, sendo adicionados 10 cm<sup>3</sup> de solo a 25 mL de água, efetuando-se a leitura na suspensão (EMBRAPA,1997).

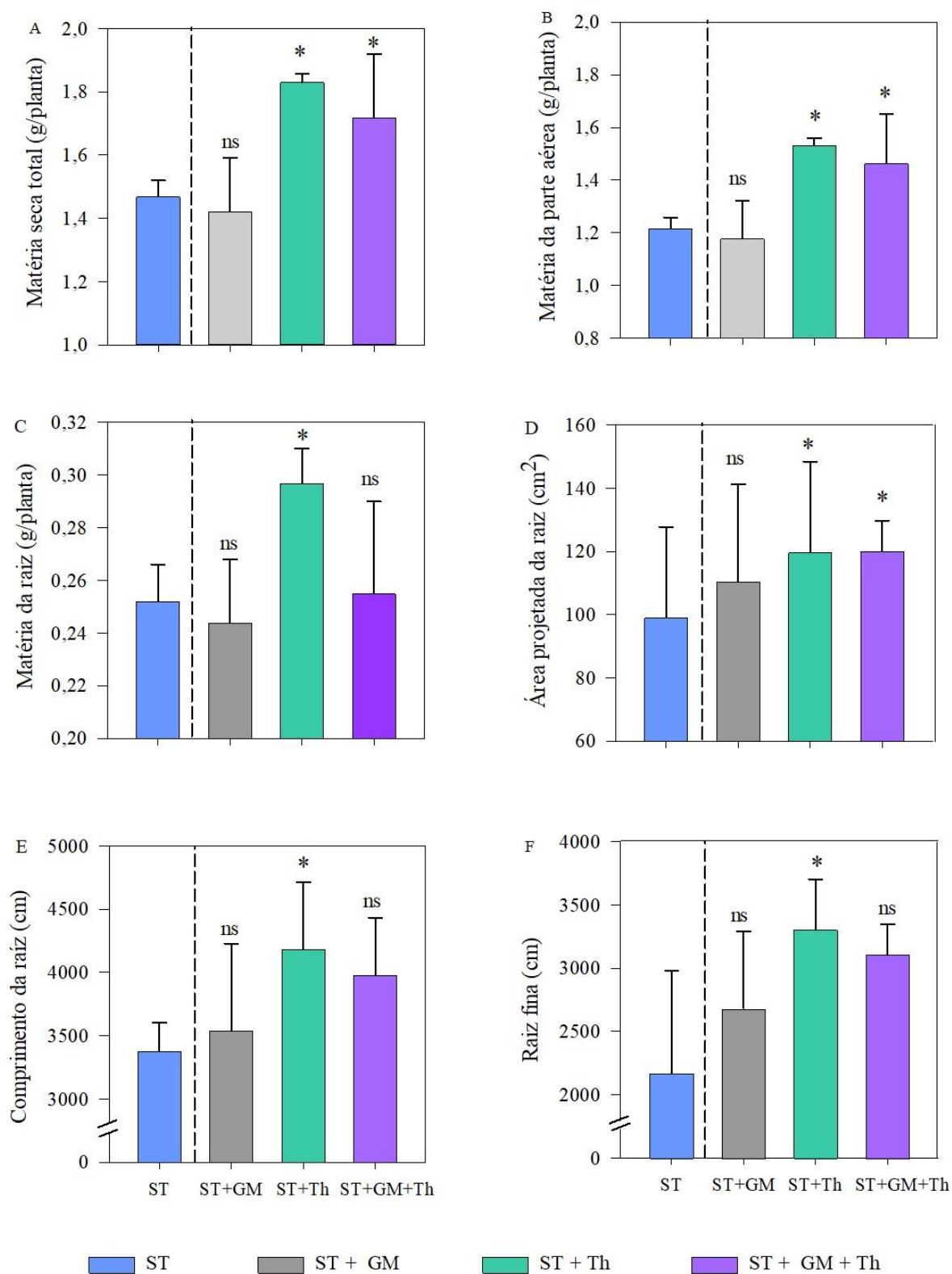
## 2.5 Análises de dados e estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância. Para avaliação das premissas da ANOVA foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett. Os dados foram submetidos ao teste de Dunnett, para comparar os tratamentos isolados com o tratamento controle (ST). O nível de significância adotado em cada análise foi de 5%. As análises de variância e o teste de comparação de médias foram realizados no software R (R Development Core Team, 2010).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Características biométricas das plantas de milho sob o efeito da adição de superfosfato triplo e *Trichoderma harzianum*

A adição de *Trichoderma harzianum* aos grânulos de superfosfato triplo proporcionou resultados superiores para todas as variáveis avaliadas, comparativamente aos tratamentos sem adição do fungo. O incremento obtido nos tratamentos com fungo e sem adição de goma arábica em relação ao tratamento com apenas ST para as variáveis matéria seca total (MST), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca da raiz (MSR), área projetada da raiz (APR), comprimento da raiz (CR) e comprimento de raízes finas (RF) foi de 25, 26, 18, 12, 21 e 24 %, respectivamente (Figura 1A, 1B, 2C, 1D, 1E e 1F). Quando a goma arábica foi utilizada como adesivo para o revestimento dos grânulos com *Trichoderma harzianum* (ST+GM+Th) houve incremento para as variáveis MST, MSPA e APR de 17, 21 e 22 % respectivamente, em relação ao tratamento controle. (Figuras 1A, 1B e 1D). O tratamento do superfosfato triplo com goma arábica não diferiu do tratamento controle para todas as variáveis analisadas.

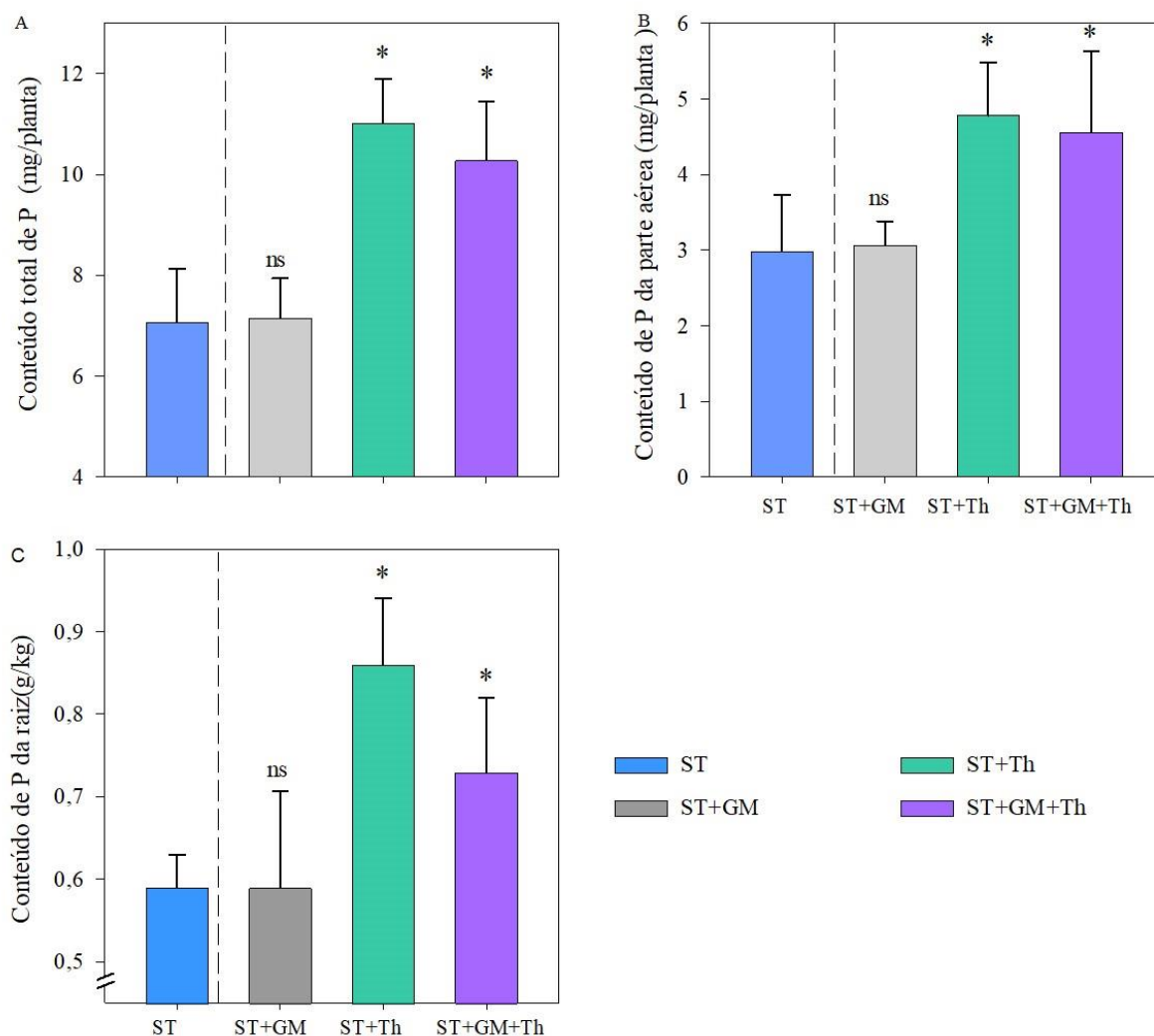


**Figura 1:** Matéria seca total (A), matéria seca da parte aérea (B), matéria seca da raiz (C), área projetada da raiz (D), comprimento da raiz (E) e comprimento das raízes finas (F) de plantas de milho cultivadas com superfosfato triplo (ST); superfosfato triplo com adição de

goma arábica a 20% (ST+GM); superfosfato com adição de *Trichoderma harzianum* 1500 UFC (ST+Th) e superfosfato triplo com adição de goma arábica (20%) e *Trichoderma harzianum* 1500 UFC. (\*) Difere do tratamento controle (ST) pelo teste de Dunnett a 5%.

### **3.2 Aquisição de P pelas plantas de milho adubadas com superfosfato triplo e *Trichoderma harzianum***

A adição de *Trichoderma harzianum* aos grânulos de superfosfato triplo melhorou a aquisição de P pelas plantas (Figura 2). Nos fertilizantes com *Trichoderma harzianum* sem o revestimento (ST+Th) diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) foram observadas para todas as variáveis analisadas: conteúdo de P total (C-T), conteúdo de P da parte aérea (C-PA) e conteúdo de P da raiz (C-R) quando comparadas ao ST, sendo observados incrementos de 56, 60 e 24%, respectivamente. Já o fertilizante superfosfato triplo com *Trichoderma harzianum* e revestimento (ST+GM+Th) mostrou superioridade em relação ao ST apenas para variáveis C-T e C-PA com ganhos de 45 e 53%. O tratamento do superfosfato triplo com goma arábica não diferiu do tratamento controle.

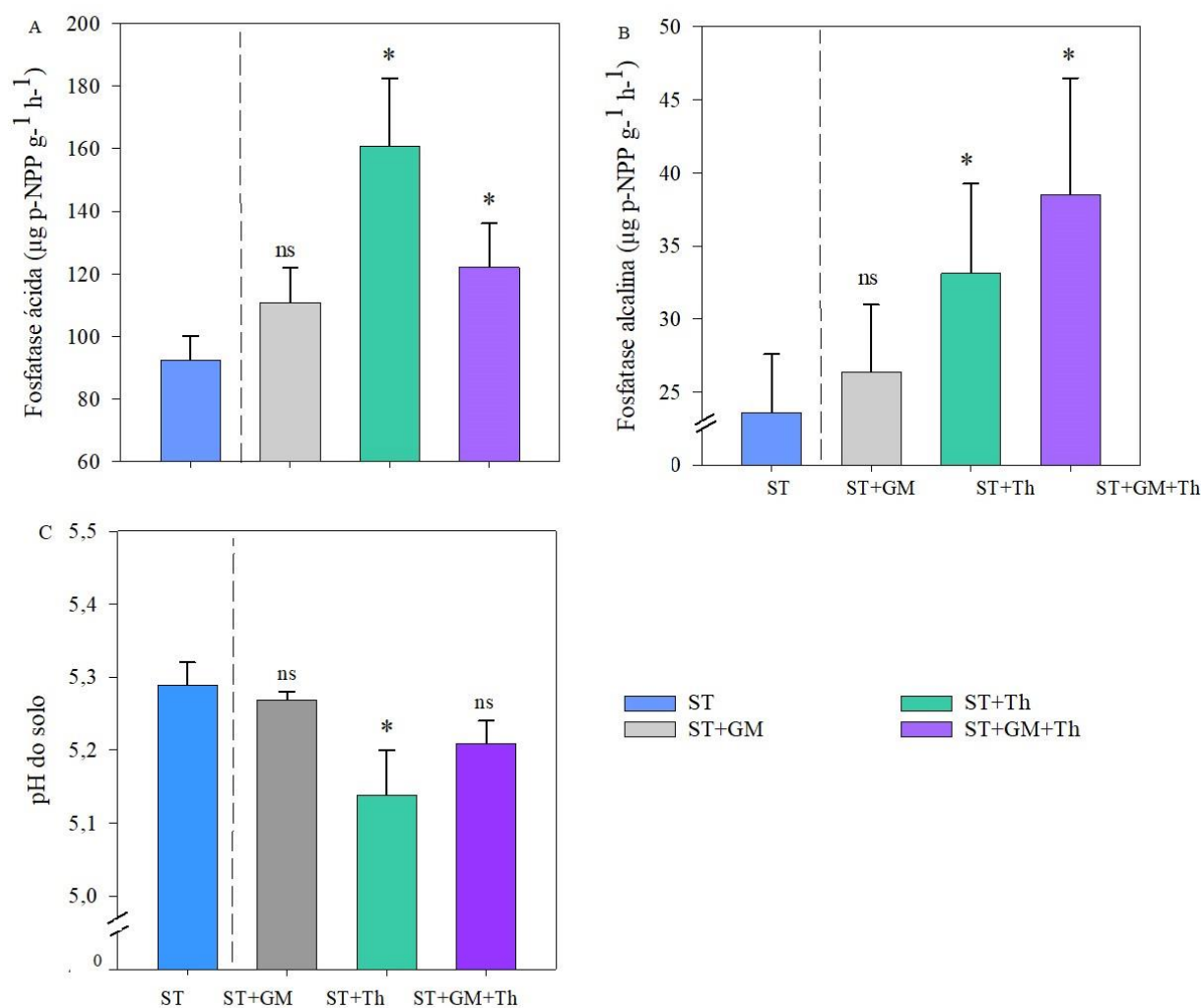


**Figura 2:** Conteúdo total de P (A), conteúdo de P na parte aérea (B) e conteúdo de P na raiz (C) de plantas de milho cultivadas com superfosfato triplo (ST); superfosfato triplo com adição de goma arábica a 20% (ST+GM); superfosfato com adição de *Trichoderma harzianum* 1500 UFC (ST+Th) e superfosfato triplo com adição de goma arábica (20%) e *Trichoderma harzianum* 1500 UFC. (\*) Difere do tratamento controle (ST) pelo teste de Dunnett a 5%.

### 3.3 Atividade enzimática e pH do solo cultivado com pelas plantas de milho adubadas com superfosfato triplo e *Trichoderma harzianum*

Nos solos em que houve aplicação do *Trichoderma harzianum* associado ao superfosfato triplo, tratamentos ST+Th e ST+ GM+Th foi constatado aumento da atividade das fosfatases ácida e alcalina (Figura 3A e 3B). Os valores de pH nos

solos cultivados com os diferentes fertilizantes variaram entre 5,14 e 5,29 (Figura 3C). O solo que recebeu o fertilizante contendo *Trichoderma harzianum* sem revestimento (ST+Th) mostrou-se mais ácido (Figura 3C). O tratamento do superfosfato triplo com goma arábica não implicou em diferenças em relação ao tratamento controle.



**Figura 3:** Atividade das fosfatases ácida (3A), fosfatase alcalina (3B) e pH nos solos cultivados com superfosfato triplo (ST); superfosfato triplo com adição de goma arábica a 20% (ST+GM); superfosfato com adição de *Trichoderma harzianum* 1500 UFC (ST+Th) e superfosfato triplo com adição de goma arábica (20%) e *Trichoderma harzianum* 1500 UFC.. (\*) Difere do tratamento controle (ST) pelo teste de Dunnett a 5%.

#### 4. DISCUSSÃO

A adição de *Trichoderma harzianum* ao superfosfato triplo melhorou a aquisição de P e o crescimento inicial de plantas de milho. Esses resultados podem estar relacionados à capacidade do fungo de solubilizar formas menos lábeis desse nutriente, o que aumenta a disponibilidade de P no solo (NARLOCH, et al., 2002; GOLDSTEIN, 1986; KIM, 1998). Esse fungo é capaz de produzir ácidos orgânicos na rizosfera das plantas (WHITELAW, 1999; KAPRI e TEWARI, 2010; CHAGAS et al., 2017). Além da acidificação, estes compostos podem formar complexos com cátions (ex.: ferro ou alumínio), favorecendo a dissolução de formas mais recalcitrantes de P (GYANESHWÀR et al., 2002). Adicionalmente, a produção dessas substâncias pelo fungo (compostos que competem com o P por sítios de adsorção na fase sólida do solo) pode contribuir para reduzir a adsorção e posterior fixação desse nutriente, melhorando sua aquisição pelas plantas (KPOMBLEKOU e TABATABAI, 1994).

O efeito positivo de *Trichoderma harzianum*, aplicado junto ao fertilizante, no crescimento das plantas de milho pode também estar relacionado à produção de reguladores de crescimento vegetal. A produção desses reguladores (ex.: auxinas) tem efeito positivo no desenvolvimento das raízes das plantas (OLIVEIRA et al., 2014; CONTRERAS-CORNEJO, et al., 2009; CHAGAS et al., 2017), o que melhora sua capacidade de aquisição de água e nutrientes, com forte efeito em nutrientes menos móveis no solo, como o P (LÓPEZ-BUCIO et al, 2015; FIORENTINO et al., 2018)

A diminuição do pH do meio, principalmente pela produção de ácidos orgânicos, é também importante na inibição do crescimento de raízes primárias, e conseqüentemente para o estímulo ao desenvolvimento das raízes secundárias aumentando substancialmente a superfície radicular (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2009; KAPRI e TEWARI, 2010; CHAGAS et al., 2017).

Microrganismos solubilizadores de fosfatos, como o *Trichoderma*, apresentam capacidade de aumentar o aproveitamento de formas pouco solúveis de P. A maioria dos estudos que avaliam o emprego do fungo na busca de aumentar a eficiência da fertilização utilizam fosfatos naturais de baixa solubilidade (ALTOMARE et al., 1999; TANDON et al., 2020; EL-KATATNY e IDRES, 2014). Poucos trabalhos, como os realizados por Vinci et al., 2018; avaliaram a aplicação de *Trichoderma harzianum* quando se usa fontes de P solúveis para fertilização

O aumento da atividade das fosfatases ácida e alcalina observadas quando houve a aplicação de *Trichoderma harzianum* no fertilizante também deve estar associado ao aumento da aquisição de P pelas plantas (Figura 2 A). A atividade das fosfatases é diretamente relacionada a concentração de P do solo (NAHAS et al., 1994; FERNANDES et al., 1998; SILVA e BASSO, 1993). O aumento da atividade enzimática das fosfatases eleva o acesso das plantas ao P orgânico do solo. Aumentos de atividade das enzimas fosfatase ácida e alcalina também foram verificadas por Bononi et al., (2020) e Mercl et al., (2020) em solo cultivados com plantas de soja e milho, respectivamente, inoculadas com *Trichoderma spp.*

Os dados analisados sugerem que o uso goma arábica para revestimento do fertilizante enriquecido com *Trichoderma harzianum* ao fertilizante não foi eficiente, embora o uso de polímeros naturais seja prática frequentemente empregada para aumentar a sobrevivência de microrganismos, como *Rhizobium* inoculados em sementes de leguminosas (VINCENT, 1970; SALEMA et al. 1982).

## 5. CONCLUSÃO

A adição de *Trichoderma harzianum* ao superfosfato triplo melhora substancialmente o efeito da aplicação deste fertilizante na aquisição de P e crescimento das plantas, não sendo necessário adicionar aditivo para melhorar o efeito desejado. Todavia, testes de sobrevivência são ainda necessários para avaliar a sobrevivência do fungo no fertilizante após diferentes períodos de armazenamento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, 2926–2933, 1999.
- BONONI, L. *et al.* Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.
- CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P., FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na Promoção Do Crescimento Vegetal. **Journal of Neotropical Agriculture**, v. 4, n. 3, p. 97–102, 2017.
- CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; ALFARO-CUEVAS, R.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma* spp. Improve growth of arabidopsis seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na<sup>+</sup> elimination through root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, n. 6, p. 503–514, 2014.
- 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, n. 3, p. 1579–1592, 2009.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manualde métodos de análise do solo**. Brasília, p. 212, 1997.
- EL-KATATNY, M. H., IDRES, M. M. Effects of Single and Combined Inoculations with *Azospirillum brasilense* and *Trichoderma harzianum* on Seedling Growth or Yield Parameters of Wheat (*Triticum vulgare* L., Giza 168) and Corn (*Zea mays* L., Hybrid 310). **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, n. 12, p. 1913–1936, 2014.
- FERNANDES, L.A. *et al.* Fósforo e atividade da fosfatase ácida em plantas de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, p. 769-778, 1998.
- FIORENTINO, N. *Trichoderma*-based biostimulants modulate rhizosphere microbial populations and improve N uptake efficiency, yield, and nutritional quality of leafy vegetables. **Front. Plant Science**, v. 9, p. 1–15, 2018.
- GOLDSTEIN, A.H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. **Am. Journal Alternative Agriculture**, v. 1, p. 51-57, 1986.

- GOUVEIA, A. S. *et al.* Understanding How *Pochonia chlamydosporia* Increases Phosphorus Availability. **Geomicrobiologia Journal**, v. 36, n. 8, p. 747-751, 2019.
- HARMAN, G. E., PETZOLDT, R., COMIS, A., & CHEN, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 94, n. 2, p. 147–153, 2004.
- GYANESHWAR P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n.1, p.83-93,2002.
- KAPRI, A., TEWARI, L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, 2010.
- KIM, K. Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, p. 79-87, 1998.
- KPOMBLEKOU, K.; TABATABAI, M. A. **Effect of organic acid on release of phosphorus from Phosphate rocks**. In Soil Science, v. 158, n. 6, p. 441–453, 1994.
- LÓPEZ-BUCIO, J., PELAGIO-FLORES, R., HERRERA-ESTRELLA, A.,. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Science Horticulture**, 2015.
- MERCANTE, F.M.; STRALIOTTO, R.; DUQUE, F.F.; FRANCO, A.A. A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio. Seropédica: **Embrapa-CNPBS**, p. 8, 1992.
- MERCL, F. *et al.* Improved phosphorus fertilisation efficiency of wood ash by fungal strains *Penicillium* sp. PK112 and *Trichoderma harzianum* OMG08 on acidic soil. **Applied Soil Ecology**, v. 147, 2020.
- NAHAS, E., FORNASIERI, D. J., ASSIS, L. C. Resposta à inoculação de fungo solubilizador de fósforo em milho. **Scientia Agricola**, v. 51, n. 3, p. 463–469, 1994.
- NARLOCH, C.; OLIVEIRA, V.L.; ANJOS, J.T., SILVA FILHO, G.N. Respostas da cultura do rabanete à inoculação com fungos solubilizador res de fosfatos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 841-845, 2002.
- OLIVEIRA, G. M. *et al.* Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 239–249, 2014.

- RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba, Potafos. P. 343, 1991.
- RIBAS, P. P.; RECH, R.; MATSUMURA, A. T. S.; SAND, S. T. V. D. Potencial in vitro para solubilização de fosfato por *Trichoderma* spp. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 14, p. 70-75, 2016.
- Sahu, P. K.; Brahma Prakash, G.P. Formulations of biofertilizers – approaches and advances. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**, Springer, New Delhi, p. 179-198, 2016..
- SALEMA, M.P.; PARKER, C.A., ICIDBY, D.K. Death of rhizobia on inoculated seed. *Soil Biol. Biochem.*, 14:13-4, 1982.
- SHANKARAI AH, C.; HUNSIGI, G. ; NAGARAJU, M.S . Effect of levels and sources of phosphorus and phosphate solubilizing microorganisms on growth, yield and quality of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 2, n. 1, p. 23–28, 2000.
- SHORESH, M.; HARMAN, G. E.; MASTOURI, F. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual Review of Phytopathology**, 48, 21–43, 2010.
- SILVA, F.C., BASSO, L.C. Avaliação da atividade in vivo da fosfatase ácida da folha na diagnose da nutrição fosfórica em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 17, p. 371-375, 1993.
- SMITH, R.S. **Inoculant formulations and applications to meet changing needs'**. In Nitrogen fixation: Fundamentals and Applications (I.A. Tikhonovich, N.A. Provorov, V.I. Romanov and W.E. Newton Eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- TABATABAI, M.A. **Soil enzymes**. In: WEAVER, R.W. *et al.*, eds. Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties, Madison, Soil Science Society of America, 1994. v.5. p.775-833.
- TANDON, A. et al. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 791–798, 2020.
- THONAR, C. et al. Potential of three microbial bio-effectors to promote maize growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1–16, 2017.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root nodule. Oxford, **IBI' llandbook Brockwell Scientific Publication**, p. 164, 1970.

VINCI G. et al. An alternative to mineral phosphorus fertilizers: The combined effects of *Trichoderma harzianum* and compost on *Zea mays*, as revealed by <sup>1</sup>H NMR and GC-MS metabolomics. **PLoS ONE**, v. 13, p. 12, 2018.

WHITELAW, M. A. Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69 C, p. 99–151, 1999.

YEDIDIA, I.; SRIVASTVA, A.K.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. **Plant Soil**, v. 235, p. 235–242, 2001.