



FRANCISCA JAYSLANE DO RÊGO MENESES

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E NÍVEIS DE
OSMORREGULADORES EM PLANTAS DE MILHO
INOCULADAS COM *Trichoderma asperelloides* E
EXPOSTAS AO ESTRESSE POR ALUMÍNIO**

**TERESINA-PI
2020**

FRANCISCA JAYSLANE DO RÊGO MENESES

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E NÍVEIS DE OSMORREGULADORES EM PLANTAS
DE MILHO INOCULADAS COM *Trichoderma asperelloides* E EXPOSTAS AO
ESTRESSE POR ALUMÍNIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura Tropical para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora

Profa. Dra. Aurenívia Bonifácio

**TERESINA-PI
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processos Técnicos

M543r Meneses, Francisca Jayslane do Rêgo.
Respostas fisiológicas e níveis de osmorreguladores em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* e expostas ao estresse por alumínio / Francisca Jayslane do Rêgo Meneses. -- 2020.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Agricultura Tropical, Teresina, 2020.
“Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aurenívia Bonifácio.”

1. Plantas – Milho – Estresses abióticos. 2. Biomassa. 3. Clorofila.
4. Osmólitos. 5. *Trichoderma asperelloides*. I. Bonifácio, Aurenívia.
II. Título.

CDD 595.42

Elaborada por Thais Vieira de Sousa Trindade - CRB-3/1282

FRANCISCA JAYSLANE DO RÉGO MENESES

**Respostas fisiológicas e níveis de osmorreguladores em plantas de milho
inoculadas com *Trichoderma asperelloides* e expostas ao estresse por
aluminio**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2020.

Comissão Julgadora:



Profa. Dra. Susana Cristine Siebeneichler – UFT



Dra. Helen Cristina de Arruda Rodrigues – UESPI



Profa. Dra. Aurenivia Bonifácio de Lima – CCN/UFPI
(Orientador)

TERESINA-PI

2020

“Tudo o que acontece no universo tem uma razão de ser; um objetivo. Nós como seres humanos, temos uma só lição na vida: seguir em frente e ter a certeza de que apesar de às vezes estar no escuro, o sol vai voltar a brilhar”

Irma Dulce

*À Deus por guiar-me em seus planos, a meus
filhos (José Vicente & Joara Maria) luz que
irradia o meu viver e a meu esposo Edinho por me
Amar e fazer dos meus sonhos os seus.*

DEDICO

Aos meus pais (Valmira e José) pelo amor incondicional e ofertar-me a vida, meus irmãos (Janilda, Jaylene e Jailson), e a toda minha família.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Deus, seu filho amado Jesus Cristo e Nossa Senhora sua Mãe por iluminar meus caminhos abençoando e alimentando minha vida com fé e determinação.

Aos meus pais Valmira Alves de Menezes do Rego e José do Rêgo Sobrinho pelos exemplos como seres humanos, ter me educado, amado e estarem sempre a meu lado tornando minha vida melhor.

Ao meu esposo Edinho Ferreira Pires por motivar e sempre acreditar em mim e aos nossos filhos tesouro de nossas vidas: José Vicente do Rêgo Ferreira & Joara Maria do Rêgo Ferreira, frutos do nosso amor e razão constante de nossas lutas, que este trabalho possa servir de motivação.

Aos meus sogros: José Ferreira da Silva e Francisca Ferreira Pires por estar conosco nessa jornada auxiliar sempre que necessário, segundos pais.

Aos meus irmãos Janailda do Rego Menezes, Jayslene do Rego Menezes, Jailson do Rego Meneses, Graciele e Luís, cunhados, cunhadas, tios(as), primos(as) e sobrinhos pela dedicação, torcida, apoio e carinho.

A minha comadre e amiga querida Francilda Ferreira Gomes esteve a me apoiar, sempre a me incentivar e escutar minhas aflições.

A minha orientadora, professora Dra. Aurenívia Bonifácio de Lima, pela orientação, ensinamentos passados e dedicação a este trabalho.

A professora Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes pela atenção sempre e por ter sido inspiração e modelo nos passos iniciais da minha vida acadêmica.

A Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical em especial aos professores: Dr. Gabriel Júnior, Dr. Carlos Humberto, Dr. Jadson Antunes, Dra. Artenisa Rodrigues, Dra. Solange França e Dr. Edson Alves Bastos pelos ensinamentos e cordialidade.

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação em Agronomia-Agricultura Tropical, em especial aos amigos queridos Vicente Costa Neto, Ágda Lorena, João Pedro Aquino, Ingrid Setubal, Ana Cristina, Ynayanna Nariza, Bruno Arcanjo, Lorena Leal, Joanderson Marques e Enayra Sousa pelo apoio, companheirismo e momentos intensos vividos.

A Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), coordenada pelo Professor Dr. Francisco de Alcântara Neto, por ceder espaço e equipamentos.

Ao Laboratório de Fitossanidade, coordenado pelo Professor Dr. José Evando Beserra Júnior, por ceder espaço e equipamentos.

Ao Departamento de Biologia por ceder a casa de vegetação para instalação e condução dos experimentos.

Ao Grupo de Estudos e Pesquisa em Fisiologia do Estresse Vegetal (GEFE) e ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal pelas experiências compartilhadas.

As Senhoras Dona Elza, Dona Ana Celia e Dona Nilvânia pelas conversas, atenção, convívio e disponibilidade sempre que solicitadas.

Aos técnicos de laboratório: Leudimar, pelo exemplo de dedicação profissional e amizade, Idenilson pelo profissionalismo e ajuda sempre que solicitado; Joelton, pela enorme contribuição, amizade e seu altruísmo; Louise, pelo apoio constante e solidariedade sempre; Silas pelas cordialidade e prontidão e Dona Antônia Farias, por contagiar-me com sua alegria sempre nos horários de almoço.

Expresso aqui a minha gratidão a todos aqueles cuja contribuição de forma direta ou indireta fez parte desta história e foi de fundamental importância para realização dessa etapa.

Meu muito obrigado!

RESUMO

O excesso de alumínio é uma condição estressante frequentemente presente em solos ácidos e que afeta o crescimento e a produtividade vegetal. O objetivo do presente estudo foi avaliar as respostas de crescimento e as alterações bioquímicas em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* e expostas ao alumínio. Sementes de milho foram germinadas e, em seguida, transplantadas para vasos contendo areia lavada e autoclavada. Na semeadura, a inoculação foi realizada, separadamente, com os isolados T01, T02, T74, T76 ou T96 de *T. asperelloides*. Após apresentarem duas folhas definitivas, as plantas foram expostas a níveis crescentes de cloreto de alumínio (0, 50, 100, 150 e 200 μM de AlCl_3). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $5 \times 5 + 1$, sendo cinco níveis de AlCl_3 , cinco isolados fúngicos e um controle absoluto (planta não inoculada). As plantas de milho inoculadas com isolados de *T. asperelloides* apresentaram alterações significativas na taxa de crescimento absoluto, comprimento das raízes, massa seca da parte aérea, raízes e total e na relação entre a massa seca da parte aérea e das raízes em resposta aos níveis crescentes de alumínio. Além disso, houve redução significativa no teor de clorofilas (a, b e total) e aumento na concentração de carotenoides e antocianinas nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* e expostas ao alumínio. Em relação às plantas não inoculadas e não expostas ao alumínio, as plantas inoculadas com *T. asperelloides* apresentaram aumento nos parâmetros relacionados com o crescimento, no teor de pigmentos fotossintéticos e nos solutos inorgânicos, com destaque para as plantas inoculadas com os isolados T01 ou T02. Houve incremento significativo na concentração de aminoácidos solúveis totais, prolina livre e carboidratos solúveis totais nas plantas inoculadas em resposta ao alumínio. O teor de proteínas solúveis, amido e de nitrogênio total foi superior nas plantas inoculadas, principalmente quando os isolados T01, T76 e T96 foram utilizados. Conclui-se que o uso de *T. asperelloides* alivia os efeitos negativos do estresse por alumínio em plantas de milho.

Palavra-chave: Estresses abióticos, biomassa, clorofila, osmólitos.

ABSTRACT

The excess of aluminum is a stressful condition often present in acidic soils and affects plant growth and yield. The objective of the present study was to evaluate the growth responses and biochemical alterations in maize plants inoculated with *T. asperelloides* and exposed to aluminum. Maize seeds were germinated and then transferred to pots containing washed and autoclaved sand. At sowing, inoculation was carried out separately with the isolates T01, T02, T74, T76 or T96 of *T. asperelloides*. After presenting two definitive leaves, plants were exposed to increasing levels of aluminum chloride (0, 50, 100, 150 and 200 μM AlCl_3). The experimental design was completely randomized in a 5 x 5 + 1 factorial scheme, being five levels of AlCl_3 , five fungal isolates and one absolute control (uninoculated plant). Maize plants inoculated with *T. asperelloides* isolates showed significant changes in absolute growth rate, root length, shoot, root and total dry weight and in relation to shoot and root dry weight in response to increasing levels of aluminum. In addition, there was a significant reduction in chlorophyll content (a, b and total) and an increase in carotenoid and anthocyanin concentration in plants inoculated with *T. asperelloides* and exposed to aluminum. In relation to plants not inoculated and not exposed to aluminum, plants inoculated with *T. asperelloides* showed increase in growth-related parameters, in photosynthetic pigment content and in inorganic solutes, especially those inoculated with isolates T01 or T02. There was a significant increase in the concentration of total soluble amino acids, free proline and total soluble carbohydrates in inoculated plants in response to aluminum. Soluble protein, starch and total nitrogen content was higher in inoculated plants, especially when isolates T01, T76 and T96 were used. It was concluded that *T. asperelloides* resulted in positive effects on growth and in photosynthetic pigment contents in maize plants submitted to aluminum stress, especially when isolates T01 or T02 were used. It is concluded that the use of *T. asperelloides* relieves the negative effects of aluminum stress on maize plants.

Keywords: Abiotic stresses, biomass, chlorophyll, osmolytes.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Gráfico de radar mostrando o efeito do estresse por alumínio (0, 50, 100, 150 e 200 μM de AlCl_3) nos parâmetros de crescimento e dos pigmentos fotossintéticos de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96). TCA = taxa de crescimento absoluto. MSPA, MSR e MST = massa seca da parte aérea, das raízes e total, respectivamente. RPAR = relação MSPA/MSR. CR = comprimento das raízes. CLA, CLB e CLT = clorofila a, b e total, respectivamente. CAR = carotenoides. ANT = antocianina. 37

Figura 2. Análise de componentes principais dos dados obtidos nas plantas não inoculadas (NI) e nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* e submetidas ao estresse por alumínio. TCA = taxa de crescimento absoluto. MSPA, MSR e MST = massa seca da parte aérea, das raízes e total, respectivamente. RPAR = relação MSPA/MSR. CR = comprimento das raízes. CLA, CLB e CLT = clorofila a, b e total, respectivamente. RCAB = relação clorofila a/clorofila b. CAR = carotenoides. ANT = antocianina..... 38

Figura 3. Taxa de crescimento absoluto de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)...... 39

Figura 4. Comprimento das raízes de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)...... 40

Figura 5. Massa seca da parte aérea (A) e das raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)...... 41

Figura 6. Relação entre massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)...... 42

Figura 7. Clorofila a (A) e clorofila b (B) em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)...... 43

Figura 8. Clorofila total (A) e relação clorofila a/b (B) em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)..... 44

Figura 9. Carotenoides (A) e antocianinas (B) em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)..... 45

Capítulo II

Figura 1. Concentração de amônia livre em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)..... 56

Figura 2. Concentração de nitrato em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)..... 57

Figura 3. Teor de sódio em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)..... 58

Figura 4. Teor de potássio em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$)..... 59

Figura 5. Aminoácidos solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que

não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).....	61
Figura 6. Concentração de prolina livre em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).....	62
Figura 7. Concentração de proteínas solúveis em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).....	63
Figura 8. Teor de nitrogênio total em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).....	64
Figura 9. Concentração de carboidratos solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).....	65
Figura 10. Concentração de sacarose em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).....	66
Figura 11. Concentração de amido em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com <i>T. asperelloides</i> em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).....	68
Figura 12. Análise de componentes principais das variáveis bioquímicas analisadas em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Em destaque, as plantas não inoculadas (NI).	69

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Informações gerais acerca dos isolados de *Trichoderma asperelloides* selecionados para o presente estudo..... 35

Capítulo II

Tabela 1. Informações gerais acerca dos isolados de *Trichoderma asperelloides* selecionados para o presente estudo..... 53

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de crescimento e dos níveis de pigmentos fotossintéticos analisadas nas plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Os dados estão mostrados no capítulo I.	75
Apêndice 2. Valores do ajuste da regressão dos parâmetros de crescimento e dos níveis de pigmentos fotossintéticos analisados nas plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Os dados estão mostrados no capítulo I.	76
Apêndice 3. Análise de variância (ANOVA) da concentração de solutos inorgânicos e orgânicos e do teor de nitrogênio total quantificadas em plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Os dados estão mostrados no capítulo II.	77
Apêndice 4. Valores do ajuste da regressão da concentração de solutos inorgânicos e orgânicos e do teor de nitrogênio total quantificadas em plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Os dados estão mostrados no capítulo II.	78

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 O gênero <i>Trichoderma</i> e seus efeitos na fisiologia das plantas	20
2.2 Efeitos da presença de alumínio na rizosfera	22
2.3 Uso do <i>Trichoderma</i> como mitigador de estresses.....	23
2.4 Importância do milho no cenário agrícola brasileiro.....	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPITULO I.....	30
Crescimento e pigmentos fotossintéticos em plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> e expostas ao estresse por alumínio	30
RESUMO.....	31
ABSTRACT	32
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Local de implantação do experimento.....	34
2.2 Obtenção dos microrganismos e preparo do inoculante.....	34
2.3 Condução e coleta dos dados.....	35
2.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	36
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	37
3.1 Análise exploratória dos dados	37
3.2 Respostas de crescimento	38
3.3 Pigmentos fotossintéticos.....	42
4. CONCLUSÃO	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
CAPITULO II.....	49
Compostos orgânicos e inorgânicos em plantas de milho inoculadas com <i>Trichoderma asperelloides</i> e submetidas ao excesso de alumínio	49
RESUMO.....	50
ABSTRACT	51
1. INTRODUÇÃO.....	52
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 Local de implantação do experimento.....	53
2.2 Obtenção dos microrganismos e preparo do inoculante.....	53
2.3 Condução e coleta dos dados.....	54
2.4 Delineamento experimental e análise estatística.....	54
3. RESULTADO E DISCUSSÃO	55
3.1 Solutos inorgânicos	55
3.2 Compostos nitrogenados e de carbono	60
3.3 Análise final dos dados obtidos.....	68
4. CONCLUSÃO	70
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICES.....	74

1. INTRODUÇÃO GERAL

As espécies vegetais são frequentemente expostas a situações de estresses abióticos, tais como altas e baixas temperaturas, excesso de luz, metais pesados, seca e salinidade, que causam enormes prejuízos socioeconômicos, ambientais e podem causar perdas à produção agrícola em todo o mundo (KOLLIST et al., 2019). Segundo Zhu (2016), os estresses abióticos causam distúrbios fisiológicos e metabólicos que influenciam negativamente o crescimento e produtividade de inúmeras culturas agronomicamente importantes. O excesso de alumínio é um tipo de estresse abiótico que provoca grande restrição para a produção agrícola em todo o mundo, especialmente em solos ácidos (CHOUDHURY; SHARMA, 2014; YUSUF et al., 2016; MUHAMMAD et al., 2019). O alumínio (Al) é um dos componentes integrais da fração mineral do solo, sendo a forma monomérica (Al^{+3}), predominante e solúvel em solos com pH entre 5,0 e 7,0 (SCHMITT et al., 2016; SINGH et al., 2017; ZIOŁA-FRANKOWSKA; FRANKOWSKI, 2018).

A forma monomérica (Al^{+3}) é considerada fitotóxica para as espécies vegetais e seu excesso provoca alterações morfofisiológicas, principalmente no sistema radicular (KOCHIAN et al., 2015). A toxicidade ao alumínio altera, primariamente, a estrutura e funcionamento do sistema radicular devido ao aumento significativo na rigidez da parede celular, rápida supressão da divisão celular, redução no alongamento dos pelos radiculares, diminuição na taxa de absorção e transporte intra- e intercelular de nutrientes e água (CHOUDHURY; SHARMA, 2014; HE et al., 2019). Segundo Muhammad et al. (2019), o excesso de alumínio leva a deficiência de fósforo, cálcio e magnésio, importantes nutrientes minerais, e induz o aumento dos níveis de manganês para faixa de toxicidade. Além de alterar o sistema radicular, níveis tóxicos de alumínio reduzem a taxa fotossintética uma vez que altera a arquitetura dos cloroplastos e reduz o transporte de elétrons no fotossistema II (SINGH et al., 2017).

Na busca de aumentar a produtividade de espécies agrícolas em situações de estresse tem se buscado, através de programas de melhoramento vegetal, a produção de espécies vegetais com tolerância a um dado estresse específico e, conseqüentemente, a introdução destas novas espécies para o cultivo em larga escala (MUNNS; GILLIHAM, 2015). Entretanto, a produção de espécies mais tolerantes é um processo dispendioso e demorado, uma vez que ocasiona elevados custos gerando muitas despesas e ainda demanda muito tempo. Uma técnica inovadora que tem

atraído a atenção nos últimos anos é o uso de microrganismos benéficos para induzir a resistência das plantas aos estresses abióticos e esta abordagem tem se mostrado, portanto, uma alternativa promissora para mitigar as situações estressantes e garantir o crescimento e a produtividade vegetal (LÓPEZ-BUCIO et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2016; VENTURI; KEEL, 2016; ZHANG et al., 2016).

Pesquisas sobre a interação entre plantas e microrganismos benéficos em condições de estresse estão sendo desenvolvidas e resultados promissores já foram relatados. Estas pesquisas focam, principalmente, as interações de plantas com rizóbios (GÓMEZ-PADILLA et al., 2016; MORAES et al., 2016), bactérias promotoras do crescimento de plantas (ORHAN, 2016; PANHWAR et al., 2017) e micorrizas (ROUPHAEL et al., 2015; SANTANDER et al., 2017) em condições estressantes. Poucos são os estudos avaliando a interação entre plantas e fungos promotores do crescimento de plantas (FPCP). FPCP são fungos de vida livre que possuem a capacidade de estimular o sistema de defesa vegetal para suprimir o ataque de fitopatógenos e promovem o crescimento à medida que melhora a absorção de água e nutrientes pelas plantas (LÓPEZ-BUCIO et al., 2015; VENTURI; KEEL, 2016). Dentre os gêneros de FPCP descritos, destacam-se *Phoma* e *Trichoderma*.

Trichoderma é um FPCP que tem sido largamente utilizado em formulações comerciais por estimular o crescimento vegetal e atuar como controle biológico de fitopatógenos, com destaque para *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (LÓPEZ-BUCIO et al., 2015; FIGUEIREDO et al., 2016). *Trichoderma* pode atuar direta ou indiretamente contra fitopatógenos (VOS et al., 2015; ZHANG et al., 2016). De forma direta, *Trichoderma* exerce micoparasitismo, produz enzimas líticas de parede celular (amilase e celulase, p. ex.) ou libera compostos antimicrobianos (HERMOSA et al., 2013; VOS et al., 2015). Indiretamente, as espécies de *Trichoderma* competem por nutrientes e espaço com outros microrganismos, modificam as condições da rizosfera, promovem o crescimento vegetal através da liberação de fitormônios e induzem as vias de defesa sistêmica nas espécies vegetais (ZHANG et al., 2016).

Tem sido relatado que espécies de *Trichoderma* são eficientes em aliviar os efeitos adversos de estresses, e muito tem sido relatado principalmente com estresse salino nas espécies vegetais. Por exemplo, plantas de *Arabidopsis* inoculadas com *T. virens* ou *T. atroviride* (CONTRERAS-CORNEJO et al., 2014), de arroz e milho (YASMEEN; SIDDIQUI, 2018) e de pepino inoculadas com *T. asperellum* (ZHAO;

ZHANG, 2015) apresentam estímulo no crescimento vegetativo e aumento da tolerância ao estresse salino e estas respostas parecem estar relacionadas com o incremento no sistema radicular em uma modulação positiva nos níveis de fitormônios, principalmente de ácido indol-3-acético e etileno, induzida por estes fungos. Em plantas de trigo inoculadas com *T. longibrachiatum*, o incremento na tolerância ao estresse salino foi relacionado com o aumento nos níveis de prolina e na atividade e expressão gênica de enzimas do sistema de defesa antioxidativo (ZHANG et al., 2016). Em contraste, plantas de tomate inoculadas com *T. harzianum* e suplementadas com NPK não responderam positivamente quando expostas à salinidade (RUBIO et al., 2017).

Embora as respostas das plantas interagindo com *Trichoderma* em condições de estresse salino bem como outros sejam relatadas na literatura, mesmo com alguns resultados contrastantes, os estudos com interação planta-*Trichoderma* em condições de estresse por alumínio são escassos. Como já ressaltado, as interações planta-microrganismo são fundamentais para promover a sanidade e produtividade vegetal em situações normais e estressantes (SOUZA et al., 2015).

Considerando a importância socioeconômica das plantas de milho, os efeitos benéficos de espécies de *Trichoderma* para as espécies vegetais e ainda a necessidade de elucidar mecanismos envolvidos com a resposta aos estresses abióticos, principalmente relacionados ao estresse por alumínio, o presente estudo tem por objetivo investigar os efeitos da inoculação em plantas de milho com isolados de *T. asperelloides* em condições de estresse por alumínio visando compreender os processos fisiológicos e bioquímicos relacionados com a resposta destas plantas a estes estresses e ainda selecionar isolado de *T. asperelloides* a ser recomendado para o cultivo destas plantas em ambientes estressantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O gênero *Trichoderma* e seus efeitos na fisiologia das plantas

Trichoderma Pers. (1794) é um dos gêneros de fungos filamentosos mais estudados mundialmente e conta com 252 espécies descritas até 2015 (BISSETT et al., 2015). Estes fungos podem ser de vida livre, saprófito, micoparasitas e também endofíticos de plantas com alta diversidade genética e metabólica e distribuição

cosmopolita sendo associado aos mais diversos ecossistemas de solo em uma ampla gama de zonas climáticas (DRUZHININA et al., 2011). Além disso, podem atuar na decomposição de matéria orgânica e xenobióticos apresentando, deste modo, grande versatilidade e importância biotecnológica (VENTURI; KEEL, 2016). Juntamente com outros gêneros de fungos, *Trichoderma* pode ser classificado como fungos promotores de crescimento em plantas (FPCP) uma vez que promove o crescimento destas através do estímulo da resistência vegetal, biocontrole, da manutenção do equilíbrio hormonal e do incremento na mobilização e assimilação de nutrientes, principalmente fosfato (VENTURI; KEEL, 2016; RUBIO et al., 2017).

O FPCP *Trichoderma* é um microrganismo antagonista de fitopatógenos (JUNGES et al., 2016; YASMEEN et al., 2018) e tem a capacidade de suprimir doenças de plantas e promover o crescimento e a produtividade vegetal através de diferentes modos de ação, tais como indução da resistência sistêmica, antibiose, micoparasitismo e estímulo na captação e absorção de nutrientes (MISHRA et al., 2016; EGAMBERDIEVA et al., 2017). *Trichoderma* tem sido utilizado com sucesso, em escala comercial, para controle biológico de vários fitopatógenos, com destaque para *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Armillaria mellea* e *Chondrostereum purpureum* (EL-KOMY et al., 2015; CHEN et al., 2019). Segundo Rubio et al. (2017), *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. viride* são as principais espécies de *Trichoderma* comercializadas como agentes de controle biológico. Além disso, pesquisas com plantas inoculadas com *Trichoderma* mostram que este FPCP pode incrementar não apenas a biomassa, mas também a produtividade vegetal.

O efeito benéfico do *Trichoderma* tem sido verificado no crescimento e produtividade de várias culturas agronomicamente importantes, tanto em monocotiledôneas, como arroz (CHAGAS et al., 2015; YASMEEN et al., 2018; DWIPA, 2019), milho (YASMEEN; SIDDIQUI, 2018), alho, cebola (VALADARES-INGLIS et al., 2018) e cana-de-açúcar (FARIAS et al., 2018), como em dicotiledôneas, a exemplo feijão comum (MWEETWA et al., 2016), feijão-caupi (SILVA et al., 2019a), grão-de-bico (SHARMA et al., 2018), pepino (ZHAO; ZHANG, 2015), soja (CHAGAS et al., 2017) e tomate (NIETO-JACOBO et al., 2017). Embora existam resultados registrados na literatura acerca do efeito benéfico do *Trichoderma*, mais estudos são necessários para que o uso destes microrganismos seja melhor explorado tanto na indústria alimentícia garantindo a segurança alimentar global de uma população em

crescimento como também em sistemas de cultivo que minimizem os insumos agrícolas com maximização da produtividade de maneira ambientalmente responsável (PARNELL et al., 2016; EGAMBERDIEVA et al., 2017).

2.2 Efeitos da presença de alumínio na rizosfera

Os estresses abióticos, principalmente seca, calor, frio, inundação e salinidade, são adversidades ambientais que resultam em perdas significativas de safras (ZAIDI et al., 2014) e representam um desafio adicional na produção de alimentos em todo o mundo (HALFORD et al., 2014). Os danos ocasionados pela exposição das plantas aos estresses abióticos reduzem o rendimento e a qualidade dos produtos agrícolas (MONTEIRO et al., 2014). De acordo com Awasthi et al. (2014), é provável que as situações de estresses abióticos se agravem ainda mais no futuro devido às mudanças climáticas e poluição ambiental. Neste contexto, as práticas agrícolas que aumentam a resistência das plantas aos estresses abióticos são fundamentais para a agricultura e também para a sustentabilidade ambiental, uma vez que as culturas com baixa resistência aos estresses consomem mais água e fertilizantes e, portanto, esgotam bastante o meio ambiente (ZHU, 2016).

Dentre os estresses abióticos, a contaminação por metais pesados é um sério problema ambiental que limita a produtividade vegetal e ameaça à saúde humana. O alumínio (Al) é um metal pesado abundante na crosta terrestre presente nos minerais primários e secundários das rochas na forma de aluminossilicatos e estes, quando sofrem intemperismo, liberam o alumínio na forma monomérica ou trocável (Al^{3+}) (CHOUDHURY; SHARMA, 2014; KARAK et al., 2015; MUHAMMAD et al., 2019). A forma monomérica do alumínio (Al^{3+}) é fitotóxica, pois provoca alterações morfofisiológicas, principalmente no sistema radicular (KOCHIAN et al., 2015; YUSUF et al., 2016). Cerca de 50% das terras aráveis do mundo são ácidas e 67% destes solos ácidos encontram-se com problemas de toxicidade por alumínio a nível global (LIN et al., 2012; SCHMITT et al., 2016). Segundo Sade et al. (2016), a toxicidade por alumínio causa perdas de 25 a 80% no rendimento agrícola dependendo da espécie. O íon Al^{3+} é notadamente mais fitotóxico para monocotiledôneas e causa inibição do crescimento em plantas de arroz, trigo, milho, centeio e outras espécies vegetais (YUSUF et al., 2016; PELAGIO-FLORES et al., 2017; HE et al., 2019).

O alumínio trocável (Al^{+3}) induz efeitos adversos ao ser absorvidos pelas raízes vegetais (JAISWAL et al., 2018; ZIOŁA-FRANKOWSKA; FRANKOWSKI, 2018). O sintoma inicial da toxicidade ao excesso de Al^{+3} é a rápida inibição do alongamento radicular, entretanto o mecanismo exato de como esta inibição se estabelece ainda não é claro (TANDZI et al., 2018). A destruição da estrutura celular e rápida supressão da divisão celular nas células presentes no ápice radicular são processos associados a redução do alongamento radicular, causando redução e/ou atrofia do sistema radicular, impactando negativamente na captação de água e nutrientes (SADE et al., 2016; HE et al., 2019). Visto que, a exposição a longo prazo ao excesso de Al^{+3} resulta em plantas com sintomas de deficiência de macro e micronutrientes, com destaque para P, Ca, Mg, K, Mn, Mo e Zn (CHOUDHURY; SHARMA, 2014; KOCHIAN et al., 2015; TANDZI et al., 2018).

O alumínio é tóxico para muitas plantas em concentrações micromolares (TABALDI et al., 2009). Além de afetar negativamente o sistema radicular vegetal, o excesso de alumínio provoca efeitos negativos no desenvolvimento da parte aérea (MACÊDO et al., 2009). A toxicidade ao alumínio foi demonstrada em *Arabidopsis*, milho e Citros e neste último registrou-se menor número de folhas, diminuição do sistema radicular e aumento na concentração de ácido-indol-3-acético (AIA) em resposta ao aumento dos níveis de alumínio (SILVA et al., 2019b). Segundo Moustaka et al. (2016), o excesso de alumínio causa efeito fitotóxico no metabolismo das folhas e, portanto, reduz o teor de clorofila, a transpiração e a fotossíntese, com maior comprometimento do fotossistema II – componente fotossintético mais vulnerável a este tipo de estresse. Além disso, o alumínio tem alta afinidade pelas biomembranas e, após se ligarem irreversivelmente aos fosfolipídios, induz a morte celular programada (HE et al., 2015).

2.3 Uso do *Trichoderma* como mitigador de estresses

As plantas são seres sésseis e estão constantemente expostas a situações de estresse bióticos ou abióticos. Em busca de se adaptar ou sobreviver às condições de estresse, as plantas podem se associar com microrganismos benéficos presentes no solo, sejam eles bactérias ou fungos (HE et al., 2018). Os microrganismos benéficos apresentam várias características importantes que vão desde a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico, melhorar absorção de nutrientes e produzir compostos que

estimulam o crescimento das plantas até a decomposição de resíduos, desintoxicação de pesticidas e controle de doenças de plantas e patógenos do solo (FIGUEIREDO et al., 2016). Dentre os microrganismos benéficos presentes no solo, destacam-se os rizóbios, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), as micorrizas e fungos promotores do crescimento de plantas (FPCP) (ROUPHAEL et al., 2015; GÓMEZ-PADILLA et al., 2016; MORAES et al., 2016; PANHWAR et al., 2017).

As espécies do gênero *Trichoderma* são FPCP com papéis relevantes na manutenção do solo e seu uso tem se mostrado importante em sistemas agrícolas sustentáveis (LEE et al., 2016). *Trichoderma* tem sido vastamente utilizado em formulações comerciais e mais de dez produtos contendo *Trichoderma* estão registrados no Brasil (VENTURI; KEEL, 2016; FIGUEIREDO et al., 2016). Estes produtos são reconhecidos por seus efeitos positivos no crescimento vegetal e no controle biológico de fitopatógenos (LÓPEZ-BUCIO et al., 2015). *Trichoderma* pode atuar diretamente contra fitopatógenos exercendo micoparasitismo ou produzindo e liberando enzimas líticas de parede celular ou compostos antimicrobianos (VOS et al., 2015). De forma indireta, as espécies de *Trichoderma* competem por nutrientes e espaço com outros microrganismos, modificam as condições da rizosfera, promovem o crescimento vegetal através da liberação de fitormônios e indução das vias de defesa sistêmica (ZHANG et al., 2016). Além de eficientes contra fitopatógenos, os isolados de *Trichoderma* são relatados como indutores de resistência a estresses abióticos (YASMEEN; SIDDIQUI, 2018).

A toxicidade do alumínio é um importante tipo de estresse abiótico e áreas afetadas por este estresse tem aumentado em todo o mundo, uma vez que os efeitos do excesso de alumínio sobre as plantas têm sido relatados e registrou-se que o alongamento radicular, a área foliar, o peso seco da parte aérea e das raízes diminuíram significativamente com o aumento das concentrações de alumínio em plantas de *Arabidopsis*, soja, alfafa e arroz (WANG et al., 2017; CHE et al., 2019; DWIPA, 2019). Em contrapartida, os estudos com uso de isolados de *Trichoderma* como mitigador dos efeitos tóxicos do excesso de alumínio na rizosfera ainda são escassos. Maldaner et al. (2019) relatam aumento no crescimento (altura, número de folhas e diâmetro do caule) de plantas de aroeira-sauso (*Schinus molle* L.) expostas a concentrações crescentes de alumínio (0, 25, 50, 75 e 100 mg L⁻¹) quando estas foram inoculadas com o isolado T2 de *Trichoderma*. Segundo estes autores, o

Trichoderma atua como bioestimulantes do crescimento vegetal e, portanto, atenua os danos recorrentes do excesso de alumínio.

2.4 Importância do milho no cenário agrícola brasileiro

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal mais cultivado no mundo e possui grande diversidade de aplicações, sendo utilizado como matéria-prima essencial para inúmeros processos agroindustriais, na alimentação humana e animal devido ao elevado valor nutricional de seus grãos (LERAYER, 2018). Os Estados Unidos, com 370,1 milhões de toneladas por hectare, e a China, com 215 milhões de toneladas por hectare, são os maiores produtores de milho no mundo (PEREIRA FILHO; BORGHI, 2018). No Brasil, a cultura do milho possui grande relevância, sendo o segundo grão mais produzido no ano de 2019 visto que sua produção, na safra 2018/2019, foi de 119 milhões de toneladas por hectare (CONAB, 2019). O Brasil contribui com 10% da produção mundial de milho e fica com o terceiro lugar, atrás dos Estados Unidos e da China (USDA, 2018).

Deste modo, o *Trichoderma* tem sido um grande aliado a promover o crescimento e induzir resistência ao estresse em plantas. O milho é uma cultura sensível ao estresse por alumínio no solo (COELHO et al., 2016; 2019) e os solos ácidos, geralmente com alumínio trivalente (Al^{+3}) em elevadas concentrações, podem causar muitas perdas de rendimento desta e de outras culturas (KOCHIAN et al., 2004; 2015). No entanto, existem relatos na literatura dos efeitos positivos da inoculação de plantas de milho com *Trichoderma*, sendo registrado maior acúmulo de massa seca do sistema radicular (RESENDE et al., 2004), aumento na taxa fotossintética (HARMAN; DONI et al., 2019) e ainda maior produção de biomassa mesmo quando infectado pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum graminicola* (HARMAN et al., 2004).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AWASTHI, R.; KAUSHAL, N.; VADEZ, V.; TURNER, N. C.; BERGER, J.; SIDDIQUE, K. H. M.; NAYYAR, H. Individual and combined effects of transient drought and heat stress on carbon assimilation and seed filling in chickpea. **Functional Plant Biology**, v. 41, n. 11, p. 1148-1167, 2014.
- BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W.; SAMUELS, G. J. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. **IMA Fungus**, v. 6, n. 2, p. 263-295, 2015.
- CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A.; FIDELIS, R.; CARVALHO FILHO, M.; MILLER, L. *Trichoderma asperellum* efficiency in soybean yield components. **Comunicata Scientiae**, v. 8, n. 1, p. 165-169, 2017.
- CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CARVALHO, M. R.; MILLER, L. O.; OROZCO-COLONIA, B. S. Evaluation of the phosphate solubilization potential of *Trichoderma* strains (*Trichoplus* JCO) and

effects on rice biomass. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 794-804, 2015.

CHEN, J.; DUAN, R. X.; HU, W. J.; ZHANG, N. N.; LIN, X. Y.; ZHANG, J. H.; ZHENG, H. L. Unravelling calcium-alleviated aluminum toxicity in *Arabidopsis thaliana*: Insights into regulatory mechanisms using proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 199, p. 15-30, 2019.

CHOUDHURY, S.; SHARMA, P. Aluminum stress inhibits root growth and alters physiological and metabolic responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 85, p. 63-70, 2014.

COELHO, C. J.; BOMBARDELLI, R. G. H.; SCHULZE, G. S.; CAIRES, E. F.; MATIELLO, R. R. Genetic control of aluminum tolerance in tropical maize germplasm. **Bragantia**, v. 1, p. 1-11, 2019.

COELHO, C. J.; MOLIN, D.; JONG, G.; GARDINGO, J. R.; CAIRES, E. F.; MATIELLO, R. R. Brazilian maize landraces: source of aluminum tolerance. **Australian Journal of Crop Science**, v. 10, p. 42-49, 2016.

CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira**. Quarto levantamento. v. 6, n. 4, p. 126, 2019.

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⁺ elimination through root exudates. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 27, p. 503-514, 2014.

DRUZHININA, I. S.; SEIDL-SEIBOTH, V.; HERRERA-ESTRELLA, A.; HORWITZ, B. A.; KENERLEY, C.M.; MONTE, E.; MUKHERJEE, P. K.; ZEILINGER, S.; GRIGORIEV, I. V.; KUBICEK, C. P. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 749-759, 2011.

DWIPA, I. J. Evaluation of aluminum tolerance in Pasaman local genotypes of brown rice during the early growth phase. **Indonesian Journal of Crop Science**, v. 1, n. 2, p. 16-25, 2019.

EGAMBERDIEVA, D.; WIRTH, S.J.; SHURIGIN, V. V.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F. Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-13, 2017.

EL-KOMY, M. H.; SALEH, A. A.; ERANTHODI, A.; MOLAN, Y. Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 1, p. 50-60, 2015.

FARIAS, C. P.; CHRISTYAN, P.; CARVALHO, R. C.; RESENDE, F. M. L.; AZEVEDO, L. C. B. Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3649-3660, 2018.

FIGUEIREDO, M. V. B.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C.; ARAUJO, F.; STAMFORD, N. P. Beneficial microorganisms: Current challenge to increase crop performance. In: **Bioformulations: for Sustainable Agriculture**, Springer, New Delhi. p. 53-70, 2016.

GÓMEZ-PADILLA, E.; RUIZ-DÍEZ, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; LÓPEZ SÁNCHEZ, R.; BLOEM, E.; EICHLER-LÖBERMANN, B. Inoculation with Native *Bradyrhizobia* strains improved growth of cowpea plants cultivated on a saline soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 47, n. 19, p. 2218-2224, 2016.

HALFORD, N. G.; CURTIS, T. Y.; CHEN, Z.; HUANG, J. Effects of abiotic stress and crop management on cereal grain composition: implications for food quality and safety. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, p. 1145-1156, 2014.

HARMAN, G. E.; DONI, F.; KHADKA, R. B.; UPHOFF, N. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants photosynthetic capability. **Journal of Applied Microbiology**, special issue article, p. 1-18, 2019.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Natural Reviews - Microbiology**, v. 2, p. 43-56, 2004.

HE, H. Y.; GU, M. H.; HE L. F. Signaling Pathways of Aluminum induced programmed cell death in higher plants. In: PANDA, S.K.; BALUSKA, F. (Ed.). **Aluminium stress adaptation and communication in plants**. Berlin: Springer, 2015. Cap. 4, p. 63-80.

HE, H.; LI, Y.; HE, L. F. Aluminum toxicity and tolerance in Solanaceae plants. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 23-29, 2019.

- HE, M.; HE, C. Q.; DING, N. Z. Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 871, p. 1-18, 2018.
- HERMOSA, R.; RUBIO, M. B.; CARDOZA, R. E.; NICOLÁS, C.; MONTE, E.; GUTIÉRREZ, S. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. **International Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 69-80, 2013.
- JAISWAL, S. K.; NAAMALA, J.; DAKORA, F. D. Nature and mechanisms of aluminium toxicity, tolerance and amelioration in symbiotic legumes and *rhizobia*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, n. 3, p. 309-318, 2018.
- JUNGES, E.; MUNIZ, M. F.; MEZZOMO, R.; BASTOS, B.; MACHADO, R. T. *Trichoderma* spp. na produção de mudas de espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 23, p. 237-244, 2016.
- KARAK, T.; SONAR, I.; PAUL, R.; FRANKOWSKI, M.; BORUAH, R.; DUTTA, A.; DAS, D. Aluminium dynamics from soil to tea plant (*Camellia sinensis* L.): Is it enhanced by municipal solid waste compost application? **Chemosphere**, v. 119, p. 917-926, 2015.
- KOCHIAN, L. V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. how do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 459-493, 2004.
- KOCHIAN, L. V.; PIÑEROS, M. A.; LIU, J.; MAGALHÃES, J. V. Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, n. 1, p. 571-598, 2015.
- KOLLIST, H.; ZANDALINAS, S. I.; SENGUPTA, S.; NUHKAT, M.; KANGASJARVI, J.; MITTLER, R. Rapid responses to abiotic stress: priming the landscape for the signal transduction network. **Trends in Plant Science**, v. 24, p. 25-37, 2019.
- LEE, S.; YAP, M.; BEHRINGER, G.; HUNG, R.; BENNETT, J. W. Volatile organic compounds emitted by *Trichoderma* species mediate plant growth. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2016.
- LERAYER, A. **Guia do Milho: Tecnologia do campo à mesa**. São Paulo: Conselhos de Informações Sobre Biotecnologia, 2018.
- LIN, M. H.; GRESSHOFF, P. M.; FERGUSON, B. J. Systemic regulation of soybean nodulation by acidic growth conditions. **Journal of Plant Pathology**, v. 160, p. 2028-2039, 2012.
- LÓPEZ-BUCIO, J.; PELAGIO-FLORES, R.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma* as biostimulant: Exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 109-123, 2015.
- MACÊDO, C. E. C.; JAN, V.; KINET, J. M.; LUTTS, S. Effects of aluminium on root growth and apical root cells in rice (*Oryza sativa* L.) cultivars: reliability of screening tests to detect Al resistance at the seedling stage. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, p.1255-1262, 2009.
- MALDANER, J.; STEFFEN, G. P. K.; SALDANHA, C. W.; STEFFEN, R. B.; TABALDI, L. A.; MISSIO, E. L.; MORAIS, R. M.; FLORES, R. Combining tolerant species and microorganisms for phytoremediation in aluminium-contaminated areas. **International Journal of Environmental Studies**, v. 77, n. 1, p.1-14, 2019.
- MISHRA, N.; KHAN, S. S.; SUNDARI, S. Native isolate of *Trichoderma*: a biocontrol agent with unique stress tolerance properties. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p.1-23, 2016.
- MONTEIRO, J. G.; CRUZ, F. J. R.; NARDIN, M. B.; E SANTOS, D. M. M. Crescimento e conteúdo de prolina em plântulas de guandu submetidas a estresse osmótico e à putrescina exógena. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 18-25, 2014.
- MORAES, N. J.; COSTA NETO, V.; ARAUJO, A.; FIGUEIREDO, M.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C. *Bradyrhizobium* sp. inoculation ameliorates oxidative protection in cowpea subjected to long-term composted tannery sludge amendment. **European Journal of Soil Biology**, v. 76, p. 35-45, 2016.
- MOUSTAKA, J.; OUZOUNIDOU, G.; BAYÇU, G.; MOUSTAKAS, M. Aluminum resistance in wheat involves maintenance of leaf Ca²⁺ and Mg²⁺ content, decreased lipid peroxidation and Al accumulation, and low photosystem II excitation pressure. **Biometal**, v. 29, n. 4, p. 611-623, 2016.
- MUHAMMAD, N.; ZVOBGO, G.; FU, L. WA, L.; WALABA, J. L.; ZHANG, G. Physiological mechanisms for antagonistic interaction of manganese and aluminum in barley. **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, p. 466-476, 2019.

- MUNNS, R.; GILLIHAM, M. Salinity tolerance of crops - What is the cost? **New Phytologist**, v. 208, p. 668-673, 2015.
- MWEETWA, A. M.; CHILOMBO, G.; GONDWE, B. M. Nodulation, Nutrient Uptake and Yield of Common bean inoculated with *Rhizobia* and *Trichoderma* in an acid soil. **Journal of Agricultural Science**, v. 8, n. 12, p. 61-71, 2016.
- NIETO-JACOBO, M. F.; STEYAERT, J. M.; SALAZAR-BADILLO, F. B.; NGUYEN, D. V.; ROSTÁS, M.; BRAITHWAITE, M.; SOUZA, J.T.; JIMENEZ-BREMONT, J. F.; OHKURA, M.; STEWART, A.; MENDOZA-MENDOZA, A. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-18, 2017.
- ORHAN, F. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 621-627, 2016.
- PANHWAR, Q. A.; OTHMAN, R.; JUSOP, S.; NAHER, U.; HAKEEM, K.; ISMAIL, M.; ARIFFIN, N. Aluminum toxicity-induced alterations in the leaf proteome of rice contrasting response towards inoculation of plant growth-promoting bacteria. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 10, p. 1-11, 2017.
- PARNELL, J. J.; BERKA, R.; YOUNG, H. A.; STURINO, J. M.; KANG, Y.; BARNHART, D. M.; DILEO, M. V. From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1-12, 2016.
- PELAGIO-FLORES, R.; ESPARZA-REYNOSO, S.; GARNICA-VERGARA, A.; LÓPEZ-BUCIO, J.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-13, 2017.
- PEREIRA FILHO, I. A.; BORGHI, E. **Sementes de milho no Brasil: a dominância dos transgênicos**. Sete Lagoas/MG: Embrapa Milho e Sorgo, p. 223, 2018.
- RESENDE, M. L.; OLIVEIRA, J. A.; GUIMARÃES, R. M.; VON, R. G. P.; VIEIRA, A. R. Inoculação de sementes de milho utilizando o *Trichoderma harzianum* como promotor de crescimento. **Ciência Agrotécnica**, v. 28, n. 4, p. 793-798, 2004.
- ROUPHAEL, Y.; CARDARELLI, M.; COLLA, G. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in alleviating the adverse effects of acidity and aluminium toxicity in zucchini squash. **Scientia Horticulturae**, v. 188, p. 97-105, 2015.
- RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; VICENTE, R.; GÓMEZ-ACOSTA, F.A.; MORCUENDE, R.; MONTE, E.; BETTIOL, W. The combination of *Trichoderma harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-14, 2017.
- SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M.S.L.; SURAVAJHALA, P.; KAVI KISHOR, P.B. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: Tailoring plants to suit to acid soils. **BioMetals**, v. 29, n. 2, p. 187-210, 2016.
- SANTANDER, C.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M.; OLAVE, J.; CARTES, P.; BORIE, F.; CORNEJO, P. Arbuscular mycorrhiza effects on plant performance under osmotic stress. **Mycorrhiza**, v. 27, p. 639-657, 2017.
- SCHMITT, M.; WATANABE, T.; JANSEN, S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. **AoB Plants**, v. 8, p. 1-13, 2016.
- SHARMA, R. L.; ABRAHAM, S.; BHAGAT, R.; MISHRA, T.; PRAKASH, O. Evaluation of chickpea varieties treated with bio inoculants for yield performance, disease resistance and adaptability to climatic conditions of gariyaband district in Chhattisgarh. **Legume Research**, v. 41, n. 1, p. 57-59, 2018.
- SILVA, L. V.; OLIVEIRA, S.; AZEVEDO, L.; RODRIGUES, A.; BONIFACIO, A.; Coinoculation with *Bradyrhizobium* and *Trichoderma* alleviates the effects of salt stress in cowpea. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 2, p. 336-344, 2019a.
- SILVA, C. M. S.; CAVALHEIRO, M. F.; BRESSAN, A. C. G.; CARVALHO, B. M. O.; BANHOS, O. F. A. A.; PURGATTO, E.; HARAKAVA, R.; TANAKA, F. A. O.; HABERMANN, G. Aluminum-induced high IAA concentration may explain the Al susceptibility in *Citrus limonia*. **Plant Growth Regulation**, v. 87, n. 1, p.123-137, 2019b.

- SINGH, S.; TRIPATHI, D. K.; SHARMA, S.; DUBEY, N. K.; CHAUHAN, D. K.; VACULÍK, M. Toxicity of aluminium on various levels of plant cells and organism: A review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 177-193, 2017.
- SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401-419, 2015.
- TABALDI, L. A.; CARGNELUTTI, D.; GONÇALVES, J. F.; PEREIRA, L. B.; CASTRO, G. Y.; MALDANER, J.; RAUBER, R.; ROSSATO, L. V.; BISOGNIN, D. A.; SCHETINGER, M. R.; NICOLOSO, F. T. Oxidative stress is an early symptom triggered by aluminum in Al-sensitive potato plantlets. **Chemosphere**, v. 76, n. 85, p. 1402-1409, 2009.
- TANDZI, L. N.; MUTENGWA, C.; NGONKEU, E.; GRACEN, V. Breeding maize for tolerance to acidic soils: a Review. **Agronomy**, v. 8, p. 1-21, 2018.
- VALADARES-INGLIS, M. C.; MARTINS, I.; SILVA, J.; MELLO, S. Seleção *in vitro* de linhagens de *Trichoderma* para controle da podridão-branca do alho e da cebola. Brasília: EMBRAPA, p. 334, 2018.
- VENTURI, V.; KEEL, C. Signaling in the Rhizosphere. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 3, p. 187-198, 2016.
- VOS, C. M. F.; CREMER, K.; CAMMUE, B. P. A.; CONINCK, B. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, p. 400-412, 2015.
- WANG, H.; LI, Y.; HOU, J.; HUANG, J.; LIANG, W. Nitrate reductase-mediated nitric oxide production alleviates Al-induced inhibition of root elongation by regulating the ascorbate-glutathione cycle in soybean roots. **Plant and Soil**, v. 410, p. 453-465, 2017.
- YASMEEN, R.; SIDDIQUI, Z. S. Physiological responses of crop plants against *Trichoderma harzianum* in saline environment. **Acta Botanica Croatica**, v. 76, p. 154-162, 2017.
- YASMEEN, R.; SIDDIQUI, Z. S. Ameliorative effects of *Trichoderma harzianum* on monocot crops under hydroponic saline environment. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 1, p. 1-14, 2018.
- YUSUF, M.; KHAN, T. A.; FARIDUDDIN, Q. Responses of photosynthesis, stress markers and antioxidants under aluminium, salt and combined stresses in wheat cultivars. **Cogent Food Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2016.
- ZAIDI, N. W.; DAR, M. H.; SINGH, S.; SINGH, U. S. *Trichoderma* Species as abiotic stress relievers in plants. **Biotechnology and Biology of Trichoderma**, v. 38, p. 515-525, 2014.
- ZHANG, F.; GE, H.; ZHANG, F.; GUO, N.; WANG, Y.; CHEN, L.; JI, X.; LI, C. Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 100, p. 64-74, 2016.
- ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588-1597, 2015.
- ZHU, J. K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Plant Cell**, v. 167, n. 2, p. 313-324, 2016.
- ZIOLA-FRANKOWSKA, A.; FRANKOWSKI, M. Speciation analysis of aluminium in plant parts of *Betula pendula* and in soil. **Journal of Environmental Sciences**, v. 65, p. 153-161, 2018.

CAPITULO I

Crescimento e pigmentos fotossintéticos em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* e expostas ao estresse por alumínio

RESUMO

O excesso de alumínio é uma condição estressante frequentemente presente em solos ácidos e que afeta o crescimento e a produtividade vegetal. O objetivo do presente estudo foi avaliar as respostas de crescimento e as alterações nos níveis de pigmentos fotossintéticos em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* e expostas ao alumínio em condições de casa de vegetação. Sementes de milho foram germinadas e, em seguida, transplantadas em vasos contendo areia lavada e autoclavada. Na semeadura, a inoculação foi realizada, separadamente, com os isolados T01, T02, T74, T76 ou T96 de *T. asperelloides*. Após apresentarem estágio fenológico V6 (seis folhas desenvolvidas), as plantas foram expostas a níveis crescentes de cloreto de alumínio (0, 50, 100, 150 e 200 μM de AlCl_3). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $5 \times 5 + 1$, sendo cinco níveis de AlCl_3 , cinco isolados fúngicos e um controle absoluto (planta não inoculada). As plantas de milho inoculadas com isolados de *T. asperelloides* apresentaram alterações significativas na taxa de crescimento absoluto, no comprimento das raízes, na massa seca da parte aérea, raízes e total e na relação entre a massa seca da parte aérea e das raízes em resposta aos níveis crescentes de alumínio. Além disso, houve redução significativa no teor de clorofilas (a, b e total) e aumento na concentração de carotenoides e antocianinas nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* e expostas ao alumínio. Em relação às plantas não inoculadas e não expostas ao alumínio, as plantas inoculadas com *T. asperelloides* apresentaram aumento nos parâmetros relacionados com o crescimento e no teor de pigmentos fotossintéticos, com destaque para as plantas inoculadas com os isolados T01 ou T02. Conclui-se que o *T. asperelloides* resultou em efeitos positivos no crescimento e nos teores de pigmentos fotossintéticos no milho submetidas ao estresse por alumínio, principalmente quando os isolados T01, T02 ou T76 foram utilizados.

Palavra-chave: biomassa, clorofila, carotenoides, estresses abióticos.

ABSTRACT

Excess aluminum is a stressful condition often present in acidic soils and affects plant growth and yield. The objective of the present study was to evaluate growth responses and changes in photosynthetic pigment levels in maize plants inoculated with *Trichoderma asperelloides* and exposed to aluminum under greenhouse conditions. Maize seeds were germinated and then transplanted in pots containing washed and autoclaved sand. At sowing, inoculation was carried out separately with *T. asperelloides* T01, T02, T74, T76 or T96 isolates. After presenting a V6 phenological stage (six developed leaves), the plants were exposed to increasing levels of aluminum chloride (0, 50, 100, 150 and 200 μM of AlCl_3). The experimental design was completely randomized in a $5 \times 5 + 1$ factorial scheme, with five levels of AlCl_3 , five fungal isolates and one absolute control (uninoculated plant). Maize plants inoculated with *T. asperelloides* isolates showed significant changes in the absolute growth rate, in the root length, in the dry mass of the shoot, roots and total and the relationship between shoot and root dry mass in response to increasing aluminum levels. In addition, there was a significant reduction in chlorophyll content (a, b and total) and an increase in carotenoid and anthocyanin concentration in plants inoculated with *T. asperelloides* and exposed to aluminum. In relation to plants not inoculated and not exposed to aluminum, plants inoculated with *T. asperelloides* showed increase in the parameters related to growth and the content of photosynthetic pigments, especially those inoculated with isolates T01 or T02. It was concluded that *T. asperelloides* resulted in positive effects on growth and photosynthetic pigment contents in maize subjected to aluminum stress, especially when isolates T01, T02 or T76 were used.

Keywords: biomass, chlorophyll, carotenoids, abiotic stresses.

1. INTRODUÇÃO

As interações sinérgicas entre as plantas e os microrganismos benéficos, bactérias e fungos, estabelecidas na rizosfera são importantes para uma adequada fertilidade do solo e produtividade vegetal (KUZYAKOV; BLAGODATSKAYA, 2015; FIGUEIREDO et al., 2016). O *Trichoderma* é um fungo benéfico largamente conhecido pela sua ação antagônica contra fitopatógenos (JUNGES et al., 2016; YASMEEN et al., 2018) e tem sido utilizado com sucesso, em escala comercial, para controle biológico de vários fitopatógenos, com destaque para *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* (EL-KOMY et al., 2015). *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. viride* são as principais espécies de *Trichoderma* comercializadas como agentes de controle biológico (RUBIO et al., 2017). Além disso, pesquisas com plantas inoculadas com *Trichoderma* mostram que este fungo pode incrementar a biomassa e a produtividade vegetal e mitigar os estresses abióticos.

O uso do *Trichoderma* como mitigador de estresses abióticos tem sido demonstrado em algumas espécies vegetais. Plantas de pepino, arroz e milho inoculadas com *T. asperellum* apresentam estímulo do crescimento e aumento da tolerância ao estresse salino (ZHAO; ZHANG, 2015; YASMEEN; SIDDIQUI, 2018). Em tomate, a inoculação com *Trichoderma* alivia os efeitos prejudiciais do estresse pelo frio (GHORBANPOUR et al., 2018). Segundo Chepsergon et al. (2014), as espécies vegetais podem ter a tolerância à seca aumentada com a inoculação com isolados de *Trichoderma*. Harman et al. (2019) relatam que plantas expostas a estresses exibem níveis mais altos de clorofila e outros pigmentos fotossintéticos quando inoculadas com *Trichoderma*. Embora respostas positivas da inoculação de plantas com *Trichoderma* em condições de estresses abióticos sejam relatadas, estudos com o estresse por alumínio ainda são escassos.

O excesso de alumínio é um estresse abiótico que provoca restrição na produção agrícola em todo o mundo, especialmente em solos ácidos (MUHAMMAD et al., 2019). Cerca de 50% das terras aráveis do mundo são ácidas e 67% destes solos encontram-se com problemas de toxicidade por alumínio (SCHMITT et al., 2016) que podem causar perdas de 25 a 80% no rendimento agrícola (SADE et al., 2016). O alumínio induz efeitos adversos ao ser absorvido pelas plantas (JAISWAL et al., 2018) e a rápida inibição do alongamento radicular é o sintoma inicial da toxicidade ao excesso de alumínio (TANDZI et al., 2018). Com a atrofia do sistema radicular, a

captação de água e nutrientes são negativamente influenciadas (SADE et al., 2016). Em monocotiledôneas, o alumínio é notadamente mais fitotóxico e causa inibição do crescimento, tal como já registrado em plantas de arroz, trigo, milho e centeio (YUSUF et al., 2016; PELAGIO-FLORES et al., 2017; HE et al., 2019).

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal com alto valor energético e relevante papel socioeconômico devido a sua grande diversidade de aplicações, e a produção brasileira ocupa o terceiro lugar em no cenário mundial de produção desta cultura (CONAB, 2019). De acordo com Coelho et al. (2019), o milho é uma cultura sensível ao excesso de alumínio no solo, principalmente em solos ácidos. As situações estressantes, naturais ou resultantes de práticas agrícolas incorretas, causam interferência em processos morfológicos e fisiológicos das plantas e impactam negativamente na produtividade das culturas (ZHU, 2016). O uso de microrganismos benéficos tem se destacado como uma estratégia para atenuar situações de estresse (ROMAGNOLI; ANDREOTE, 2016). Diante o exposto, o presente estudo objetivou avaliar as alterações no crescimento e teor de pigmentos fotossintéticos em plantas de milho inoculadas com cinco diferente isolados de *T. asperelloides* e expostas a níveis crescentes de alumínio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de implantação do experimento

O experimento foi implantado e conduzido em condições de casa de vegetação do Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Natureza pertencente a Universidade Federal do Piauí (UFPI; Teresina/PI).

2.2 Obtenção dos microrganismos e preparo do inoculante

Os isolados T01, T02, T74, T76 e T96 de *T. asperelloides* utilizados neste estudo foram obtidos do acervo de microrganismos da empresa JCO Indústria e Comércio de Fertilizantes (Barreiras/BA) (Tabela 1). Os isolados fúngicos foram crescidos em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias a 28 °C em câmara de crescimento. Após as colônias fúngicas atingirem o máximo de crescimento, foi adicionado água destilada estéril às placas de Petri e os conídios foram suspensos com auxílio de um bastão de vidro. Em seguida, a suspensão

conidial foi filtrada com uso de gaze. Finalmente, a concentração do inoculante fúngico de cada isolado de *T. asperelloides* foi padronizado para 10^5 conídios mL⁻¹.

Tabela 1. Informações gerais acerca dos isolados de *Trichoderma asperelloides* selecionados para o presente estudo.

Isolados	Hospedeiro e/ou substrato	Local de coleta
T01	Endofítico de bananeira	Bom Jesus da Lapa/BA
T02	Endofítico de bananeira	Bom Jesus da Lapa/BA
T74	Solo com cultivo de soja	Brasília/DF
T76	Solo com cultivo de hortaliças	Piracicaba/SP
T96	Solo com cultivo de milho	Uruçuí/PI

2.3 Condução e coleta dos dados

Sementes de milho, genótipo AG-1051, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% (60") e então lavadas sucessivamente com água destilada. Após desinfestadas, as sementes foram semeadas em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido e mantidas em câmara de crescimento (27 °C) até o momento da protrusão da radícula (germinação). Posteriormente, as sementes pré-germinadas foram cuidadosamente transferidas para vasos plásticos contendo 3,5 kg de areia lavada (pH 6,5) e autoclavada (120 °C; 101 kPa; 1 h) e então inoculadas no sulco de plantio com 1,0 mL do inoculante fúngico de um dos isolados de *T. asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96).

Durante o período experimental, as plantas foram irrigadas, de forma alternada, com água destilada autoclavada e solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com pH 6,5. A aplicação da solução nutritiva se deu a cada dois dias e foi aplicada até ocorrer a drenagem na parte inferior do vaso visando garantir a total percolação da solução nutritiva. Quando as plantas atingiram o estágio fenológico V6 (seis folhas desenvolvidas), realizou-se a aplicação do estresse por alumínio. Neste momento, as plantas passaram a ser irrigadas com água destilada autoclavada ou solução nutritiva adicionada de cloreto de alumínio (AlCl₃) nas seguintes concentrações: 0, 50, 100, 150 e 200 µM durante sete dias. Aos 35 dias após a inoculação, procedeu-se a coleta do material vegetal.

Na ocasião da coleta, mensurou-se a altura das plantas e o comprimento de raízes com auxílio de uma fita métrica. Após a pesagem da massa fresca da parte aérea e raízes, o material vegetal foi levado, separadamente, para a estufa de aeração forçada a 65 °C, até atingir peso constante, para determinar a massa seca da parte

aérea (MSPA) e raízes (MSR). Com base nos dados de altura de plantas e massa seca calculou-se a taxa de crescimento absoluto e a relação MSPA/MSR (BENINCASA, 2003). Adicionalmente, amostras frescas de folhas foram coletadas, congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer -80 °C até o momento da quantificação dos pigmentos fotossintéticos (clorofilas, carotenoides e antocianinas).

Para determinar a concentração de clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides, amostras frescas foram extraídas com etanol 80% e então lidas em espectrofotômetro a 646, 664 e 470 nm. Após a mensurar as absorvâncias, utilizou-se as equações propostas por Lichtenthale e Wellburn (1983) para calcular os valores da concentração de clorofilas (*a* e *b*) e carotenoides. A clorofila total foi obtida pela soma da concentração de clorofila *a* e *b*. Para quantificar a concentração de antocianinas, amostras foliares foram extraídas com metanol-HCl 0,1% e então lidas em espectrofotômetro a 530 nm. Após a mensurar a absorvância, a concentração de antocianinas foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 30 mM⁻¹ cm⁻¹ (GITELSON et al., 2001).

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5 + 1, sendo cinco níveis de cloreto de alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃), cinco inoculantes fúngicos (os isolados T01, T02, T74, T76 e T96 de *Trichoderma asperelloides*) e um controle absoluto (planta não inoculada), com cinco repetições. A unidade experimental foi composta de um vaso contendo uma planta de milho. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), precedido de teste F, ao nível de 5% de probabilidade. Para avaliar o efeito das doses crescentes do cloreto de alumínio, utilizou-se análise de regressão (linear ou polinomial), enquanto que os isolados foram testados, em cada nível, pelo teste de Duncan (ao nível de 5% de probabilidade). Adicionalmente, as plantas inoculadas com *T. asperelloides* foram comparadas com o controle absoluto (plantas não inoculadas) na ausência do alumínio (nível zero). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico R Studio 3.5 (pacote ExpDes).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Análise exploratória dos dados

No presente estudo, as plantas de milho inoculadas com isolados de *T. asperelloides* (T01, T02, T74, T76 e T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3) exibiram alterações significativas nos parâmetros de crescimento e de pigmentos fotossintéticos (Apêndice 1). Conforme mostrado na figura 1A, as plantas inoculadas com os isolados T02 ou T74 de *T. asperelloides* apresentaram incremento nos parâmetros de crescimento em resposta aos níveis crescentes de alumínio, principalmente quando expostas à 50 μM de AlCl_3 , e se destacaram entre os demais (Figura 1). Em contrapartida, as plantas inoculadas com o isolado T76 de *T. asperelloides* e expostas ao estresse por alumínio (50 a 200 μM de AlCl_3) apresentaram, de modo geral, valores dos parâmetros de crescimento inferiores ao controle.

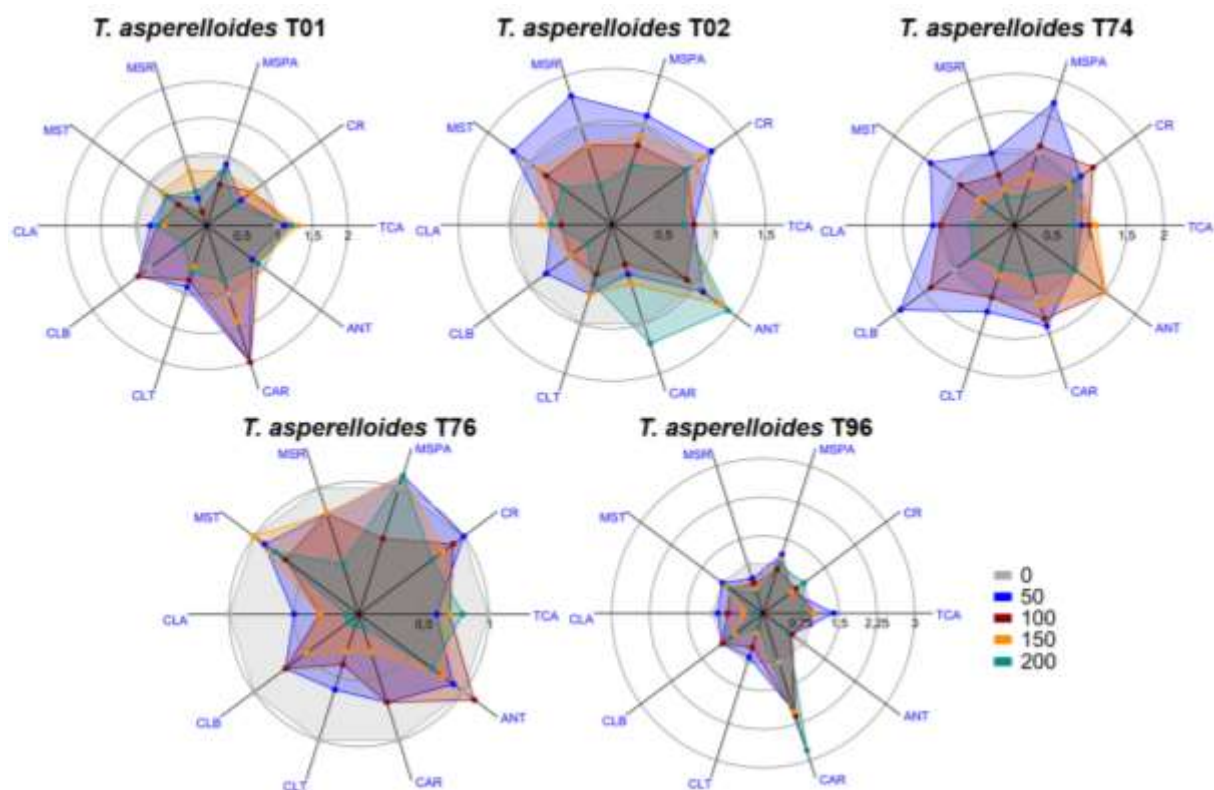


Figura 1. Gráfico de radar mostrando o efeito do estresse por alumínio (0, 50, 100, 150 e 200 μM de AlCl_3) nos parâmetros de crescimento e dos pigmentos fotossintéticos de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96). TCA = taxa de crescimento absoluto. MSPA, MSR e MST = massa seca da parte aérea, das raízes e total, respectivamente. RPAR = relação MSPA/MSR. CR = comprimento das raízes. CLA, CLB e CLT = clorofila a, b e total, respectivamente. CAR = carotenoides. ANT = antocianina.

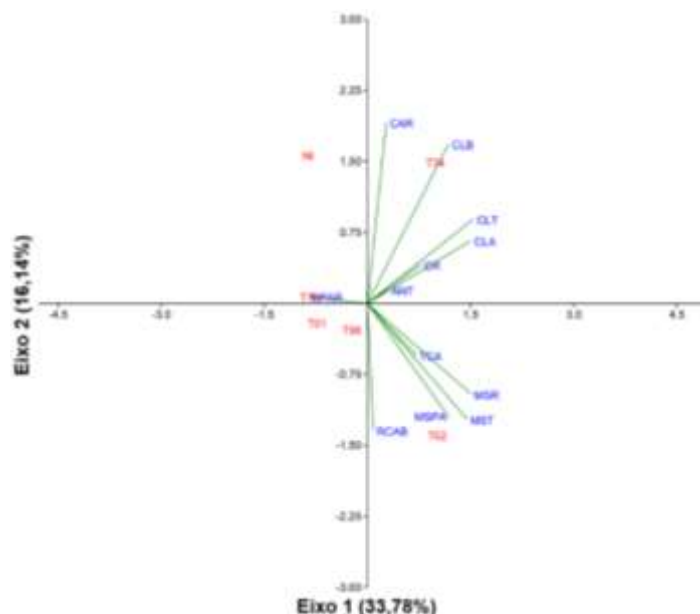


Figura 2. Análise de componentes principais dos dados obtidos nas plantas não inoculadas (NI) e nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* e submetidas ao estresse por alumínio. TCA = taxa de crescimento absoluto. MSPA, MSR e MST = massa seca da parte aérea, das raízes e total, respectivamente. RPAR = relação MSPA/MSR. CR = comprimento das raízes. CLA, CLB e CLT = clorofila a, b e total, respectivamente. RCAB = relação clorofila a/clorofila b. CAR = carotenoides. ANT = antocianina.

De acordo com a análise de componentes principais (APC), as plantas não inoculadas diferenciam-se daquelas inoculadas com *T. asperelloides* em relação a variação nos parâmetros de crescimento e na concentração foliar de pigmentos fotossintéticos (Figura 2). Os dois componentes principais explicam a variabilidade nos dados originais (49,92%). Analisando o componente 1 da APC (eixo 1), nota-se que as plantas inoculadas com *T. asperelloides* T02 apresentaram maiores valores dos parâmetros de crescimento e de pigmentos fotossintéticos, principalmente no tocante aos valores de massa seca das raízes, clorofila a e total. Em relação ao componente 2 da APC (eixo 2), registrou-se que as plantas não inoculadas apresentaram os menores valores dos parâmetros de crescimento e de pigmentos fotossintéticos e se destacaram em relação aos valores médios de carotenoides e clorofila b (Figura 2).

3.2 Respostas de crescimento

As plantas de milho inoculadas com isolados de *T. asperelloides* (T01, T02, T74, T76 e T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio apresentaram alterações significativas na taxa de crescimento absoluto (Figura 3). A taxa de

crescimento absoluto reflete a velocidade de crescimento de uma planta em um determinado período de tempo (BENINCASA, 2003). Houve aumento linear na taxa de crescimento absoluto das plantas de milho inoculadas com o isolado T01 de *T. asperelloides* em resposta ao incremento das concentrações de alumínio ($R^2 = 0,88$), enquanto que nas plantas inoculadas com o isolado T02 houve redução linear ($R^2 = 0,90$) neste parâmetro (Apêndice 4). Quando expostas 150 μM de AlCl_3 , as plantas de milho inoculadas com o isolado T01 ou T74 de *T. asperelloides* apresentaram as melhores respostas na taxa de crescimento absoluto; contudo, observa-se um efeito inibitório no crescimento na maior dose (200 μM de AlCl_3) – exceto para as plantas inoculadas com o isolado T01 (Figura 3).

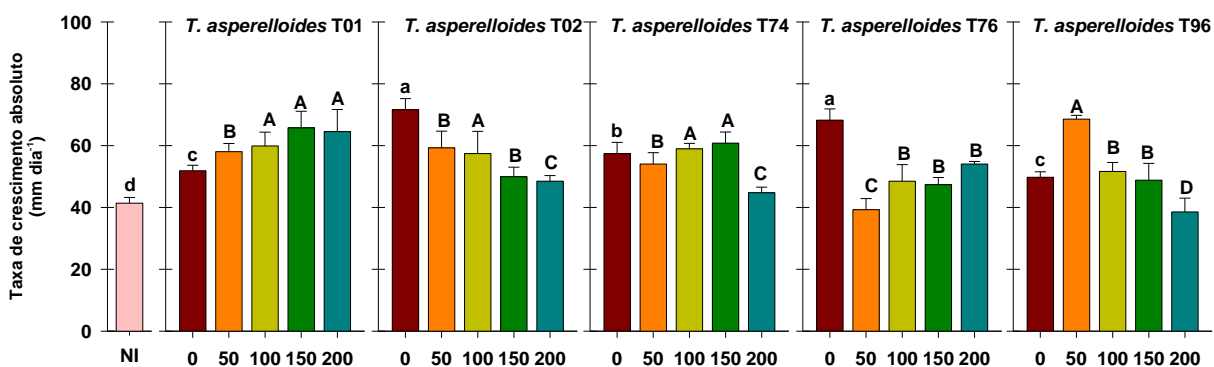


Figura 3. Taxa de crescimento absoluto de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

As plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* na ausência de alumínio apresentaram taxa de crescimento absoluto superior as plantas não inoculadas, com destaque para as plantas inoculadas com o isolado T02 e T76 (Figura 3). Similar ao nosso estudo, Herrera-Téllez et al. (2019) relatam que plantas de tomate tratadas com *T. asperellum* apresentaram aumento de 22% na taxa de crescimento absoluto em relação ao controle. As plantas inoculadas com *T. asperelloides* apresentaram alterações significativas no comprimento das raízes em resposta à inoculação e as doses de alumínio (Figura 4). As plantas de milho inoculadas com o isolado T96 de *T. asperelloides* apresentaram incremento gradativo no comprimento das raízes à medida que a doses de alumínio foram aumentadas e os valores deste parâmetro nas plantas submetidas à 200 μM de AlCl_3 foram similares ao registrado no controle

(Figura 4). Em contrapartida, as plantas inoculadas com o isolado T76 apresentaram redução linear ($R^2 = 0,89$) no comprimento das raízes em resposta ao aumento nos níveis de alumínio (Figura 4). De acordo com Singh et al. (2017), a redução no comprimento das raízes pode ser devido ao acúmulo de alumínio que, por sua vez, suprime o crescimento deste órgão.

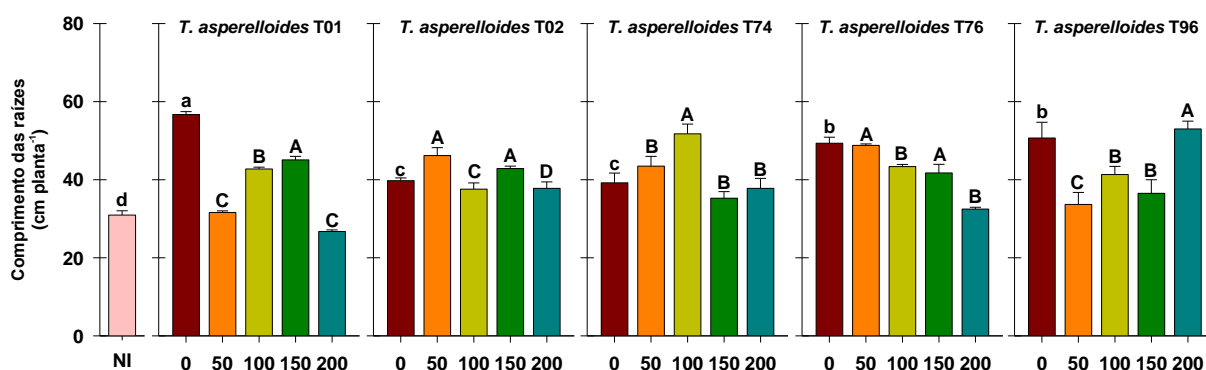


Figura 4. Comprimento das raízes de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 µM de $AlCl_3$). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

Na ausência de alumínio (controle), as plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* foram superiores às plantas não inoculadas, com destaque para as plantas inoculadas com o isolado T01 ou T96 que apresentaram os maiores valores de comprimento de raízes (Figura 4). Os resultados evidenciam que a inoculação com isolados fúngicos de *T. asperelloides* induz melhoria do crescimento radicular de plantas de milho. Respostas positivas da inoculação com *Trichoderma* no crescimento radicular também foram registradas em plantas de soja, milho e cana-de açúcar (FARIAS et al., 2018), melão (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2014) e feijão-caupi (CHAGAS JUNIOR et al., 2014). O maior crescimento das raízes favorece a captação de água e nutrientes e isto pode refletir positivamente no acúmulo de biomassa em plantas tratadas com *Trichoderma* (ESLAHI et al., 2020).

Conforme mostrado na figura 5, as plantas de milho inoculadas com o isolado T02 de *T. asperelloides* apresentaram os maiores valores de massa seca da parte aérea e das raízes em relação aos demais tratamentos e apenas as plantas de milho inoculadas com o isolado T76 apresentaram valores de massa seca da parte aérea similares às plantas não inoculadas (Figura 5A). Além disso, as plantas inoculadas

com *T. asperelloides* T02 se destacaram entre os demais tratamentos por apresentarem aumento de 106% e 30% na massa seca da parte aérea e das raízes, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas com *T. asperelloides* (Figura 5). Em plantas de tomate tratadas com *T. asperellum* registrou-se valores de biomassa 30% maiores que as plantas controle e os autores relacionam estas respostas à capacidade do fungo em estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal (HERRERA-TÉLLEZ et al., 2019).

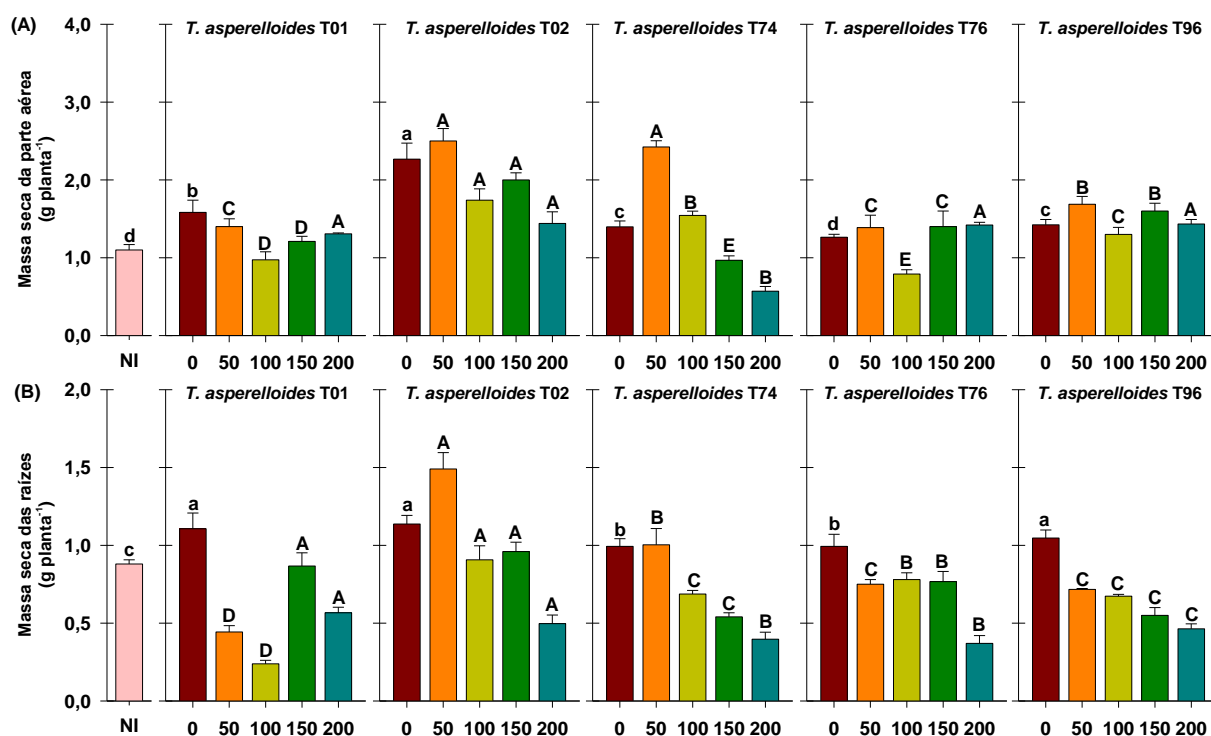


Figura 5. Massa seca da parte aérea (A) e das raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

As plantas inoculadas com o isolado T02 ou T74 exibiram maiores valores de massa seca da parte aérea quando submetidas a 50 µM de AlCl₃, enquanto que aquelas inoculadas com o isolado T02 apresentaram maiores valores de massa seca das raízes neste mesmo tratamento e também quando expostas à 100 µM de AlCl₃ (Figura 5B). As plantas inoculadas com o isolado T02, T74, T76 ou T96 apresentaram redução na massa seca das raízes, com destaque para as plantas inoculadas com o isolado T74 que apresentaram redução linear na massa seca das raízes com o

aumento dos níveis de alumínio ($R^2 = 0,93$). No controle, as plantas inoculadas com os isolados T01, T02 ou T96 apresentaram os maiores valores da massa seca das raízes e foram superiores às plantas não inoculadas e aos demais tratamentos.

Analisando as plantas expostas ao alumínio, nota-se que as plantas de milho inoculadas com o isolado T01 e submetidas à 50 e 100 μM de AlCl_3 , as plantas inoculadas com o isolado T96 e submetidas à 150 μM de AlCl_3 e as plantas inoculadas com o isolado T76 e submetidas à 200 μM de AlCl_3 apresentaram os valores mais altos da relação MSPA/MSR nos respectivos tratamentos (Figura 6). Nas plantas inoculadas com o isolado T96, a relação MSPA/MSR foi incrementada linearmente em resposta ao aumento nas concentrações de alumínio ($R^2 = 0,77$; Apêndice 4). As plantas inoculadas com o isolado T02 apresentaram maior relação MSPA/MSR em relação às plantas não inoculadas na ausência de alumínio (Figura 6). Elevados valores da relação MSPA/MSR podem estar relacionadas com a alta disponibilidade de fosfato solúvel para ser absorvido pelas plantas (DUARTE et al., 2015) tendo em vista que fungos do gênero *Trichoderma* são relatados como eficientes solubilizadores de fosfato (CHAGAS et al., 2015; LI et al., 2015; ZHAO; ZHANG, 2015).

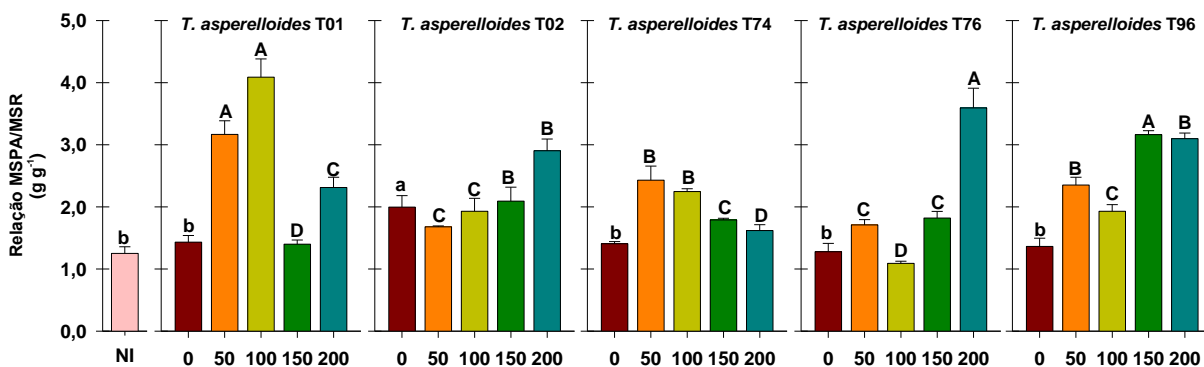


Figura 6. Relação entre massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

3.3 Pigmentos fotossintéticos

Houve efeito significativo dos níveis crescentes de alumínio e da inoculação com os isolados de *T. asperelloides* na concentração de clorofila *a*, *b* e total e na relação clorofila *a/b* (Figuras 7 e 8). O teor de clorofila *a* e *b* em plantas inoculadas com *T. asperelloides* foi reduzido em resposta ao aumento das concentrações de

alumínio, principalmente nas plantas inoculadas com o isolado T76 que apresentaram redução linear nestes parâmetros ($R^2 = 0,89$) (Figura 7). Na ausência de alumínio, as plantas inoculadas com *T. asperelloides* apresentaram teor de clorofila *a* superior as plantas não inoculadas, com destaque para as plantas inoculadas com o isolado T96. Em contrapartida, estas plantas apresentaram menor concentração de clorofila *b* no controle em relação às plantas não inoculadas e aos demais tratamentos (Figura 7B). Resultados similares foram registrados em plantas de milho inoculadas com *T. lixii*, sendo registrada correlação entre os pigmentos fotossintéticos e taxas fotossintéticas melhoradas (PEHLIVAN et al., 2017).

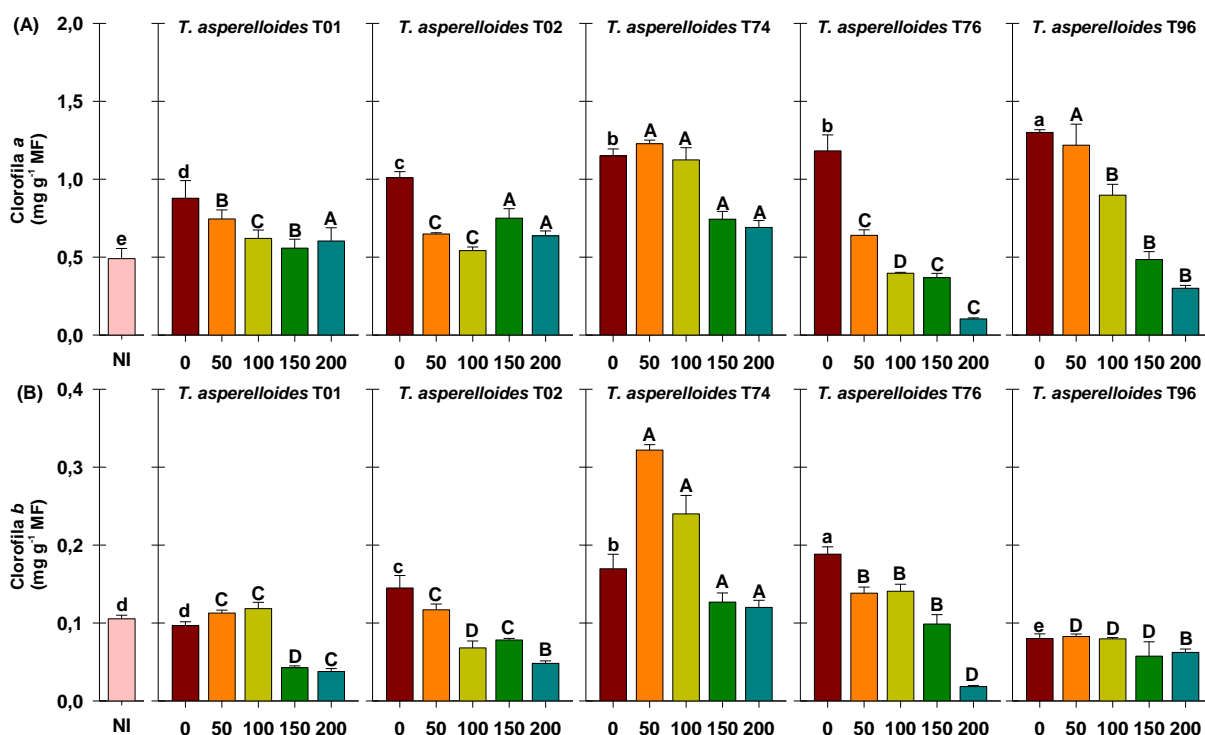


Figura 7. Clorofila *a* (A) e clorofila *b* (B) em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

A inoculação com cepas de *Trichoderma* induz níveis mais altos de clorofila e outros pigmentos fotossintéticos e aumenta as taxas fotossintéticas nas plantas colonizadas, mesmo quando submetidas a situações de estresse (HARMAN et al., 2019). Neste estudo, a clorofila total das plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência de alumínio foi superior ao registrado nas plantas não inoculadas (Figura 8).

No geral, as plantas inoculadas com *T. asperelloides* T74 apresentaram os maiores valores de clorofila total quando expostas ao alumínio. As plantas inoculadas com o isolado T96 se destacaram em relação aos demais tratamentos nos valores da relação clorofila *a/b* quando expostas à 50 e 100 μM de AlCl_3 , enquanto que as plantas inoculadas com o isolado T01 apresentaram os maiores valores deste parâmetro quando expostos à 150 e 200 μM de AlCl_3 . A relação clorofila *a/b* permite perceber a capacidade de adaptação das espécies vegetais às variações ambientais uma vez que a planta aumenta os teores de clorofila *b* em ambientes estressantes (ANDRADE et al., 2012; DOMÍNGUEZ et al., 2016).

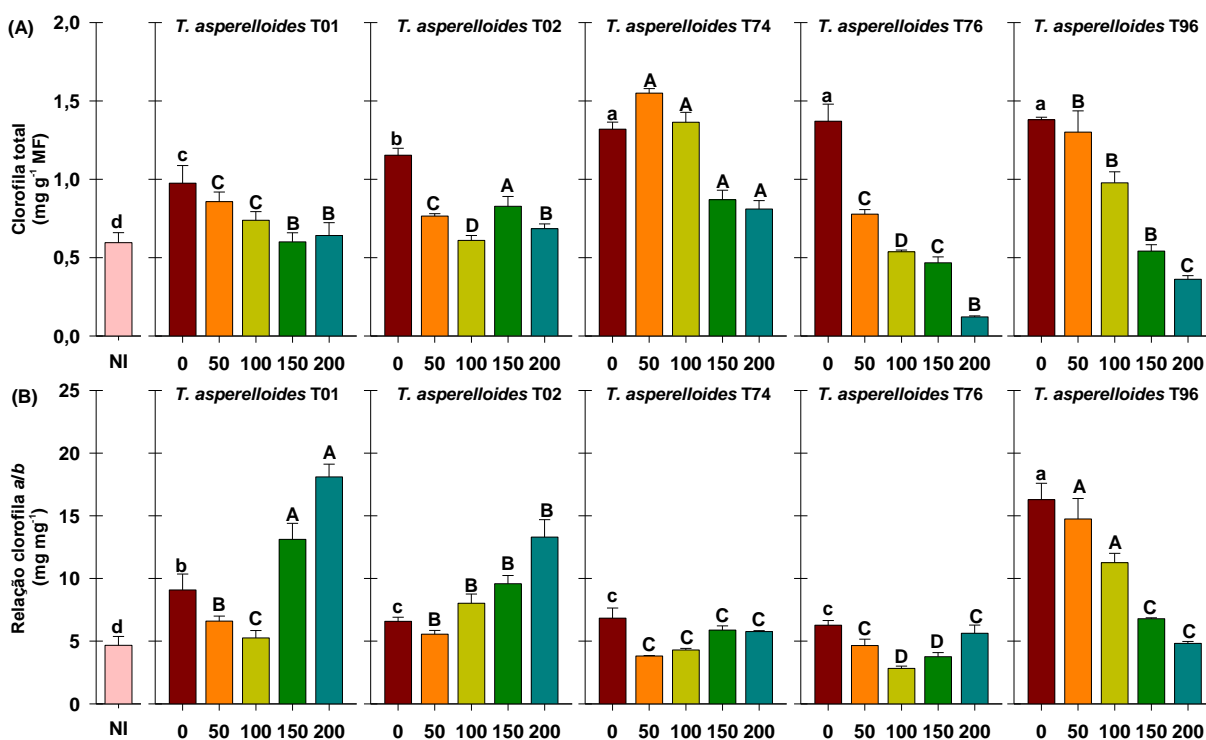


Figura 8. Clorofila total (A) e relação clorofila *a/b* (B) em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

Os carotenoides podem atuar como antioxidantes no metabolismo vegetal, enquanto que o acúmulo de antocianinas pode representar uma estratégia de escape à possíveis danos fotobiológicos às moléculas de clorofila indicando que a planta está exposta à estresses abióticos (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009). Neste estudo, as plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* exibiram redução no teor de carotenoides e

antocianinas em relação a plantas de milho não inoculadas – ambas na ausência de alumínio (Figura 9). Na presença do alumínio, houve declínio no teor de carotenoides nas plantas inoculadas com *T. asperelloides*, exceto nas plantas inoculadas com o isolado T96 que apresentaram aumento neste parâmetro em resposta aos níveis de alumínio e as plantas inoculadas com o isolado T02 e submetidas à 200 μM de AlCl_3 – ambos em comparação ao controle (Figura 9A). Estes resultados indicam que o fungo pode promover as rotas de proteção metabólica em situações estressantes.

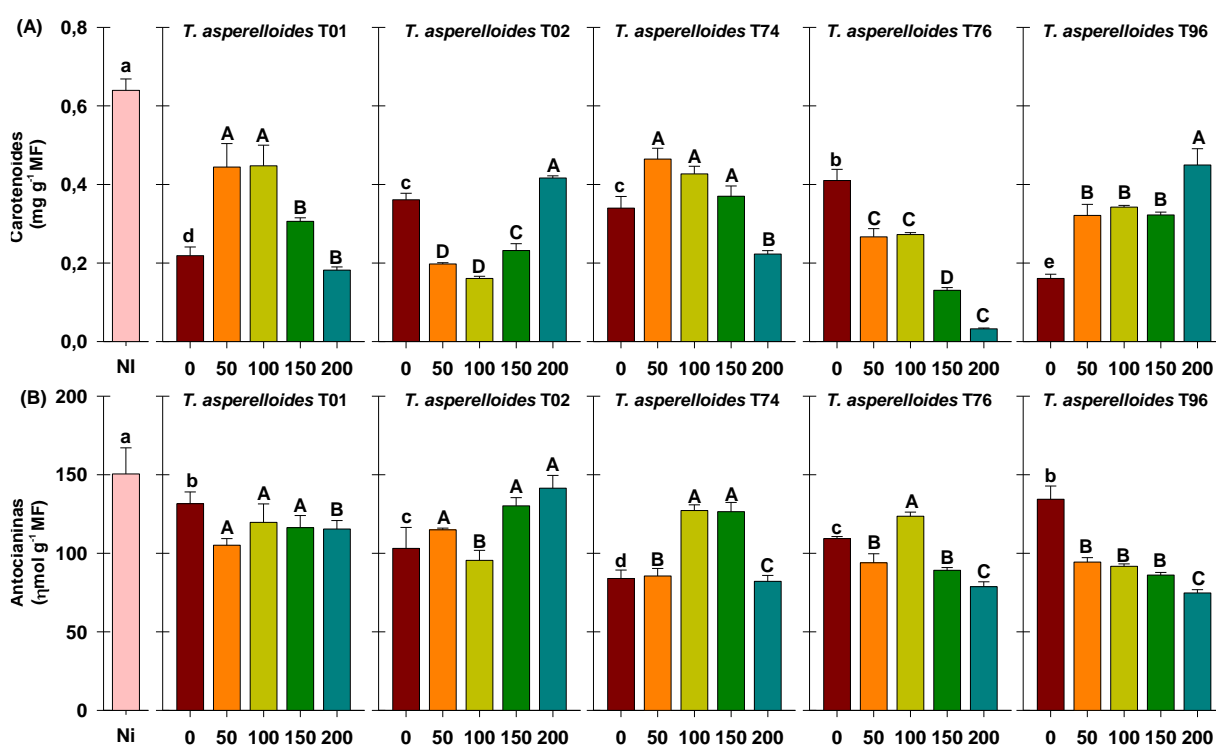


Figura 9. Carotenoides (A) e antocianinas (B) em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

Houve redução linear no teor de antocianinas nas plantas inoculadas com os isolados T76 ($R^2 = 0,35$) e T96 ($R^2 = 0,79$) de *T. asperelloides* em resposta às doses crescentes de alumínio, enquanto que as plantas inoculadas com o isolado T02 exibiram incremento linear ($R^2 = 0,59$) neste parâmetro (Figura 9B; Apêndice 4). As plantas inoculadas com o isolado T96 apresentaram redução de 44% na concentração de antocianinas quando submetida à 200 μM de AlCl_3 (Figura 9B). Nas plantas inoculadas com o isolado T02 de *T. asperelloides* e submetidas a 150 ou 200 μM de

AlCl₃ foi observado acréscimo de 26% e 37%, respectivamente, na concentração de antocianina, enquanto que as plantas inoculadas com o isolado T74 apresentaram aumento de 50% quando submetidas à 100 ou 150 µM de AlCl₃ – ambos em relação ao controle. Plantas não inoculadas exibiram maior concentração de antocianina no controle, enquanto que as plantas inoculadas com o isolado T74 apresentaram os valores mais baixos deste pigmento (Figura 9B). Além de pigmentos, as antocianinas podem atuar como antioxidantes e, portanto, atenuar os efeitos negativos do estresse em processos metabólicos, particularmente na fotossíntese (LANDI, 2015).

4. CONCLUSÃO

A inoculação das plantas de milho com *T. asperelloides*, especialmente com os isolados T01, T02 e T76 de *T. asperelloides*, resultou em efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento das plantas e no teor de pigmentos fotossintéticos, mesmo quando as plantas foram expostas ao estresse por alumínio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, J. R.; NASCIMENTO, R.; MAIA JÚNIOR, S. O.; SILVA, F. V.; BARBOSA, J. W. D. S. Teores de pigmentos fotossintéticos em caupi inoculado com rizóbio e em condições salinas. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 10-13, 2012.
- ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, p.41, 2003.
- CHAGAS JUNIOR, A.; OLIVEIRA, A. G.; REIS, H. B.; SANTOS, GIL. R.; CHAGAS, L. F. B.; MILLER, L. O. Eficiência da inoculação combinada de rizóbio e *Trichoderma* spp. em diferentes cultivares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) no cerrado (Savana Brasileira). **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 1, p. 20-28, 2014.
- CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CARVALHO, M. R.; MILLER, L. O.; COLONIA, B. S. O. Evaluation of the phosphate solubilization potential of *Trichoderma* strains (*Trichoplus* JCO) and effects on rice biomass. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 794-804, 2015.
- CHEPSEY, J.; MWAMBURI, L.; KASSIM, M. K. Mechanism of drought tolerance in plants using *Trichoderma* spp. **International Journal of Science and Research**. v. 3. p. 1592-1595, 2014.
- COELHO, C. J.; BOMBARDELLI, R. G. H.; SCHULZE, G. S.; CAIRES, E. F.; MATIELLO, R. R. Genetic control of aluminum tolerance in tropical maize germplasm. **Bragantia**, v. 1, p. 1-11, 2019.
- CONAB (Companhia Nacional do Abastecimento). **Acompanhamento da safra brasileira**. Quarto levantamento. v. 6, n. 4, p. 126, 2019.
- DOMÍNGUEZ, S.; RUBIO, M. R.; CARDOZA, R. E.; GUTIÉRREZ, S.; NICOLÁS, C.; BETTIOL, W.; HERMOSA, R.; MONTE, E. Nitrogen metabolism and growth enhancement in tomato plants challenged with *Trichoderma harzianum* expressing the *Aspergillus nidulans* acetamidase amdS gene. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, n. 118, p. 1-14, 2016.
- DUARTE, G. M.; CERIBELI, M. G. A.; CARDOSO, A. M.; DORNELLES, M. S.; SOUCHIE, E. L. População de microrganismos solubilizadores de fosfato de cálcio na rizosfera de milho transgênico e

- crioulo, cultivados com solo de agroecossistemas em Urutaí, GO. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, n. 3, p. 1-4, 2014.
- EL-KOMY, M. H.; SALEH, A. A.; ERANTHODI, A.; MOLAN, Y. Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. **Plant Patholol.** J. p.50-60, 2015.
- ESLAHI, N.; KOWSARI, M.; MOTALLEBI, M.; ZAMANI, M. R.; MOGHADASI, Z. Influence of recombinant *Trichoderma* strains on growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L) by increased root colonization and induction of root growth related genes. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 1-13, 2020.
- FARIAS, C. P.; CARVALHO, R. C.; RESENDE, F. M. L.; AZEVEDO, L. C. B. Consortium of five fungal isolates conditioning root growth and arbuscular mycorrhiza in soybean, corn, and sugarcane. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 4, p. 3649-3660, 2018.
- FIGUEIREDO, M. V. B.; BONIFACIO, A.; RODRIGUES, A. C.; ARAUJO, F.; STAMFORD, N. P. Beneficial microorganisms: Current challenge to increase crop performance. In: **Bioformulations: for Sustainable Agriculture**, Springer, New Delhi. p. 53-70, 2016.
- GHORBANPOUR, A.; SALIMI, A.; GHANBARY, M. A. T.; PIRDASHTI, H.; DEHESTANI, A. The effect of *Trichoderma harzianum* in mitigating low temperature stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. **Scientia Horticulturae**, v. 230, p.134-141, 2018.
- GITELSON, A. A.; MERZLYAK, M. N.; ZUR, Y.; STARK, R.; GRITZ, U. Non-destructive and remote sensing techniques, for estimation of vegetation status. **Proceedings, Third European Conference on Precision Agriculture**, v. 1, p. 205-210, 2001.
- HARMAN, G. E.; DONI, F.; KHADKA, R. B.; UPHOFF, N. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-18, 2019.
- HE, H.; LI, Y.; HE, L. F. Aluminum toxicity and tolerance in Solanaceae plants. **South African Journal of Botany**, v. 123, p. 23-29, 2019.
- HERRERA-TÉLLEZ, V. I.; CRUZ-OLMEDO, A. K.; PLASENCIA, J.; GAVILANES-RUÍZ, M.; ARCE-CERVANTES, O.; HERNÁNDEZ-LEÓN, S.; SAUCEDO-GARCÍA, M. The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-13, 2019.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.I. **The waterculture method for growing plants without soil**. Circular n. 347, Agricultural Experiment Station, California, 1950.
- JAISWAL, S. K.; NAAMALA, J.; DAKORA, F. D. Nature and mechanisms of aluminium toxicity, tolerance and amelioration in symbiotic legumes and *rhizobia*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 54, n. 3, p. 309-318, 2018.
- JUNGES, E.; MUNIZ, M. F.; MEZZOMO, R.; BASTOS, B.; MACHADO, R. T. *Trichoderma* spp. na produção de mudas de espécies florestais. **Floresta e Ambiente**, v. 23, p. 237-244, 2016.
- KUZYAKOV, Y.; BLAGODATSKAYA. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & Review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 83, p. 184-199, 2015.
- LANDI, M. Can anthocyanins be part of the metal homeostasis network in plant? **American Journal of Agriculture and Biological Science**, v. 10, p. 170-177, 2015.
- LI, R. X.; CAI, F.; PANG, G.; SHEN, Q. R.; LI, R.; CHEN, W. Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1-16, 2015.
- LICHTENTHALER, H.; WELLBURN, A. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, n. 603, p. 591-592, 1983.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ALGUACIL, M. M.; PASCUAL, J.; VAN WEES, S. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 7, p. 804-815, 2014.
- MUHAMMAD, N.; ZVOBGO, G.; FU, L. WA, L.; WALABA, J.L.; ZHANG, G. Physiological mechanisms for antagonistic interaction of manganese and aluminum in barley, **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, p. 466-476, 2019.

- PEHLIVAN, N.; YESILYURT, A. M.; DURMUS, N.; KARAOGLU, S. A. *Trichoderma lixii* ID11D seed biopriming mitigates dose dependent salt toxicity in maize. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, p. 1-12, 2017.
- PELAGIO-FLORES, R.; ESPARZA-REYNOSO, S.; GARNICA-VERGARA, A.; LÓPEZ-BUCIO, J.; HERRERA-ESTRELLA, A. *Trichoderma*-induced acidification is an early trigger for changes in *Arabidopsis* root growth and determines fungal phytostimulation. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-13, 2017.
- ROMAGNOLI, E. M.; ANDREOTE, F. D. Rizosfera. In: **Microbiologia do solo**. Piracicaba: ESALQ, p. 221, 2016.
- RUBIO, M. B.; HERMOSA, R.; VICENTE, R.; GÓMEZ-ACOSTA, F.A.; MORCUENDE, R.; MONTE, E.; BETTIOL, W. The combination of *Trichoderma harzianum* and chemical fertilization leads to the deregulation of phytohormone networking, preventing the adaptive responses of tomato plants to salt stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-14, 2017.
- SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M. S. L.; SURAVAJHALA, P.; KAVIKISHOR, P. B. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: Tailoring plants to suit to acid soils. **BioMetals**, v. 29, n. 2, p. 187-210, 2016.
- SCHMITT, M.; WATANABE, T.; JANSEN, S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. **AoB Plants**, v. 8, p.1-13, 2016.
- SINGH S.; TRIPATHI D. K.; SINGH S.; SHARMA S.; DUBEY N. K.; CHAUHAN D. K.; VACULÍK, M. Toxicity of aluminum on various levels of plant cells and organism: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 177-193, 2017.
- TANDZI, L.N.; MUTENGWA, C.; NGONKEU, E.; GRACEN, V. Breeding Maize for Tolerance to Acidic Soils: A Review. **Agronomy**, v. 8, p. 1-21, 2018.
- YASMEEN, R.; SIDDIQUI, Z. S. Ameliorative effects of *Trichoderma harzianum* on monocot crops under hydroponic saline environment. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 1, p. 1-14, 2018.
- YUSUF, M.; KHAN, T. A.; FARIDUDDIN, Q. Responses of photosynthesis, stress markers and antioxidants under aluminium, salt and combined stresses in wheat cultivars. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2016.
- ZHAO, L.; ZHANG, Y. Q. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 8, p. 1588-1597, 2015.
- ZHU, J. K. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313-324, 2016.

CAPITULO II

**Compostos orgânicos e inorgânicos em plantas de milho inoculadas com
Trichoderma asperelloides e submetidas ao excesso de alumínio**

RESUMO

Trichoderma é um microrganismo benéfico capaz de promover o crescimento das plantas e mitigar situações de estresses bióticos e abióticos. O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações nos solutos inorgânicos e orgânicos e no nitrogênio total em folhas e raízes de plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* e expostas ao alumínio. Sementes de milho foram germinadas e então transplantadas em vasos contendo areia lavada e autoclavada. No transplante, a inoculação foi realizada, separadamente, com os isolados T01, T02, T74, T76 ou T96 de *T. asperelloides*. Após apresentarem seis folhas desenvolvidas, as plantas de milho foram estressadas com solução adicionada de cloreto de alumínio nas seguintes concentrações: 0, 50, 100, 150 e 200 μM de AlCl_3 . O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial $5 \times 5 + 1$, sendo cinco níveis de AlCl_3 , cinco isolados fúngicos e um controle absoluto (planta não inoculada). Os níveis de compostos inorgânicos e orgânicos foram alterados significativamente nas plantas inoculadas e expostas ao alumínio. Verificou-se incremento nos teores de amônia e sódio nas raízes de plantas inoculadas com *T. asperelloides*, enquanto que o teor de potássio foi superior nas plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas, com destaque para plantas inoculadas com isolados T01 e T76. Houve incremento significativo na concentração de aminoácidos solúveis totais, prolina livre e carboidratos solúveis totais nas plantas inoculadas em resposta ao alumínio. O teor de proteínas solúveis, amido e de nitrogênio total foi superior nas plantas inoculadas, principalmente quando os isolados T01, T76 e T96 foram utilizados. Conclui-se que a inoculação com *T. asperelloides*, com destaque para os isolados T01, T76 e T96, alivia os efeitos negativos do alumínio nas plantas de milho por induzir alterações significativas na concentração de compostos inorgânicos e orgânicos que contribuem com o custo energético do enfrentamento do estresse.

Palavra-chave: Solutos compatíveis, microrganismo benéfico, metais pesados, milho.

ABSTRACT

Trichoderma is a beneficial microorganism capable of promoting plant growth and mitigating situations of biotic and abiotic stresses. The present study aimed to evaluate the changes in inorganic and organic solutes and total nitrogen in leaves and roots of maize plants inoculated with *T. asperelloides* and exposed to aluminum. Maize seeds were germinated and then transplanted in pots containing washed and autoclaved sand. In the transplant, the inoculation was performed, separately, with isolates T01, T02, T74, T76 or T96 from *T. asperelloides*. After presenting six developed leaves, the plants were stressed with a solution of aluminum chloride in the following doses: 0, 50, 100, 150 and 200 μM of AlCl_3 . The experimental design was completely randomized in a $5 \times 5 + 1$ factorial scheme, with five levels of AlCl_3 , five fungal isolates and one absolute control (uninoculated plant). The levels of inorganic and organic compounds were significantly altered in inoculated plants exposed to aluminum. There was an increase in the ammonia and sodium contents in the roots of *T. asperelloides* inoculated plants, while the potassium content was higher in inoculated plants. In relation to uninoculated plants, especially plants inoculated with isolates T01 and T76. There was a significant increase in the concentration of total soluble amino acids, free proline and total soluble carbohydrates in inoculated plants in response to aluminum. Soluble protein, starch and total nitrogen content was higher in inoculated plants, especially when isolates T01, T76 and T96 were used. In conclusion, inoculation with *T. asperelloides*, with emphasis on isolates T01, T76 and T96, alleviates the negative effects of aluminum on maize plants by inducing significant changes in the concentration of inorganic and organic compounds that contribute to the energy cost of maize in coping with stress.

Keyword: Compatible solutes, beneficial microorganism, heavy metals.

1. INTRODUÇÃO

Os estresses abióticos, tais como seca, salinidade, frio, calor e excesso de alumínio, são variações ambientais complexas que restringem a produção agrícola no mundo (PANDEY et al., 2019). O alumínio (Al) é um metal presente no solo e o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre e, quando se apresenta em quantidades excessivas, provoca inibição no crescimento das plantas – principalmente em solos ácidos (CHOUDHURY; SHARMA, 2014; KARAK et al., 2015; MUHAMMAD et al., 2019). Em todo mundo, cerca de 50% das terras aráveis são ácidas e 67% destes solos encontram-se com problemas de toxicidade por alumínio (LIN et al., 2012; SCHMITT et al., 2016) que pode causar perdas de 25 a 80% no rendimento agrícola dependendo da espécie vegetal (SADE et al., 2016).

A rizosfera é uma porção do solo onde importantes associações simbióticas são estabelecidas. É na rizosfera que microrganismos benéficos são recrutados, através dos sinais secretados pelas raízes, na busca de aumentar a resistência ou tolerância aos estresses bióticos ou abióticos e, portanto, estimular o crescimento e desenvolvimento vegetal (ROMAGNOLI; ANDREOTE, 2016; ZHANG et al., 2017). Os fungos do gênero *Trichoderma* são microrganismos com propriedades benéficas para as espécies vegetais. Segundo Verma et al. (2016), a presença do *Trichoderma* estimula a taxa fotossintética e induz incremento na biomassa vegetal através da liberação de fitormônios e aprimoramento dos sistemas de defesa das plantas às condições ambientais adversas. Além disso, liberam compostos orgânicos voláteis que permitem melhor assimilação de água e nutrientes (NIETO-JACOBO et al., 2017).

A inoculação com *T. harzianum* induz diferenças significativas no crescimento da parte aérea e raízes de plantas de alho e cebola e ainda o controle da podridão-branca (VALADARES-INGLIS et al., 2018). O tratamento das sementes de morangueiro com *Trichoderma* proporcionou o maior acúmulo de biomassa fresca e seca e incremento no diâmetro do coroa dos frutos (RICHTER et al., 2019), enquanto que a inoculação com *Trichoderma* favorece a emergência de sementes e o crescimento de espécies arbóreas florestais (JUNGES et al., 2016) e o desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular de gramíneas (BORTOLIN et al., 2019). Estes estudos relatam efeitos positivos da inoculação com *Trichoderma* em condições não estressantes, entretanto seu papel mitigador de situações de estresses abióticos ainda é insipiente.

Os fungos do gênero *Trichoderma* são capazes de liberar fitormônios, tais como auxinas e giberelinas (MARTÍNEZ-MEDINA et al., 2014) e de solubilizar fosfato (OLIVEIRA et al., 2012; FRANÇA et al., 2017). Além disso, estes fungos apresentam capacidade de atuar como eficazes biosorventes metálicos (MALDANER et al., 2019) e, portanto, são especialmente interessantes no cultivo de plantas em solos ácidos e contaminados por metais pesados (MISHRA et al., 2017). Considerando a importância do *Trichoderma* e a crescente busca de alternativas ecologicamente corretas que mitiguem situações estressantes, o presente estudo objetivou avaliar as alterações na concentração de solutos inorgânicos e orgânicos e no teor de nitrogênio total em folhas e raízes de plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* e expostas a níveis crescentes de alumínio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de implantação do experimento

O experimento foi implantado e conduzido em condições de casa de vegetação do Departamento de Biologia do Centro de Ciências da Natureza (UFPI; Teresina/PI).

2.2 Obtenção dos microrganismos e preparo do inoculante

Os isolados de *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 e T96) utilizados neste estudo foram obtidos do acervo de microrganismos da empresa JCO Indústria e Comércio de Fertilizantes (Barreiras/BA) (Tabela 1). Os isolados foram crescidos em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) por sete dias (28 °C). Após as colônias fúngicas atingirem o máximo de crescimento, foi adicionado água destilada estéril às placas de Petri e os conídios foram suspensos e então a suspensão conidial foi filtrada. Finalmente, a concentração do inoculante fúngico de cada isolado de *T. asperelloides* foi padronizado para 10⁵ conídios mL⁻¹.

Tabela 1. Informações gerais acerca dos isolados de *Trichoderma asperelloides* selecionados para o presente estudo.

Isolados	Hospedeiro e/ou substrato	Local de coleta
T01	Endofítico de bananeira	Bom Jesus da Lapa/BA
T02	Endofítico de bananeira	Bom Jesus da Lapa/BA
T74	Solo com cultivo de soja	Brasília/DF
T76	Solo com cultivo de hortaliças	Piracicaba/SP
T96	Solo com cultivo de milho	Uruçuí/PI

2.3 Condução e coleta dos dados

Sementes de milho, genótipo AG-1051, foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2% (60") e, posteriormente, lavadas com água destilada. Após desinfestadas, as sementes foram semeadas em placas de Petri contendo papel de filtro umedecido e mantidas em câmara de crescimento (27 °C) até a protrusão da radícula (germinação). Após germinadas, as sementes foram cuidadosamente transferidas para vasos contendo 3,5 kg de areia lavada (pH 6,5) e autoclavada (120 °C; 101 kPa; 1 h) e então inoculadas no sulco de plantio, separadamente, com 1,0 mL do inoculante fúngico de cada isolado de *T. asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96).

Durante o período experimental, as plantas foram irrigadas, de forma alternada, com água destilada autoclavada e solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com pH 6,5. A aplicação da solução nutritiva se deu a cada dois dias e foi aplicada até ocorrer a drenagem na parte inferior do vaso visando garantir a total percolação da solução nutritiva. Quando as plantas estavam no estágio fenológico V6 (seis folhas desenvolvida), realizou-se a aplicação do estresse por alumínio. Neste momento, as plantas passaram a ser irrigadas com água destilada autoclavada ou solução nutritiva adicionada de cloreto de alumínio (AlCl_3) nas seguintes concentrações: 0, 50, 100, 150 e 200 μM durante sete dias. Aos 35 dias após a inoculação, procedeu-se a coleta do material vegetal e amostras de folhas e raízes frescas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C até o momento das análises.

Após a obtenção do extrato aquoso (em banho-maria a 95 °C), alíquotas do extrato foram utilizadas para determinar a concentração de carboidratos solúveis totais e amido (DUBOIS et al., 1956), sacarose (VAN HANDEL, 1968), aminoácidos solúveis totais (YEMM; COCKING, 1955), prolina livre (BATES et al., 1973) e proteínas solúveis totais (BRADFORD, 1976). Além disso, também foram mensurados os níveis dos íons amônia livre (WEATHERBURN, 1967), nitrato (CATALDO et al., 1975), sódio e potássio (SARRUGE; HAAG, 1974). O nitrogênio total foi quantificado após a mineralização das amostras vegetais em meio ácido (BAETHGEN; ALLEY, 1989).

2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 5 + 1, sendo cinco níveis de cloreto de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3), cinco inoculantes fúngicos e um controle absoluto (planta não inoculada), com cinco

repetições. A unidade experimental foi composta de um vaso contendo uma planta de milho. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), precedido de teste F, ao nível de 5% de probabilidade. Para avaliar o efeito das doses crescentes do cloreto de alumínio, utilizou-se análise de regressão (linear ou polinomial), enquanto que os isolados foram testados, em cada nível, pelo teste de Duncan ao nível de 5% de probabilidade. Adicionalmente, as plantas inoculadas com *T. asperelloides* foram comparadas com o controle absoluto (plantas não inoculadas) na ausência do alumínio (nível zero). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico R Studio 3.5 (pacote Agriolae).

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Solutos inorgânicos

Plantas de milho apresentaram alterações significativas na concentração dos íons amônia, nitrato, sódio e potássio em resposta a inoculação com *T. asperelloides* e a exposição aos níveis crescentes de alumínio (Figura 1-4). De modo geral, foi possível notar que a concentração de amônia livre foi aumentada na parte aérea de plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* em resposta aos níveis crescentes de alumínio, principalmente quando os isolados T02 ou T76 de *T. asperelloides* foram utilizados (Figura 1A). A concentração de amônia livre na parte aérea das plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* foi inferior ao registrado nas plantas não inoculadas (Figura 1A) e isto indica que estas plantas acumularam mais amônia em seus compartimentos foliares. Já a redução na concentração de amônia livre pode estar relacionada ao incremento do uso deste íon na síntese de aminoácidos e proteínas (RODRIGUES et al., 2013).

Nota-se que a concentração de amônia livre foi superior nas raízes em relação ao quantificado na parte aérea das plantas inoculadas com *T. asperelloides* e submetidas aos níveis crescentes de alumínio. As plantas de milho inoculadas com o isolado T96 de *T. asperelloides* exibiram maiores valores da concentração de amônia livre, enquanto que os menores valores foram registrados nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* T74 (Figura 1B). De modo geral, a concentração de amônia livre nas raízes das plantas inoculadas com os isolados T01, T74 e T76 foi incrementada em resposta ao alumínio, enquanto que nas plantas inoculadas com os isolados T02 ou

T96 de *T. asperelloides* houve uma resposta negativa da concentração radicular de amônia livre frente ao incremento nos níveis de alumínio (Figura 1B). É possível que o acúmulo dos íons amônia apresente efeito mitigador da toxicidade ao alumínio, possivelmente devido a diminuição do acúmulo de alumínio nas raízes e pelas mudanças nas propriedades da parede celular, tal como observado por Zhao et al. (2013) em plantas de arroz.

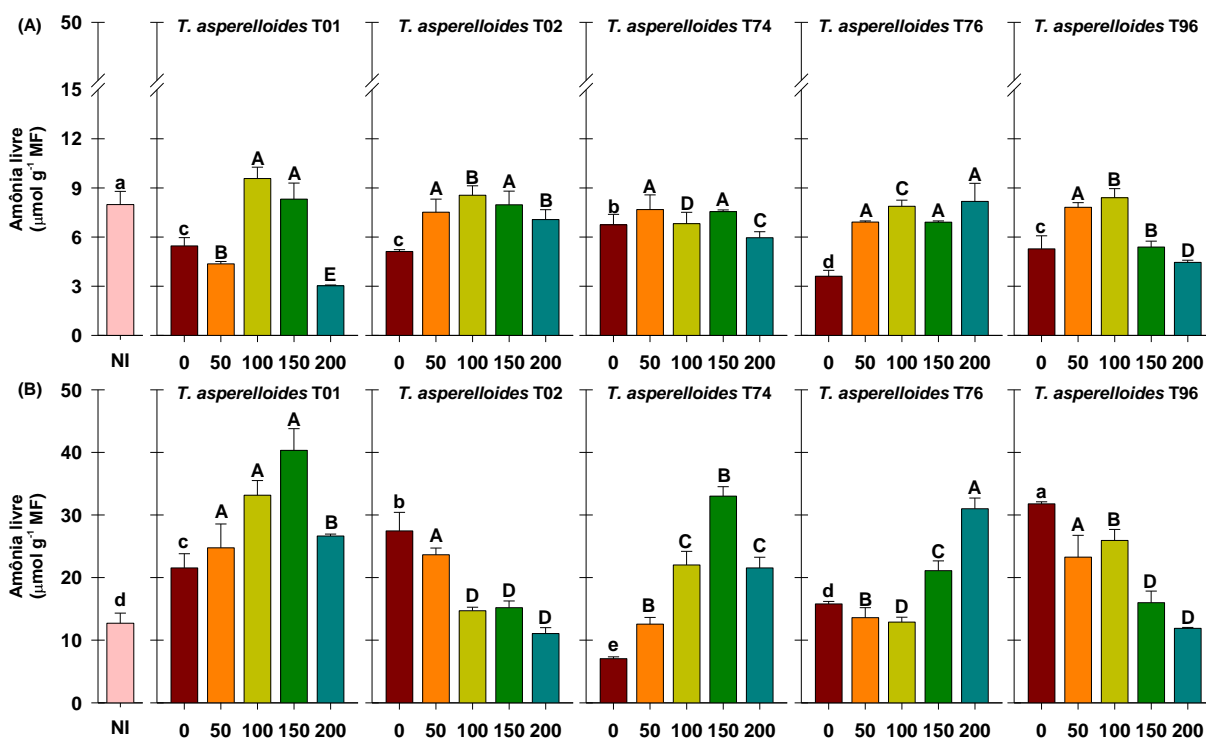


Figura 1. Concentração de amônia livre em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

Após absorvido pelas raízes, os íons nitrato devem ser reduzidos a íons amônio para serem incorporados em inúmeros compostos orgânicos (MAO et al., 2014). Neste estudo, foi observada alterações na concentração de nitrato na parte aérea e raízes de plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* em resposta aos níveis crescentes de alumínio, principalmente nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* T02 (Figura 2). As plantas de milho inoculadas com o isolado T74 de *T. asperelloides* apresentaram os maiores valores de nitrato em relação aos demais tratamentos e às plantas não inoculadas no controle, enquanto que os menores valores foram registrados nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* T76 (Figura 2A). Plantas

tolerantes ao alumínio que crescem em solos ácidos preferem captar íons amônio que íons nitrato, enquanto as que crescem em solos neutros ou calcários e são sensíveis ao alumínio e preferem nitrato ao invés de amônio (MAATHUIS, 2009; ZHAO et al., 2013). A absorção de íons nitrato pelas raízes é acompanhada pela liberação de prótons e diminui o pH na rizosfera (SCHUBERT; YAN, 1997).

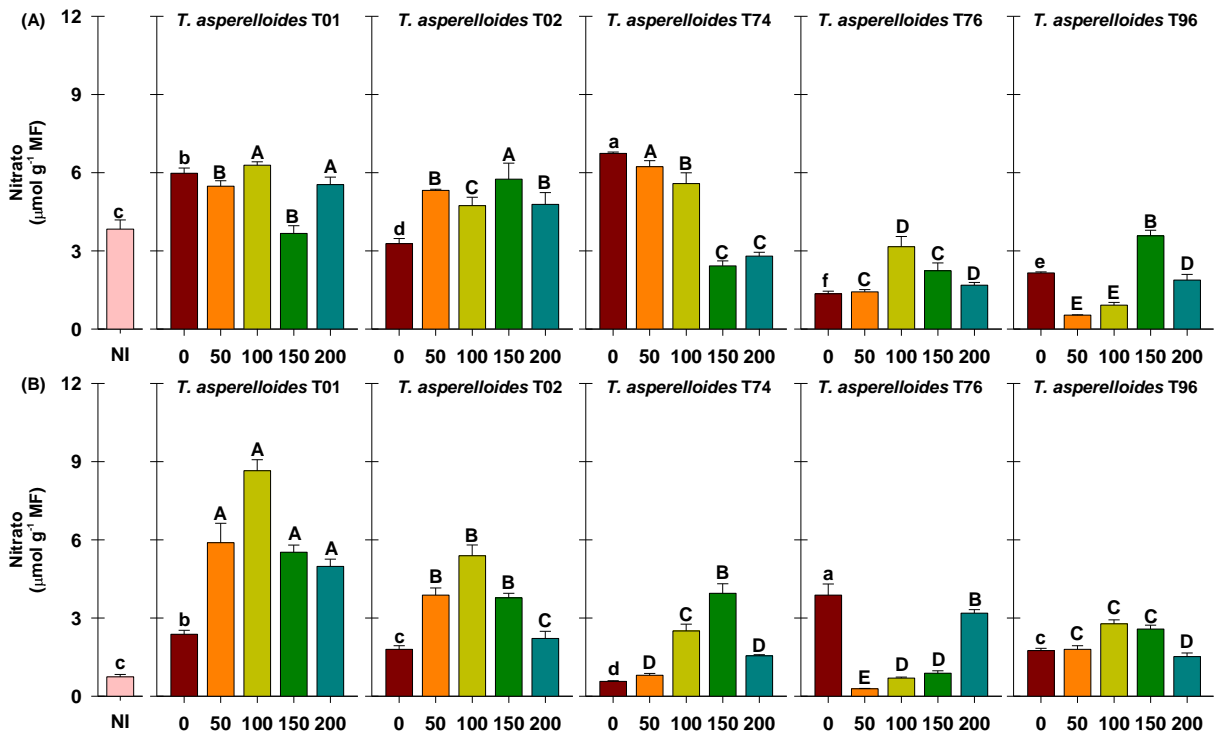


Figura 2. Concentração de nitrato em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

A concentração de nitrato na parte aérea de plantas de milho inoculadas com os isolados T02 e T96 foi aumentada em resposta às doses crescentes de alumínio, enquanto que nas plantas inoculadas com o isolado T74 houve redução polinomial ($R^2 = 0,85$) neste parâmetro (Apêndice 4). Quando 150 µM de AlCl₃ foi aplicado, as plantas inoculadas com o isolado T74 apresentaram acréscimo de 99% na concentração de nitrato nas raízes e houve redução de 36% na concentração deste composto na parte aérea – ambos comparados com as plantas inoculadas com o isolado T74 e não expostas ao alumínio (Figura 2B). Adicionalmente, foi possível observar incremento de 200% na concentração de nitrato nas raízes das plantas inoculadas com o isolado T01 e submetidas a 200 µM de AlCl₃ em relação a plantas na ausência de alumínio.

Conforme mostrado na figura 3, as plantas inoculadas com *T. asperelloides* apresentaram maior teor de sódio nas raízes em relação à parte aérea e a concentração deste íon pouco alterada na parte aérea em resposta ao alumínio. No geral, as plantas inoculadas com o isolado T01 apresentaram os maiores valores médios do teor de sódio em relação aos demais tratamentos em cada nível de alumínio aplicado (Figura 3A). Nas raízes, o teor de sódio foi aumentado em resposta a doses crescentes de alumínio, exceto nas plantas inoculadas com o isolado T02, T76 e T96. As plantas inoculadas com o isolado T96 que apresentaram aumento linear ($R^2=0,87$) no teor de sódio em suas raízes e, quando expostas a 200 μM de AlCl_3 , foi possível observar incremento de 160% no teor deste íon nas raízes em relação às plantas inoculadas com este isolado e não expostas ao alumínio (Figura 3B; Apêndice 4).

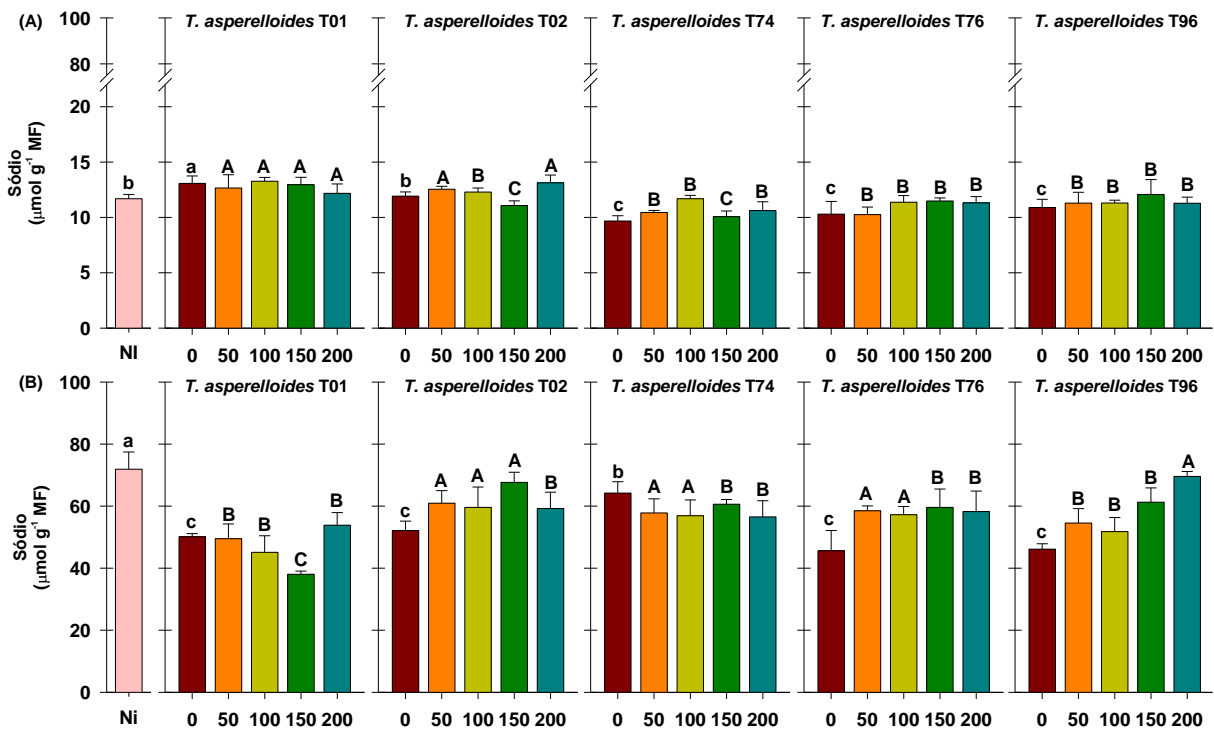


Figura 3. Teor de sódio em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

O íon sódio é um nutriente importante para plantas com metabolismo fotossintético C4, tais como o milho e cana-de-açúcar, e contribui para manutenção da pressão osmótica celular (FAQUIN, 2005). Analisando as plantas com e sem inoculação, observou-se que as plantas inoculadas com o isolado T01 apresentaram

teor de sódio superior aos demais tratamentos na parte aérea (Figura 3A). Em contrapartida, as plantas inoculadas com *T. asperelloides* apresentaram valores de teor de sódio inferiores ao registrado para as plantas não inoculadas. As plantas inoculadas com o isolado T02 e submetidas à 150 μM de AlCl_3 apresentaram os maiores valores do teor de sódio entre as plantas inoculadas *T. asperelloides*, enquanto que as plantas inoculadas com T96 e expostas à 200 μM de AlCl_3 se destacaram entre as demais plantas inoculadas no mesmo nível de alumínio aplicado.

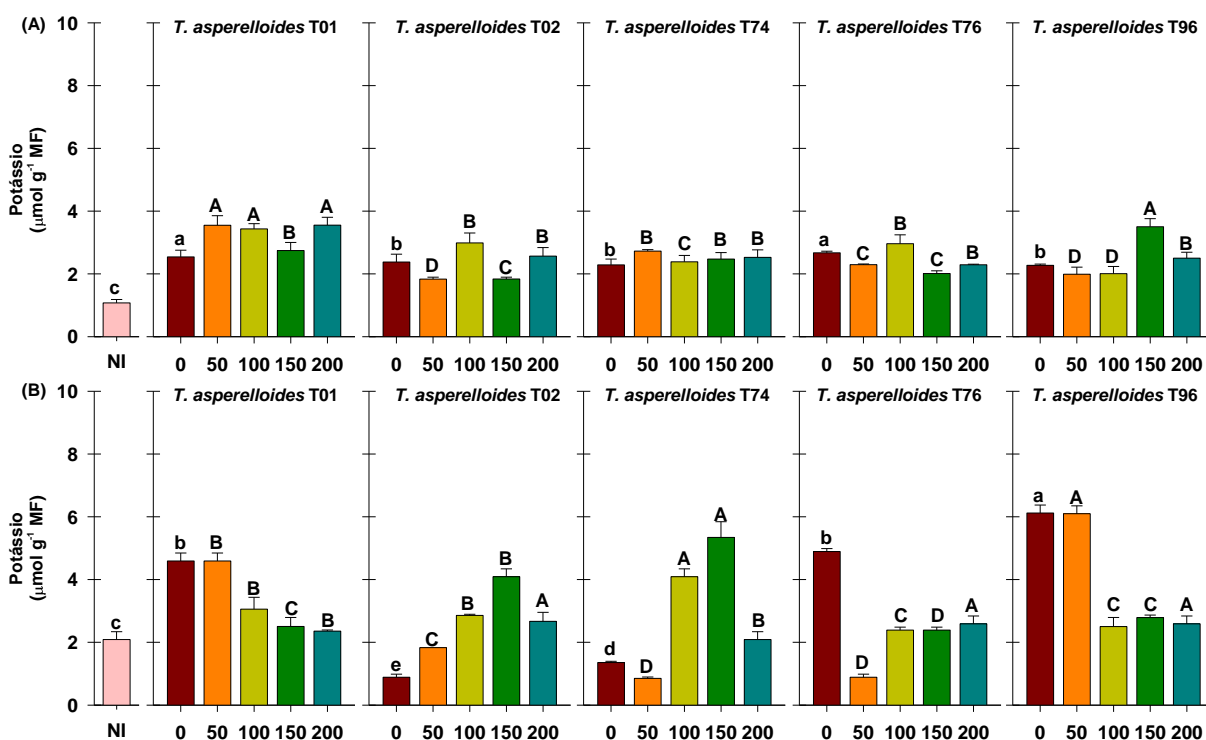


Figura 4. Teor de potássio em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

As plantas de milho inoculadas com os isolados T01 e T74 e submetidas à níveis crescentes de alumínio apresentaram teor de potássio na parte aérea superior ao registrado quando as plantas não foram expostas ao alumínio (Figura 4A). Já nas raízes, o teor de potássio foi aumentado nas plantas inoculadas com os isolados T02 com o incremento nos níveis de alumínio (Figura 4B; Apêndice 4). Em plantas de mostarda inoculadas com *T. harzianum* e cultivadas em condições de salinidade, ocorre aumento na concentração de íons potássio juntamente com redução no teor de íons sódio (AHMAD et al., 2015). O uso de microrganismos endofíticos causa

melhoria no crescimento de plantas submetidas ao estresse salino e isto tem sido relacionado, pelo menos em parte, à diminuição do acúmulo de sódio (HAJIBOLAND et al., 2010; AHMAD et al., 2015).

A concentração do íon potássio na parte aérea e raízes de plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* foi superior ao registrado nas plantas não inoculadas, com destaque para as plantas inoculadas com os isolados T01 e T76 para a parte aérea e plantas inoculadas com T96 para as raízes (Figura 4). Estas respostas podem estar associadas com a importância e atuação do íon potássio em diversas funções metabólicas nas plantas, principalmente em plantas C4, podendo ser encontrado no citoplasma celular, participar da regulação da abertura e fechamento dos estômatos, da fotossíntese, da síntese de proteínas, na ativação de enzimas e ainda contribuir para o particionamento de carboidratos, tais como sacarose, através dos diferentes órgãos vegetais (SOUSA et al., 2014).

3.2 Compostos nitrogenados e de carbono

Foram registradas alterações significativas na concentração de aminoácidos solúveis totais, prolina livre, proteínas solúveis totais, nitrogênio total, carboidratos solúveis totais, sacarose e amido (Figuras 5 a 11) nas folhas e raízes de plantas de milho em resposta a inoculação com *T. asperelloides* e a exposição aos níveis crescentes de alumínio. A exposição aos níveis crescentes de alumínio induziu redução na concentração de aminoácidos solúveis totais na parte aérea de plantas inoculadas com *T. asperelloides* T01 e T74 (Figura 5A). As plantas inoculadas com T02 e T76 apresentam aumento na concentração de aminoácidos solúveis totais quando expostas aos níveis mais altos de alumínio (Figura 5A; Apêndice 4). Em relação às plantas não inoculadas, registrou-se maiores valores de aminoácidos solúveis totais na parte aérea de plantas inoculadas com T01 e nas raízes de plantas inoculadas com T96 (Figura 5). A concentração de aminoácidos solúveis totais nas raízes de plantas inoculadas com T96 e não expostas ao estresse por alumínio foi 121% superior que o registrado para as plantas não inoculadas (Figura 5B).

O aumento na concentração de aminoácidos solúveis totais, principalmente de prolina livre, também observado em situações de seca, pode ser decorrente da diminuição da síntese proteica ou de uma maior degradação de proteínas e pode ajudar a diminuir efeitos negativos do déficit hídrico sobre as plantas (CATALA et al.,

2007; KAUR; ASTHIR, 2015). Em muitas plantas, a prolina livre é acumulada em resposta a exposição às adversidades bióticas ou abióticas, sendo este acúmulo associado à tolerância ao estresse (AHMAD et al., 2015). A prolina livre pode servir como fonte de carbono e nitrogênio para crescimento após alívio do estresse uma vez que pode contribuir para a síntese de proteínas e outros importantes compostos nitrogenados (REJEB et al., 2014; NAHAR et al., 2016). Desta forma, a concentração de prolina livre pode ser um importante parâmetro para a seleção de plantas resistentes aos estresses abióticos (VERBRUGGEN; HERMANS, 2008; HASHEM et al., 2015).

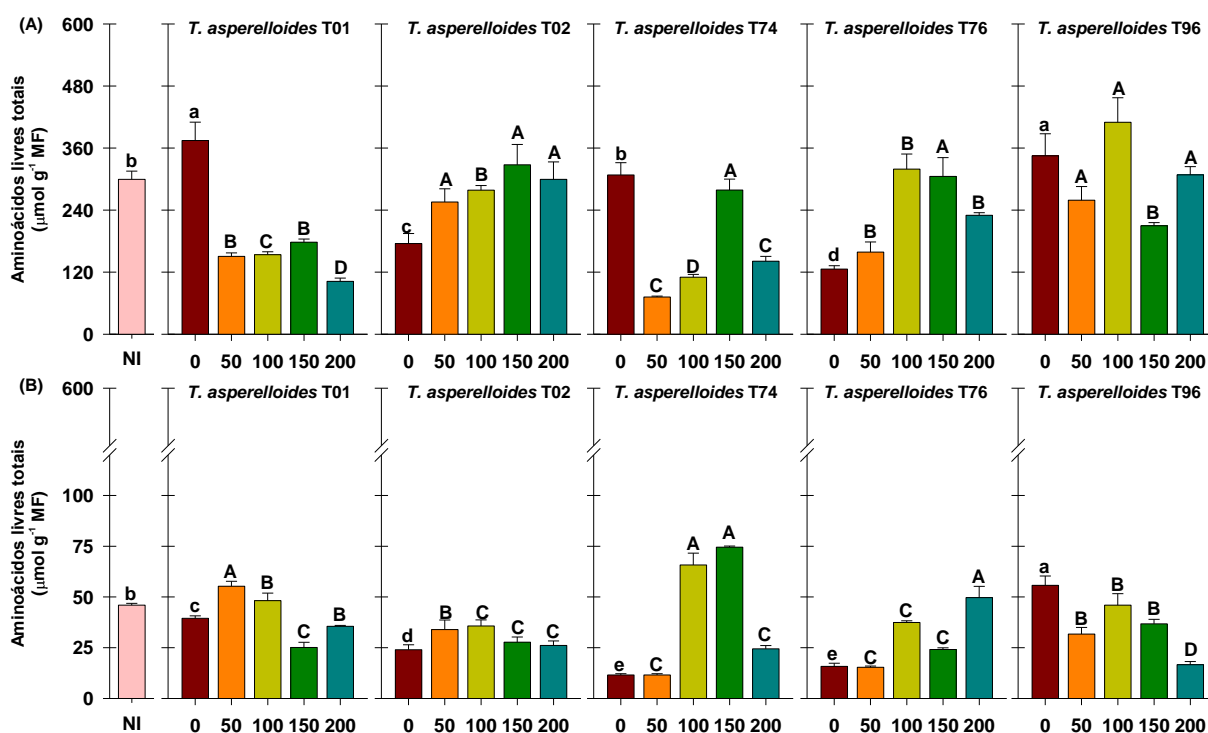


Figura 5. Aminoácidos solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

No presente estudo, as plantas de milho inoculadas com os isolados T01, T74 e T96 apresentaram diminuição na concentração de prolina livre na parte aérea e nas raízes em resposta aos níveis crescentes de alumínio (Figura 6A), enquanto que as plantas inoculadas com o isolado T76 apresentaram aumento nos níveis deste soluto tanto na parte aérea como nas raízes (Figura 6). A redução nos níveis de prolina livre também foi registrada nas raízes de plantas inoculadas com *T. asperelloides* em

relação às plantas não inoculadas (Figura 6B). Adicionalmente, as plantas inoculadas com o isolado T01 e não submetidas ao alumínio apresentaram incremento de 402% na prolina livre na parte aérea em relação às plantas não inoculadas nas mesmas condições. Igualmente ao registrado neste estudo, reduções na prolina livre também foram observadas em plantas inoculadas com bactérias benéficas e crescidas em ambiente estressado com metal pesado (MITRA et al., 2018; PRAMANIK et al., 2018).

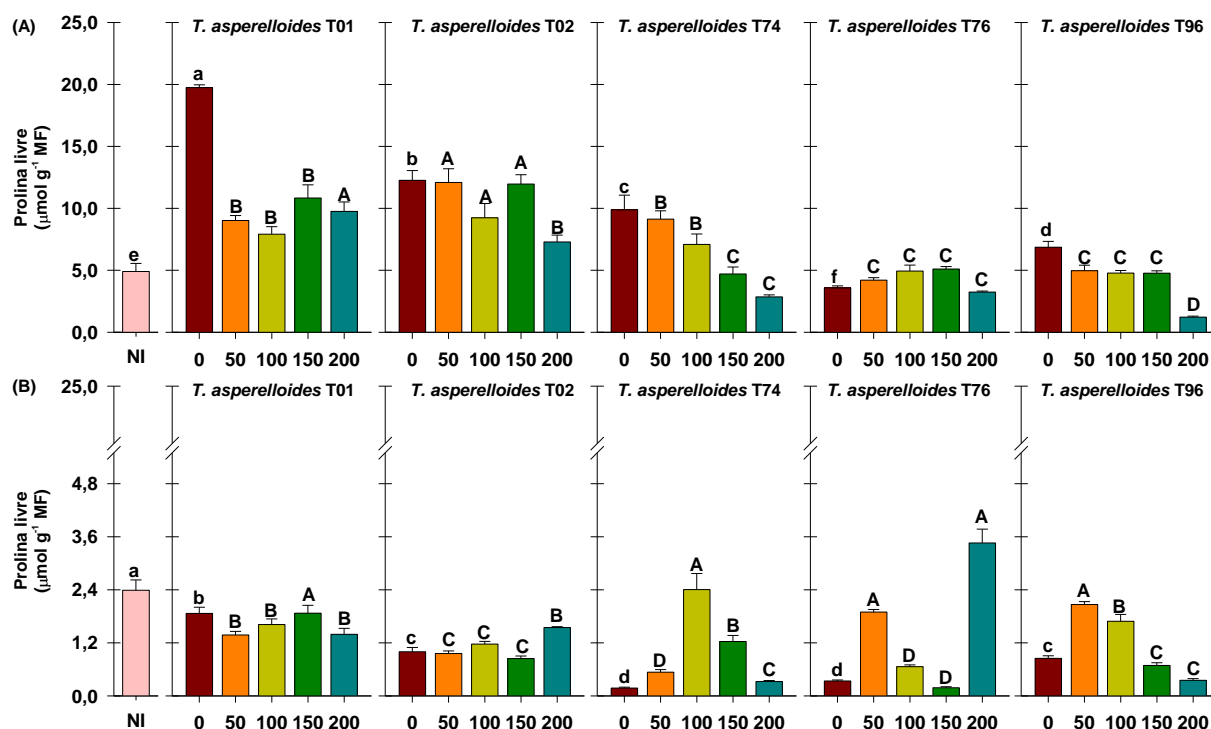


Figura 6. Concentração de prolina livre em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

No geral, tem sido relatado na literatura que elevados teores de prolina livre atenuam os efeitos do estresse hídrico uma vez que este composto tem múltiplas funções, facilita a absorção de água, contribui para a manutenção do equilíbrio osmótico, melhora as atividades das enzimas antioxidativas protegendo do estresse oxidativo e mantém a integridade de membranas e proteínas (SIGNORELLI et al., 2014; IQBAL et al., 2015). No presente estudo, a concentração de proteínas solúveis na parte aérea foi aumentada linearmente nas plantas inoculadas com os isolados T74 ($R^2 = 0,72$) e T76 ($R^2 = 0,67$) em resposta aos níveis crescentes de alumínio (Figura 7A; Apêndice 4). Nas raízes, foi observado redução linear ($R^2 = 0,78$) na

concentração de proteínas solúveis nas plantas inoculadas com o isolado T96 (Figura 7B; Apêndice 4). Estas plantas apresentaram redução de 53% nos níveis de proteínas solúveis quando expostas à 200 μM de AlCl_3 em comparação com as plantas inoculadas com este isolado e não expostas ao alumínio (Figura 7B).

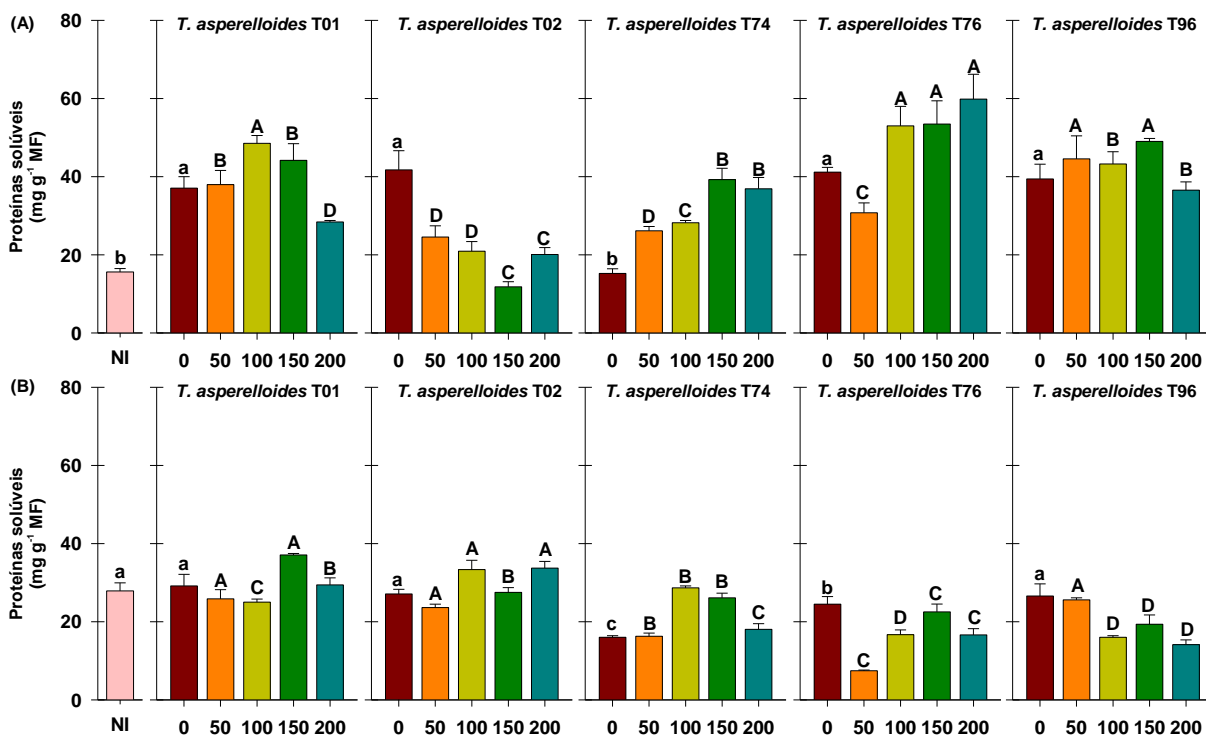


Figura 7. Concentração de proteínas solúveis em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

Ao analisar o efeito da inoculação com *Trichoderma* e da aplicação de alumínio, foi possível notar que plantas inoculadas com T02, T74 e T96 apresentaram respostas negativas no teor de nitrogênio na parte aérea (Figura 8A). De modo geral, as plantas inoculadas apresentaram teor de nitrogênio na parte aérea superior ao observado para as plantas não inoculadas nas mesmas condições experimentais e as plantas inoculadas com T74 e T76 se destacaram entre os demais tratamentos. As plantas inoculadas com o isolado T01 apresentaram maior teor de nitrogênio na parte aérea quando submetido à 100 μM de AlCl_3 e redução de 41% neste parâmetro quando a dose 200 μM de AlCl_3 foi aplicada – ambos quando comparadas as plantas inoculadas e cultivadas na ausência de alumínio (Figura 8A).

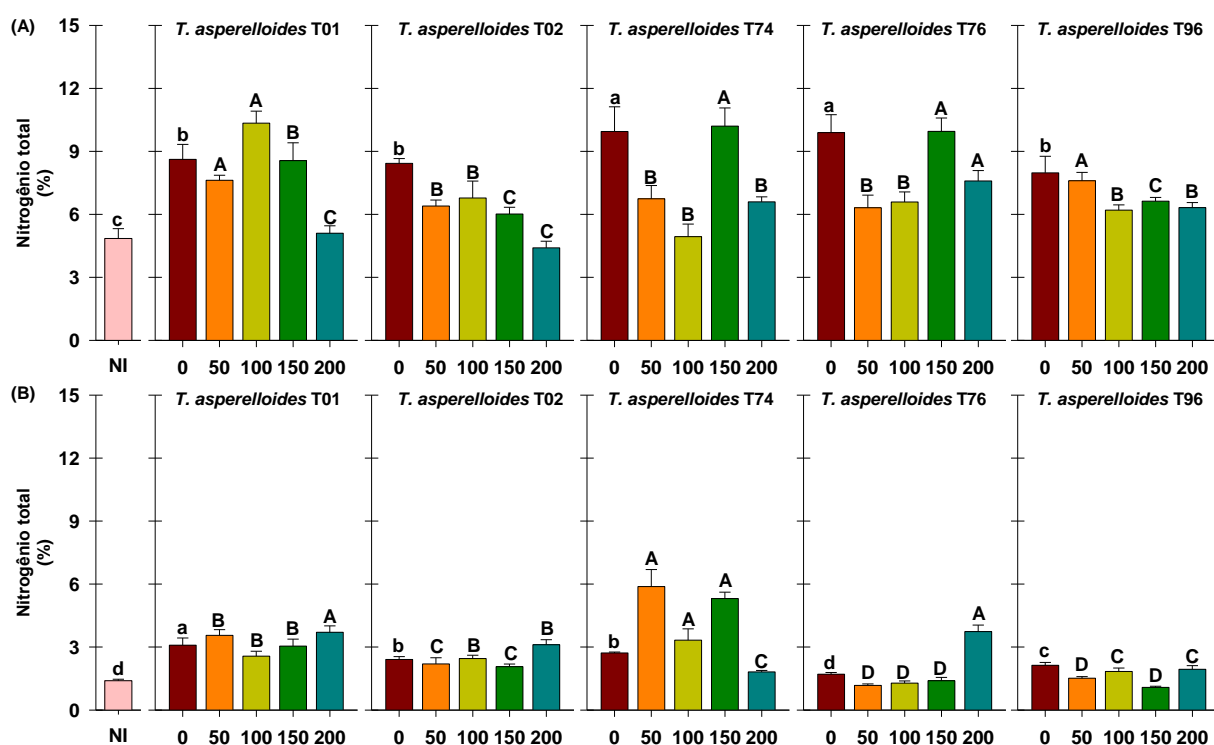


Figura 8. Teor de nitrogênio total em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

Quando as raízes de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma* foram analisadas, notou-se que as plantas inoculadas com os isolados T02 ou T74 exibiram incremento no teor de nitrogênio neste órgão (Figura 8B). Pode-se afirmar que a inoculação com *T. asperelloides* induz aumento nos teores de nitrogênio radicular, exceto nas plantas inoculadas com o isolado T96 que apresentaram teor radicular de nitrogênio superior quando as plantas não foram expostas ao alumínio. As plantas inoculadas com o isolado T74 apresentaram maior teor de nitrogênio quando as plantas foram cultivadas na presença de 50 e 150 μM de AlCl₃. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Harman (2000), o qual registrou que plantas de milho inoculadas com *T. harzianum* apresentaram maior absorção de nitrogênio em condições de campo. Segundo Courty et al. (2015), o estabelecimento de relações mutuamente simbióticas benéficas entre plantas e microrganismos presentes no solo, tal como observado entre plantas de milho e *T. asperelloides*, são eficientes para garantir o aporte de nitrogênio para as plantas.

Os solutos compatíveis, com destaque para aminoácidos hidrossolúveis e carboidratos, não interferem nas reações bioquímicas a nível celular quando

acumulados no citosol (BENDALY et al., 2016) e atuam protegendo membranas biológicas e outras estruturas subcelulares e também importantes compostos orgânicos, tais como enzimas e proteínas (SLAMA et al., 2015). No presente estudo, foi possível observar que houve acréscimo na concentração de carboidratos solúveis totais em resposta aos níveis crescentes de alumínio na parte aérea das plantas inoculadas com o isolado T74 (Figura 9A). As plantas inoculadas com os isolados T74 de *T. asperelloides* exibiram acréscimo de 54% quando expostas à 200 μM de AlCl_3 em relação às plantas inoculadas e não expostas ao alumínio.

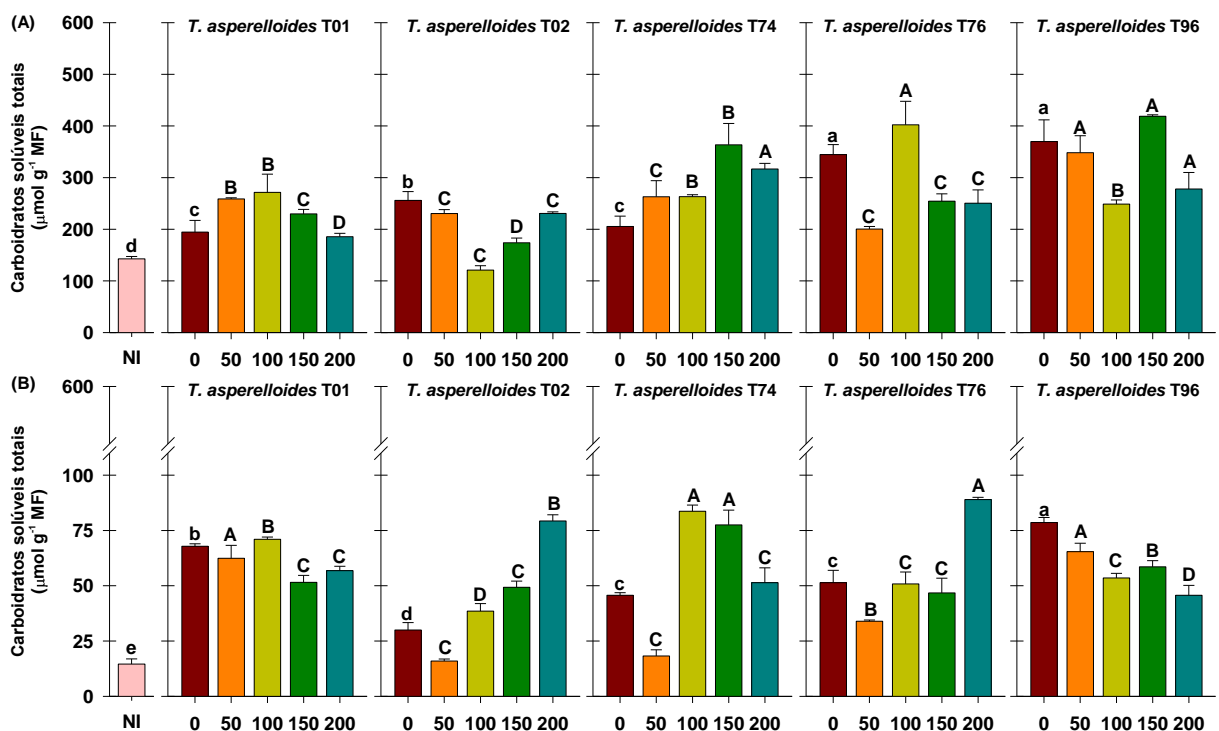


Figura 9. Concentração de carboidratos solúveis totais em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

Registrou-se maior concentração de carboidratos solúveis totais na parte aérea das plantas inoculadas com *T. asperelloides* e não expostas ao alumínio nas raízes em comparação com plantas não inoculadas nas mesmas condições, com destaque para as plantas inoculadas os isolados T76 e T96 (Figura 9A). Já nas raízes, as plantas não inoculadas e não expostas ao alumínio apresentaram menor concentração de carboidratos solúveis totais em relação às plantas inoculadas com *T.*

asperelloides nas mesmas condições e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* T96 se destacaram entre os demais tratamentos (Figura 9B). O aumento na concentração de carboidratos solúveis tem papel fundamental na regulação osmótica e manutenção dos níveis de água nas folhas (PARIDA et al., 2005) uma vez que isto afeta diretamente processos de ajustamento fisiológico e levam a redução no potencial osmótico visando manter a captação de água por parte das plantas (OLIVEIRA NETO, 2008).

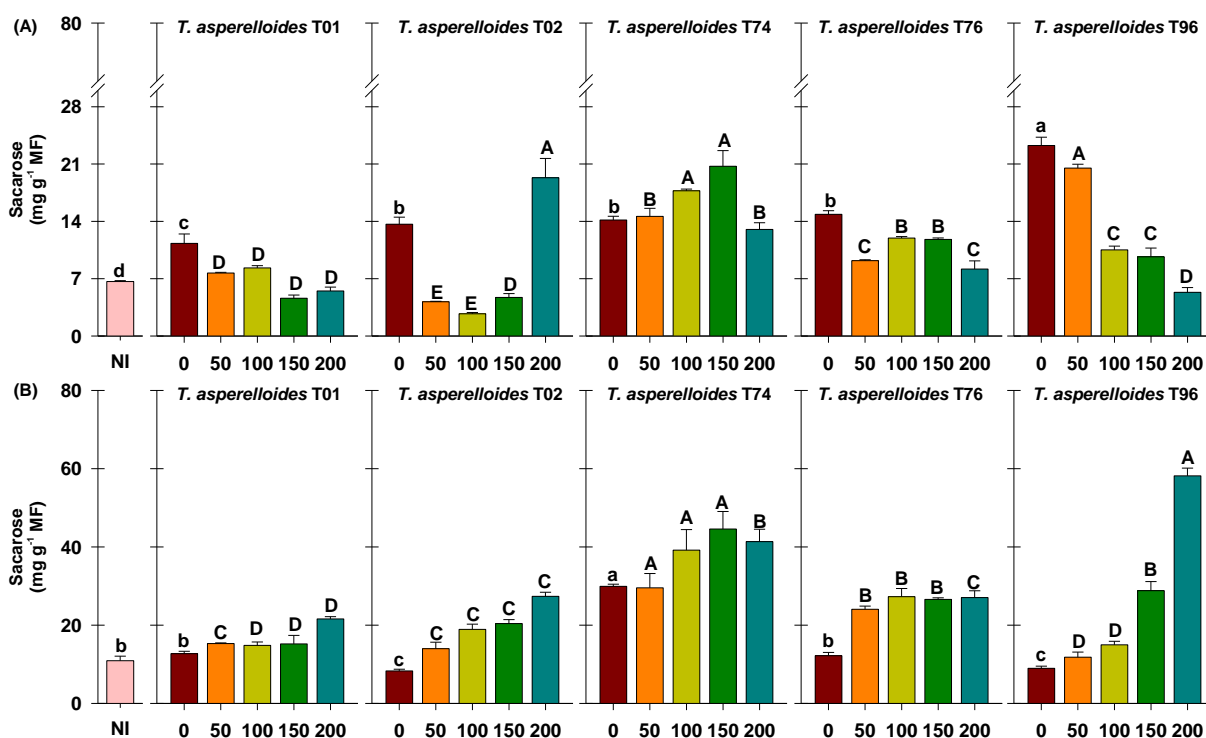


Figura 10. Concentração de sacarose em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

Segundo Martinez et al. (2007), aumentos no conteúdo de carboidratos solúveis em plantas sob estresse estão associados com a diminuição do conteúdo intracelular de amido e aumento no fluxo de carboidratos mais simples, como sacarose e trealose. Neste estudo, registrou-se redução na concentração de sacarose na parte aérea das plantas de milho inoculadas com o isolado T01, T76 ou T96 em resposta ao aumento dos níveis de alumínio (Figura 10A). A concentração de sacarose foi reduzida linearmente na parte aérea das plantas de milho inoculadas com o isolado T01 ($R^2 =$

0,78) ou T96 $R^2 = 0,93$) em resposta ao estresse por alumínio (Figura 10A; Apêndice 4). Analisando as raízes, registrou-se incremento na concentração de sacarose nas plantas inoculadas com *T. asperelloides*, destacando-se nas plantas inoculadas com o isolado T96 (Figura 10B). Em relação às plantas não inoculadas, as plantas inoculadas com o isolado T96 apresentaram incremento de 129% na concentração de sacarose na parte aérea. Adicionalmente, as plantas inoculadas com o isolado T74 apresentaram maior teor de sacarose nas raízes e exibiram acréscimo de 262% em comparação às plantas não inoculadas (Figura 10).

Os carboidratos, principalmente sacarose e amido, são os principais produtos finais da fotossíntese e seus níveis podem ser afetados por vários tipos de situações estressantes. No presente estudo, nota-se que houve redução na concentração de amido na parte aérea das plantas inoculadas com *T. asperelloides* T01, T76 e T96 em resposta ao aumento nas doses de alumínio (Figura 11A). Registrou-se maior concentração de amido na parte aérea das plantas de milho na presença do alumínio e submetidas a inoculação no isolado T02 quando a dose 200 μM de AlCl_3 foi aplicada, já nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* T74 houve acréscimo na concentração de amido quando expostas à 50, 100 e 150 μM de AlCl_3 . Nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* T76 houve aumento expressivo nesse parâmetro quando submetido a dose de 50 μM de AlCl_3 (Figura 11A).

Nas plantas inoculadas com o isolado T02 e expostas a 200 μM de AlCl_3 registrou-se concentração de amido similar às plantas inoculadas e não expostas ao alumínio (Figura 11B). A concentração de amido na parte aérea foi superior nas plantas inoculadas com o isolado T76, enquanto que nas raízes a concentração deste açúcar foi superior nos isolados T02 ou T76 – ambos em relação às plantas não inoculadas e não expostas ao alumínio. O amido pode desempenhar um papel central no metabolismo de carbono uma vez que sua degradação em plantas expostas ao estresse, tal como o estresse por alumínio, pode fornecer açúcares mais simples capazes de contribuir na manutenção do equilíbrio osmótico, de atuar como componentes estruturais da célula e ainda de agir como moléculas sinalizadoras para regular várias vias metabólicas importantes (ROSA et al., 2009).

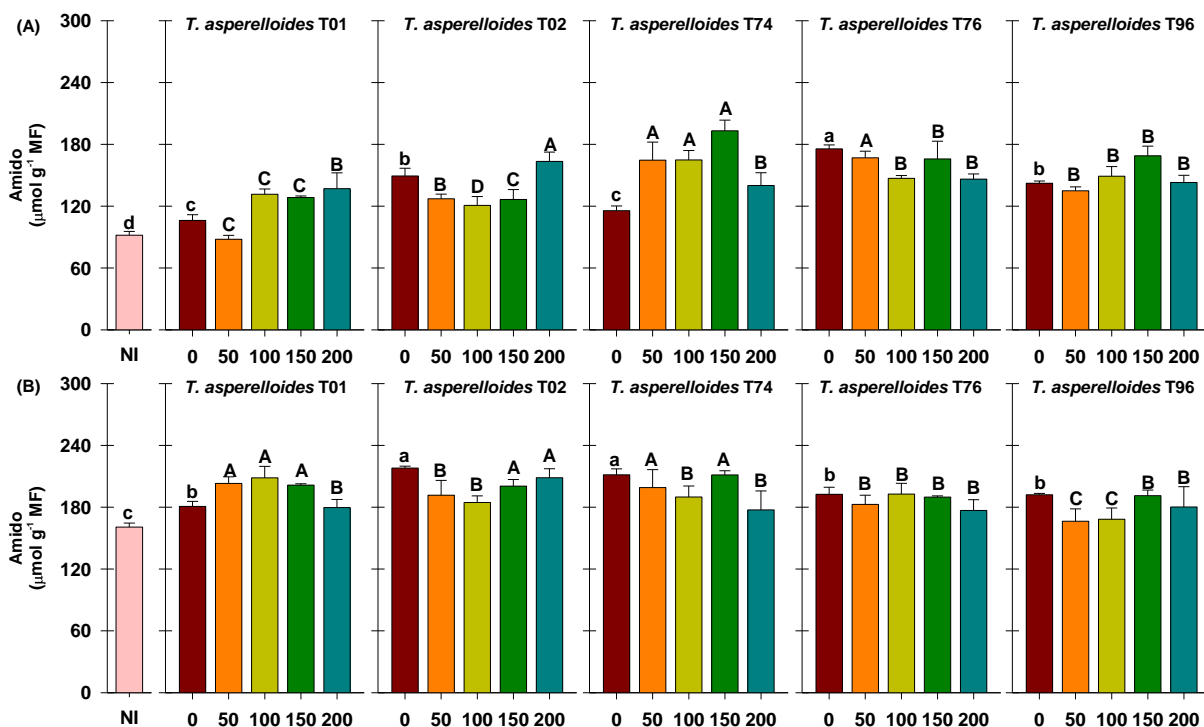


Figura 11. Concentração de amido em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃). Letras minúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas não inoculadas (NI) e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* na ausência do alumínio, enquanto que as letras maiúsculas iguais indicam que não houve diferença significativa entre as plantas inoculadas com *T. asperelloides* em cada nível de alumínio (Teste de Duncan; $p < 0,05$).

3.3 Análise final dos dados obtidos

A análise de componentes principais, mostrada na figura 12, permitiu separar os grupos de plantas avaliadas no presente estudo. No controle, os dois componentes principais foram responsáveis por explicar 48% da variação observada nos dados obtidos, sendo o valor de carboidratos solúveis totais responsável pelas variações observadas no componente 1, onde as plantas inoculadas com *T. asperelloides* T76 e T96 se destacaram. No componente 2 da análise de componentes principais dos resultados obtidos na parte aérea, houve destaque para os teores de potássio e neste componente as plantas não inoculadas e as plantas inoculadas com *T. asperelloides* T01 destacaram-se negativamente e positivamente, respectivamente (Figura 12A). As plantas não inoculadas apresentaram os menores valores médios teores de potássio, dentre outros parâmetros avaliados, e, portanto, se diferenciaram dos demais tratamentos. Estes resultados evidenciam o papel benéfico da inoculação no desenvolvimento da parte aérea das plantas de milho.

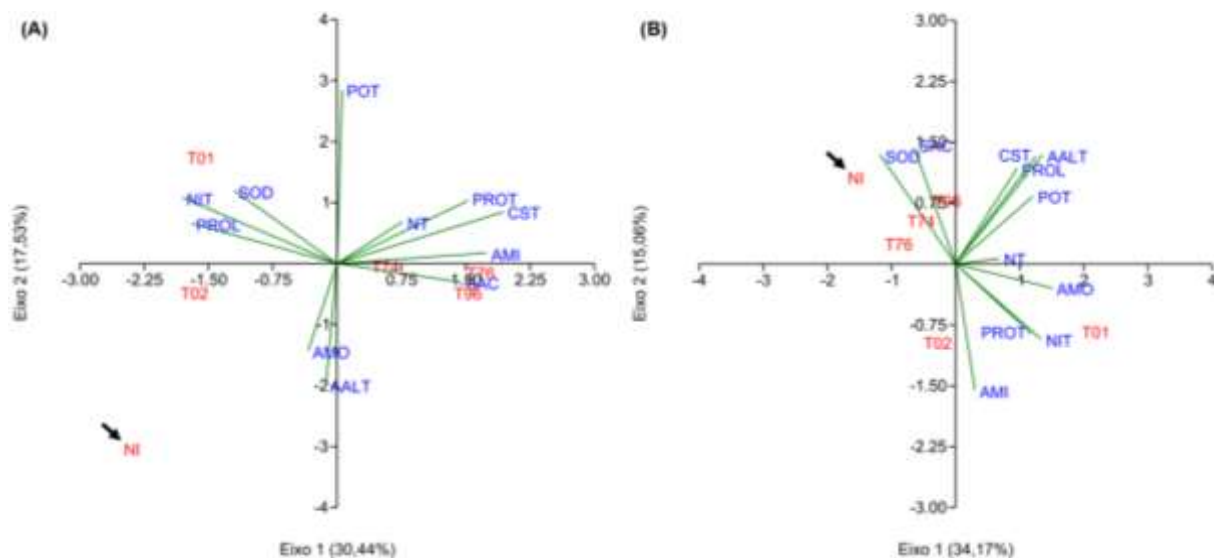


Figura 12. Análise de componentes principais das variáveis bioquímicas analisadas em folhas (A) e raízes (B) de plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (isolados T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas a níveis crescentes de alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Em destaque, as plantas não inoculadas (NI).

Analisando os dados obtidos nas raízes, registrou-se que os dois componentes principais foram responsáveis por explicar cerca de 50% da variação observada (Figura 12B). Os valores de amônia livre foram responsáveis pelas variações observadas no componente 1, enquanto que os valores de sacarose foram influenciadores da distribuição encontrada no componente 2. Analisando o componente 1 da análise de componentes principais dos resultados obtidos nas raízes, observa-se que as plantas inoculadas com o isolado T01 de *T. asperelloides* se destacaram neste componente. De fato, estas plantas apresentaram incremento significativo na amônia livre em suas raízes quando expostas à níveis crescentes de alumínio em relação ao controle (Figura 1B). Em relação ao componente 2, houve um destaque positivo para as plantas inoculadas com os isolados T74 e T96 de *T. asperelloides*.

Corroborando os dados apresentados no componente 2 da análise de componentes principais dos resultados obtidos nas raízes, as plantas de milho inoculadas com *T. asperelloides* T74 e T96 apresentaram os maiores valores de sacarose nas suas raízes – principalmente nas plantas inoculadas com *T. asperelloides* T96 e expostas à 200 μM de AlCl_3 . Igualmente ao observado para os dados de parte aérea, as plantas não inoculadas se diferenciaram dos demais tratamentos por apresentarem variações negativas nas variáveis analisadas. Os

dados mostrados na análise de componentes principais evidenciam o caráter positivo da inoculação no desenvolvimento de plantas de milho quando expostas à níveis crescentes de alumínio, principalmente no tocante ao metabolismo dos compostos de carbono (carboidratos solúveis totais, sacarose e amido).

4. CONCLUSÃO

O uso da inoculação com *T. asperelloides* alivia os efeitos negativos do estresse por alumínio nas plantas de milho por induzir alterações significativas na concentração de compostos inorgânicos e orgânicos, principalmente dos compostos do metabolismo de carbono (carboidratos solúveis totais, sacarose e amido), que contribuem para o custo energético do enfrentamento desta situação estressante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, P.; HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; JOHN, R.; EGAMBERDIEVA, D.; GUCEL, S. Role of *Trichoderma harzianum* in mitigating NaCl stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L) through antioxidative defense system. **Frontiers in Plant Science**, v. 6. p. 1-15, 2015.
- BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digest. **Community Soil Science and Plant Analysis**, v. 20, n. 9-10, p. 961-969, 1989.
- BATES, L.S.; WALDREN, R.P.; TEARE, J.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.
- BENDALY, A.; MESSEDI, D.; SMAOUI, A.; KSOURI, R.; BOUCHEREAU, A.; ABDELLY, C. Physiological and leaf metabolome changes in the xerohalophyte species *Atriplex halimus* induced by salinity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 103, p. 208-218, 2016.
- BORTOLIN, G. S.; WIETHAN, M. M. S.; VEY, R. T.; OLIVEIRA, J. C. P.; KÖPP, M.M.; SILVA, A. C. F. *Trichoderma* na promoção do desenvolvimento de plantas de *Paspalum regnellii* Mez. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n 1, p. 135-145, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 722, n. 1-2, p. 248- 254, 1976.
- CATALA, R.; OUYANG, J.; ABREU, I.A.; HU, Y.; SEO, H.; ZHANG, X.; CHUA, N.H. The *Arabidopsis* E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. **The Plant Cell**, v. 19. n. 9. p. 2952-2966, 2007.
- CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CHOUDHURY, S.; SHARMA, P. Aluminum stress inhibits root growth and alters physiological and metabolic responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 85, p. 63-70, 2014.
- COURTY, P. E.; SMITH, P.; KOEGEL, S.; REDECKER, D.; WIPF, D. Inorganic nitrogen uptake and transport in beneficial plant root-microbe interactions. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 34, p. 4-16, 2015.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

- FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA-FAEPE, 2005. p.: il. - Curso de Pós-Graduação "Lato Sensu" (Especialização) a Distância: Solos e meio Ambiente. Lavras- MG, 2005.
- FRANÇA, D.; KUPPER, K.; ROSA-MAGRI, M.; GOMES, T.; ROSSI, F. *Trichoderma* spp. Isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 47, p. 360-368, 2017.
- HAJIBOLAND, R.; ALIASGHARZADEH, A.; LAIEGH, S.F.; POSCHENRIEDER, C. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improve salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. *Plant Soil*, v. 331, p. 313-327, 2010.
- HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, v.84, p.377-393, 2000.
- HASHEM, A.; ABD, A.E.F.; ALQARAWI, A.A.; ALDUBISE, A.; EGAMBERDIEVA, D. Arbuscular mycorrhizal fungi enhances salinity tolerance of *Panicum turgidum* Forssk by altering photosynthetic and antioxidant pathways. *Journal of Plant Interaction*, v. 10, p.230-242, 2015.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Circular n. 347, Agricultural Experiment Station, California, 1950.
- IQBAL, N.; UMAR, S.; KHAN, N. A. Nitrogen availability regulates proline and ethylene production and alleviates salinity stress in mustard (*Brassica juncea*). *Journal of Plant Physiology*, v. 178, p. 84-91, 2015.
- JUNGES, E.; MUNIZ, M. F.; MEZZOMO, R.; BASTOS, B.; MACHADO, R. T. *Trichoderma* spp. na produção de mudas de espécies florestais. *Floresta e Ambiente*, v. 23, p. 237-244, 2016.
- KARAK, T.; SONAR, I.; PAUL, R.; FRANKOWSKI, M.; BORUAH, R.; DUTTA, A.; DAS, D. Aluminium dynamics from soil to tea plant (*Camellia sinensis* L.): Is it enhanced by municipal solid waste compost application? *Chemosphere*, v. 119. p. 917-926, 2015.
- KAUR, G.; ASTHIR, B. Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biologia Plantarum*, v. 59, p. 609-619, 2015.
- LIN, M. H.; GRESSHOFF, P.M.; FERGUSON, B. J. Systemic regulation of soybean nodulation by acidic growth conditions. *Journal of Plant Pathology*, v. 160, p. 2028-2039, 2012.
- MAATHUIS, F. J. M. Physiological Functions of Mineral Macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 12, p. 250-258, 2009.
- MALDANER, J.; STEFFEN, G. P. K.; SALDANHA, C. W.; STEFFEN, R. B.; TABALDI, L. A.; MISSIO, E.; MORAIS, R. M.; FLORES, R. Combining tolerant species and microorganisms for phytoremediation in aluminium-contaminated areas. *International Journal of Environmental Studies*, p. 1-14, 2019.
- MAO Q. Q.; GUAN M. Y.; LU K. X.; DU S. T.; FAN S. K.; YE Y. Q.; LIN, X.Y.; JIN, C.W. Inhibition of nitrate transporter 1.1-controlled nitrate uptake reduces cadmium uptake in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 166, p. 934-944, 2014.
- MARTÍNEZ, J. P.; SILVA, H.; LEDENT, J. F.; PINTO, M. Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy*, v. 26, p. 30-38, 2007.
- MARTÍNEZ-MEDINA, A.; ALGUACIL, M.M.; PASCUAL, J.; VAN WEES, S. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on melon plants. *Journal of Chemical Ecology*, v. 40, n. 7, p. 804-815, 2014.
- MISHRA, J.; SINGH, R.; ARORA, N. K. Alleviation of heavy metal stress in plants and remediation of soil by rhizosphere microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1-7, 2017.
- MITRA, S.; PRAMANIK, K.; SARKAR, A.; GHOSH, P.K.; SOREN, T.; MAITI, T.K. Bioaccumulation of cadmium by *Enterobacter* sp. and enhancement of rice seedling growth under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.156. p. 183-196, 2018.
- MUHAMMAD, N.; ZVOBGO, G.; FU, L. WA, L.; WALABA, J.L.; ZHANG, G. Physiological mechanisms for antagonistic interaction of manganese and aluminum in barley, *Journal of Plant Nutrition*, v. 42, p. 466-476, 2019.
- NAHAR, K.; HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Roles of osmolytes in plant adaptation to drought and salinity. In: IQBAL, N.; NAZAR, R.; KHAN, N. A. (Eds) **Osmolytes and plants acclimation to changing environment: emerging omics technologies**. New Delhi: Springer, 2016. p. 37-68.

NIETO-JACOBO, M. F.; STEYAERT, J. M.; SALAZAR-BADILLO, F. B.; NGUYEN, D. V.; ROSTÁS, M.; BRAITHWAITE, M.; SOUZA, J. T.; JIMENEZ-BREMONT J. F.; OHKURA, M.; STEWART, A.; MENDOZA-MENDOZA, A. Environmental growth conditions of *Trichoderma* spp. Affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-18, 2017.

OLIVEIRA NETO, C. F. **Crescimento, produção e comportamento fisiológico e bioquímico em plantas de sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench) submetidas à deficiência hídrica**. Dissertação (Mestrado), Universidade de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/PA, 2008.

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

PANDEY, A. K.; GHOSH, A.; RAI, K.; ADEEB, F.; AGRAWAL, M.; AGRAWAL, S.B. Abiotic Stress in Plants: A General Outline. In: HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; FUJITA, M.; OKU, H.; ISLAM, T. (Eds.). **Approaches for enhancing abiotic stress tolerance in plants**. 2019. Cap. 1. p. 1-46.

PARIDA, A.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

PRAMANIK, K.; MITRA, S.; SARKAR, A.; MAITI, T. K. Alleviation of phytotoxic effects of cadmium on rice seedlings by cadmium resistant PGPR strain *Enterobacter aerogenes* MCC 3092. **Journal of Hazardous Materials**, v. 351, p. 317-329, 2018.

REJEB, I.; PASTOR, V.; MAUCH-MANI, B. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. **Plants**, v. 3, n. 4, p.458-475, 2014.

RICHTER, A. F.; RAMOS, R. F.; ROHRIG, B.; TONIN, J.; MACHADO, J. T. M. Crescimento vegetativo de morangueiro através do uso de promotores de crescimento. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 6, n. 3, p. 76-81, 2019.

RODRIGUES, A. C.; SILVEIRA, J. A. G.; BONIFACIO, A.; FIGUEIREDO, M. V. B. Metabolism of nitrogen and carbon: Optimization of biological nitrogen fixation and cowpea development. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 67, p. 226-234, 2013.

ROMAGNOLI, E. M.; ANDREOTE, F. D. **Rizosfera**. In: Microbiologia do solo. Piracicaba: ESALQ, p. 221, 2016.

ROSA M.; PRADO C.; PODAZZA G.; INTERDONATO R.; GONZÁLEZ J. A.; HILAL M.; PRADO, F.E. Soluble sugars-Metabolism, sensing and abiotic stress. A complex network in the life of plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, p.388-393, 2009.

SADE, H.; MERIGA, B.; SURAPU, V.; GADI, J.; SUNITA, M.S.L.; SURAVAJHALA, P.; KAVIKISHOR, P.B. Toxicity and tolerance of aluminum in plants: Tailoring plants to suit to acid soils. **BioMetals**, v. 29, n. 2, p. 187-210, 2016.

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, p.56, 1974.

SCHMITT, M.; WATANABE, T.; JANSEN, S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. **AoB Plants**, v. 8, p.1-13, 2016.

SCHUBERT, S.; YAN, F. Nitrate and ammonium nutrition of plants: effects on acid/base balance and adaptation of root cell plasmalemma H⁺-ATPase. **Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde**, v. 160, p. 275-281, 1997.

SIGNORELLI, S.; COITIÑO, E. L.; BORSANI, O.; MONZA, J. Molecular mechanisms for the reaction between OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, p. 37-47, 2014.

SLAMA, I.; ABDELLEY, C.; BOUCHEREAU, A.; FLOWERS, T.; SAVOURÉ, A. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. **Annals of Botany**, v. 115, p. 433-447, 2015.

SOUSA, G. G.; VIANA, T. V. A.; PEREIRA, E. D.; ALBUQUERQUE, A. H. P.; MARINHO, A. B.; AZEVEDO, B. M. Fertirrigação potássica na cultura do morango no litoral Cearense. **Bragantia**, v. 73, n. 1, p. 1-6, 2014.

VALADARES-INGLIS, M. C.; MARTINS, I.; SILVA, J. P.; MELLO, S. C. M. **Seleção in vitro de linhagens de *Trichoderma* para controle da podridão-branca do alho e da cebola**. Brasília:

Embrapa, p.334, 2018.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**, v. 22, p. 280-283, 1968.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, p. 753-759, 2008.

VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 16. p. 1-10, 2016.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39, n.8, p. 971-974, 1967.

YEMM, E. W.; COCKING, E. F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, n. 948, p. 209-214, 1955.

ZHANG, R.; VIVANCO, J. M.; SHEN, Q. The unseen rhizosphere root-soil-microbe interactions for crop production. **Current Opinion in Microbiology**, v. 37, p. 8-14, 2017.

ZHAO, X. Q.; GUO, S. W.; SHINMACHI, F.; SUNAIRI, M.; NOGUCHI, A.; HASEGAWA, I.; SHEN RF. Aluminum tolerance in rice is antagonistic with nitrate preference and synergistic with ammonium preference. **Annals of Botany**, v. 111, p. 69-77, 2013.

APÊNDICES

Apêndice 1. Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros de crescimento e dos níveis de pigmentos fotossintéticos analisadas nas plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃). Os dados estão mostrados no capítulo I.

Variáveis analisadas	Fontes de variação			CV (%)	Shapiro-Wilk (p-valor)
	Alumínio (Al)	Fungo (F)	Al x F		
Taxa de crescimento absoluto	*	*	*	6,94	0,28
Comprimento das raízes	*	*	*	4,58	0,29
Massa seca da parte aérea (MSPA)	*	*	*	7,31	0,32
Massa seca das raízes (MSR)	*	*	*	7,10	0,31
Massa seca total	*	*	*	5,92	0,18
Relação MSPA/MSR	*	*	*	7,38	0,24
Clorofila a	*	*	*	8,54	0,36
Clorofila b	*	*	*	8,47	0,37
Clorofila total	*	*	*	7,45	0,34
Relação clorofila a/b	*	*	*	10,19	0,14
Carotenoides	*	*	*	6,99	0,61
Antocianina	*	*	*	7,62	0,17
Graus de liberdade	4	4	16	-	-

* = significativo a 1%; NS = não significativo. CV = coeficiente de variação.

Apêndice 2. Valores do ajuste da regressão dos parâmetros de crescimento e dos níveis de pigmentos fotossintéticos analisados nas plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃). Os dados estão mostrados no capítulo I.

Variáveis analisadas	T01		T02		T74		T76		T96	
	Ajuste	R ²	Ajuste	R ²	Ajuste	R ²	Ajuste	R ²	Ajuste	R ²
Taxa de crescimento absoluto	LIN	0,88	LIN	0,90	POL	0,57	POL	0,66	POL	0,67
Comprimento das raízes	POL	0,39	POL	0,20	POL	0,41	LIN	0,89	POL	0,74
Massa seca da parte aérea (MSPA)	POL	0,79	POL	0,69	POL	0,73	POL	0,29	POL	0,02
Massa seca das raízes (MSR)	POL	0,45	LIN	0,62	LIN	0,93	POL	0,78	LIN	0,89
Massa seca total	POL	0,66	LIN	0,65	LIN	0,64	LIN	0,24	LIN	0,76
Relação MSPA/MSR	POL	0,36	POL	0,96	POL	0,69	POL	0,86	LIN	0,77
Clorofila <i>a</i>	LIN	0,80	LIN	0,32	LIN	0,78	LIN	0,89	LIN	0,96
Clorofila <i>b</i>	POL	0,77	LIN	0,88	POL	0,59	LIN	0,89	LIN	0,68
Clorofila total	LIN	0,85	POL	0,77	LIN	0,68	LIN	0,91	LIN	0,95
Relação clorofila <i>a/b</i>	POL	0,93	LIN	0,83	POL	0,55	POL	0,94	LIN	0,97
Carotenoides	POL	0,90	POL	0,99	POL	0,96	LIN	0,94	LIN	0,78
Antocianina	LIN	0,12	LIN	0,59	POL	0,64	LIN	0,35	LIN	0,79

Apêndice 3. Análise de variância (ANOVA) da concentração de solutos inorgânicos e orgânicos e do teor de nitrogênio total quantificadas em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 µM de AlCl₃). Os dados estão mostrados no capítulo II.

Variáveis analisadas	Parte aérea					Raízes				
	Fontes de variação			CV (%)	Shapiro-Wilk (p-valor)	Fontes de variação			CV (%)	Shapiro-Wilk (p-valor)
	Alumínio (Al)	Fungo (F)	Al x F			Alumínio (Al)	Fungo (F)	Al x F		
Amônia livre	*	*	*	8,98	0,46	*	*	*	9,15	0,27
Nitrato	*	*	*	7,33	0,27	*	*	*	9,65	0,18
Sódio	*	*	*	5,55	0,64	*	*	*	7,78	0,11
Potássio	*	*	*	8,12	0,09	*	*	*	7,94	0,14
Aminoácidos solúveis totais	*	*	*	9,19	0,96	*	*	*	7,47	0,28
Prolina livre	*	*	*	9,03	0,06	*	*	*	10,71	0,22
Proteínas solúveis totais	*	*	*	9,31	0,38	*	*	*	6,98	0,13
Nitrogênio total	*	*	*	8,10	0,75	*	*	*	10,65	0,24
Carboidratos Solúveis Totais	*	*	*	8,43	0,73	*	*	*	7,38	0,14
Sacarose	*	*	*	7,26	0,10	*	*	*	8,92	0,59
Amido	*	*	*	6,04	0,36	*	*	*	4,92	0,09
Graus de liberdade	4	4	16	-	-	4	4	16	-	-

* = significativo a 1%; NS = não significativo. CV = coeficiente de variação.

Apêndice 4. Valores do ajuste da regressão da concentração de solutos inorgânicos e orgânicos e do teor de nitrogênio total quantificadas em plantas de milho inoculadas com *Trichoderma asperelloides* (T01, T02, T74, T76 ou T96) e submetidas ao estresse por alumínio (0 a 200 μM de AlCl_3). Os dados estão mostrados no capítulo II.

Variáveis analisadas	T01		T02		T74		T76		T96	
	Ajuste	R ²	Ajuste	R ²	Ajuste	R ²	Ajuste	R ²	Ajuste	R ²
Parte aérea										
Amônia livre	POL	0,53	POL	0,97	POL	0,59	LIN	0,63	POL	0,80
Nitrato	LIN	0,17	POL	0,73	LIN	0,85	POL	0,58	POL	0,17
Sódio	POL	0,58	POL	0,14	POL	0,44	LIN	0,70	POL	0,57
Potássio	POL	0,23	LIN	0,02	POL	0,12	LIN	0,19	LIN	0,25
Aminoácidos solúveis totais	POL	0,76	LIN	0,77	POL	0,21	POL	0,79	LIN	0,07
Prolina livre	POL	0,79	LIN	0,51	LIN	0,97	POL	0,82	LIN	0,79
Proteínas solúveis	POL	0,76	POL	0,94	LIN	0,72	LIN	0,67	POL	0,62
Nitrogênio total	LIN	0,17	POL	0,74	LIN	0,85	POL	0,58	LIN	0,11
Carboidratos Solúveis Totais	POL	0,95	POL	0,73	LIN	0,87	LIN	0,07	LIN	0,07
Sacarose	LIN	0,78	POL	0,97	POL	0,52	LIN	0,42	LIN	0,93
Amido	LIN	0,61	POL	0,97	POL	0,82	LIN	0,52	LIN	0,19
Raízes										
Amônia livre	POL	0,68	LIN	0,91	POL	0,81	POL	0,98	LIN	0,88
Nitrato	POL	0,81	POL	0,93	POL	0,62	POL	0,91	POL	0,67
Sódio	POL	0,46	LIN	0,36	LIN	0,53	LIN	0,52	LIN	0,87
Potássio	LIN	0,88	POL	0,85	POL	0,52	POL	0,52	POL	0,78
Aminoácidos solúveis totais	POL	0,36	POL	0,74	POL	0,62	LIN	0,66	LIN	0,61
Prolina livre	LIN	0,08	POL	0,53	POL	0,69	POL	0,43	POL	0,75
Proteínas solúveis	LIN	0,15	LIN	0,38	POL	0,64	POL	0,14	LIN	0,78
Nitrogênio total	POL	0,36	POL	0,63	POL	0,51	POL	0,92	POL	0,47
Carboidratos Solúveis Totais	LIN	0,43	LIN	0,76	POL	0,30	POL	0,86	LIN	0,85
Sacarose	LIN	0,70	LIN	0,97	LIN	0,77	LIN	0,63	LIN	0,81
Amido	POL	0,99	POL	0,87	POL	0,36	POL	0,44	POL	0,31

LIN = Linear. POL = polinomial.