

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘JÚLIO DE MESQUITA
FILHO’**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**NOVAS ALTERNATIVAS PARA MANEJOS INTEGRADOS
SUSTENTÁVEIS: ASPECTOS AGRONÔMICOS E
MICROBIANOS DO MILHO APÓS O CULTIVO À CAMPO DE
COGUMELO DO SOL**

Lucas da Silva Alves

Engenheiro Agrônomo

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘JÚLIO DE MESQUITA
FILHO’
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**NOVAS ALTERNATIVAS PARA MANEJOS INTEGRADOS
SUSTENTÁVEIS: ASPECTOS AGRONÔMICOS E
MICROBIANOS DO MILHO APÓS O CULTIVO À CAMPO DE
COGUMELO DO SOL**

Discente: Lucas da Silva Alves

Orientador: Prof Dr. Diego Cunha Zied

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias –
Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção
do título de Mestre em Microbiologia
Agropecuária.**

FICHA CATALOGRÁFICA

A474n	Alves, Lucas da Silva Novas alternativas para manejos integrados sustentáveis: aspectos agronômicos e microbianos do milho após o cultivo à campo de cogumelo do sol / Lucas da Silva Alves. -- Jaboticabal, 2021 95 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Diego Cunha Zied 1. Zea mays. 2. Produtividade. 3. Composto exaurido de cogumelo. 4. Agaricus subrufescens. 5. Agricultura familiar. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

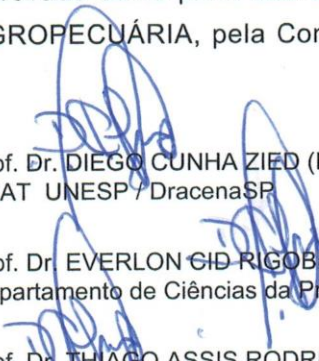
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: NOVAS ALTERNATIVAS PARA SISTEMAS INTEGRADOS SUSTENTÁVEIS:
ASPECTOS AGRONÔMICOS E MICROBIANOS DO MILHO APÓS O
CULTIVO AO CAMPO DE COGUMELO DO SOL

AUTOR: LUCAS DA SILVA ALVES

ORIENTADOR: DIEGO CUNHA ZIED

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MICROBIOLOGIA
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DIEGO CUNHA ZIED (Participação Virtual)
FCAT UNESP / Dracena SP

Prof. Dr. EVERLON CID RIGOBELLO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. THIAGO ASSIS RODRIGUES NOGUEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Jaboticabal, 16 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Lucas da Silva Alves – Nascido em 19 de agosto de 1996 na cidade de Martinópolis, São Paulo, filho de Maurício Alves e Lídia Pereira da Silva. No ano de 2014, ingressou no curso de graduação em Engenharia Agrônômica na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAT/UNESP), Campus de Dracena. Em mês 2018, recebeu o título de bacharel em Engenharia Agrônômica. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq e FAPESP, desenvolvendo pesquisas sobre reutilização sustentável de resíduos agropecuários para a produção vegetal. Foi membro dos grupos de estudos em Aquicultura da UNESP Dracena (GAUD), Grupo de Ações em Impacto Ambiental (GAIA) e, desde 2017, é membro do Centro de Estudos em Cogumelos (CECOG). Em 2019, ingressou no curso de mestrado no Programa de Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal. Durante o mestrado, recebeu bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sendo orientado pelo Prof. Dr. Diego Cunha Zied.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida. Nessa longa e tortuosa trajetória, foi Ele que me forneceu amparo nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais, Maurício e Lúcia, pelo carinho, afeto e compreensão. Sempre dedicados com o ensino de seus filhos para demonstrar que a educação é o melhor caminho. Sou grato incondicionalmente por este apoio.

Aos meus irmãos, Milena e Maurício Júnior, companheiros consanguíneos que estiveram presentes nos tropeços e conquistas. Ser filho primogênito me incentiva a inspirá-los cada dia mais e demonstrar que não existe impossível

A minha família gigantesca materna e paterna, incluindo tios(as) e primos(as). Em especial, aos principais progenitores, meus avôs maternos Sr. José Pedro e Dona Maria e a minha avó paterna Dona Ana. Nas escassas oportunidades de visitas possíveis durante a condução das pesquisas, em nenhuma faltou amor, afeto e conselhos, além da saudade nas despedidas.

A pessoa mais importante que traçou meu caminho neste período, Izabela Ponso Magalhães. Sua contribuição é imensurável neste trabalho. Tenho orgulho de ser companheiro de vida de uma pessoa tão incrível quanto você é.

Ao meu orientador, Professor Doutor Diego Cunha Zied, por todos os ensinamentos, orientações e discussões realizadas para a concepção deste trabalho. É uma honra ter sido seu orientado, companheiro de profissão e um grande amigo. Em especial, deixo o agradecimento para os docentes doutores Reges Heinrichs, Ana Carolina Firmino, Samuel Ferrari e Vagner do Nascimento. A contribuição de materiais, insumos, laboratórios e vossas expertises foram essenciais para que a pesquisa se desenvolvesse.

Aos funcionários da FCAT/UNESP, em especial aos técnicos de campo Alan, Fábio e Arnaldo, e aos técnicos de laboratório Wanderson e Andréia. Sem vocês não

existiria uma semente germinada deste trabalho ou nenhuma análise laboratorial realizada. Fica aqui minha imensa gratidão.

Aos amigos do CECOG, que compartilhei minhas frustrações, conquistas, ideias, angustias, alegrias e decepções. Longos foram os dias de coletas que pude contar com toda essa equipe e felizes foram os raros encontros que realizamos para celebrar a nossa amizade. Em especial, Cinthia Ellen, Matheus Iossi, Wagner, Gonçalves Isabela Palú, Isabel Arjonas, Pedro Gomes, João Pedro Ruiz, Rafael Postinguel e Marcos.

Aos amigos de Dracena, em especial Bruno Almeida, Marcus Gabriel, Caio Bodini, Leonardo Veronezi, Luis Campos e José Eduardo. Com vocês pude compartilhar trabalho, pesquisas, boas conversas e encontros inenarráveis, estendo minha consideração pela amizade e contribuição.

A república que me criei e atualmente é minha segunda família, República Éter na Ment (Dracena), o meu sincero agradecimento a Bolívia, Shoyu, Minhoca, Cachaço, Tarso, Frotinha, Rexona, Colgate e Adriano por ter amparado minha estadia até aqui. Em especial, estendo também meu agradecimento a República Canekão (Jaboticabal), lugar que me acolheu no início do curso do Mestrado. Para todos os moradores desses lugares, a irmandade e consideração irão sempre permanecer.

Por último, a todas pessoas, órgãos, instituições e empresas que possuíram contribuição direta ou indireta para a realização deste trabalho. Desde a simplicidade de um diário bom dia até a participação em uma coleta experimental, toda a conjunção permitiu a realização do mesmo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001 e financiado pelo Processo nº 2019/19866-4, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	9
1. INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 COGUMELO DO SOL: UM ALIMENTO NUTRACEUTICO	12
2.2 SPENT MUSHROOM SUBSTRATE (SMS): IMPORTÂNCIA E HISTÓRICO	12
2.3 APLICABILIDADE DO SMS.....	13
2.4. EFEITO DO SMS NA FERTILIDADE E NA MICROBIOTA DO SOLO E PLANTA	14
2.5. MILHO E SUAS DIFICULDADES DE EXPANSÃO NA AGRICULTURA FAMILIAR	15
2.6. PROPOSTA DE UM NOVO SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO PARA A AGRICULTURA FAMILIAR.....	16
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
CAPÍTULO 2 – ASPECTOS AGRONÔMICOS DO MILHO CULTIVADO EM SUCESSÃO AO COGUMELO DO SOL À CAMPO.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	26
2.2 O CULTIVO DE COGUMELO DO SOL E PREPARO DA ÁREA.....	28
2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, FERTILIZAÇÃO E GESSAGEM.....	29
2.4 HÍBRIDO UTILIZADO, POPULAÇÃO E DESIGNER EXPERIMENTAL	31
2.5 CONDUÇÃO EXPERIMENTAL	32
2.6. PARÂMETROS AVALIADOS.....	33
2.6.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS.....	33
2.6.2. CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E pH DO SOLO	33

2.6.3. ANÁLISES MINERAL DE SOLO E FOLHA.....	34
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
3. RESULTADOS.....	34
3.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS.....	34
3.2. CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E pH DO SOLO	39
3.3. MATÉRIA ORGÂNICA E TEORES DE NUTRIENTES NO SOLO E NAS FOLHAS	40
4 DISCUSSÃO.....	43
4.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS.....	43
4.2. CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E pH DO SOLO.....	46
4.3. MATÉRIA ORGÂNICA E TEORES DE NUTRIENTES NO SOLO E NAS FOLHAS.....	47
5 CONCLUSÃO	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO 3 – ASPECTOS MICROBIANOS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFITICOS DO MILHO CULTIVADO EM SUCESSÃO AO COGUMELO DO SOL À CAMPO	54
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
2.1. LOCAL DA EXPERIMENTAÇÃO.....	57
2.2. CONDUÇÃO DA EXPERIMENTAÇÃO A CAMPO.....	57
2.3. MEIOS DE CULTURAS UTILIZADOS.....	58
2.4. CONTAGEM DE UFC DE SOLO E DA RIZOSFERA.....	59
2.5. FREQUÊNCIA DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA E ISOLAMENTO FÚNGICO.....	60
2.6. MANUTENÇÃO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	62
2.7. TESTE DE PATOGENICIDADE.....	64

2.8. CRESCIMENTO E TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	64
2.9. TESTE DE ANTAGONISMO IN VITRO.....	65
2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
3. RESULTADOS.....	67
3.1. UFC DO SOLO E DA RIZOSFERA.....	67
3.2. FREQUÊNCIA DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA.....	70
3.3. OBTENÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS.....	73
3.4. TESTE DE PATOGENICIDADE, CRESCIMENTO MICELIAL E TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	75
3.5. TESTE DE ANTAGONISMO IN VITRO.....	78
4. DISCUSSÕES.....	80
4.1. UFC DO SOLO E DA RIZOSFERA.....	80
4.2. FREQUENCIA DE COLONIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS...	83
4.3. TESTE DE PATOGENICIDADE.....	84
4.4. CRESCIMENTO MICELIAL E TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	85
4.5. TESTE DE ANTAGONISMO IN VITRO.....	85
5. CONCLUSÕES.....	87
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

NOVAS ALTERNATIVAS PARA MANEJOS INTEGRADOS SUSTENTÁVEIS: ASPECTOS AGRONÔMICOS E MICROBIANOS DO MILHO APÓS O CULTIVO AO CAMPO DE COGUMELO DO SOL

RESUMO - O milho é uma das culturas agrícola com relevância no cenário mundial. Porém, quando se compara rendimentos possíveis da cultura, com a realidade nacional, nota-se que são necessários avanços tecnológicos, que promovam baixo impacto ambiental e lucratividade em pequenas áreas, principalmente no setor de agricultura familiar. Com isso, manejos de consórcio entre cultivos se tornam uma ótima opção para suprir essa necessidade, do qual cita o manejo de milho em sucessão a produção de cogumelos. É possível que esse manejo seja eficiente em reduzir a fertilização mineral e a utilização de condicionadores dos solos necessários para a produção do milho, além de elevar a comunidade microbiana cultivável e, consequentemente, a abundância microbiana endofítica. Logo, buscou-se com este estudo, avaliar o manejo integrado Cogumelo do Sol-milho como uma opção de cultivo sustentável, e se os diferentes manejos interferem na comunidade microbiana do solo e endofítica. Também se objetivou avaliar o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos obtidos durante o cultivo. O experimento ocorreu em dois cultivos (1º e 2º ciclo), em um sistema contínuo (cogumelo-milho-milho), posterior a colheita do Cogumelo do Sol. Os experimentos consistiram de um fatorial duplo (2 x 4), sendo: gesso (presença e ausência) e manejo da fertilidade (tratamento controle, área pós cultivo de cogumelo 'SMS', área pós cultivo de cogumelo + adubação de semeadura 'SMS+S', área pós cultivo de cogumelo + adubação de semeadura + adubação de cobertura 'SMS+S+CB'). Se avaliou os atributos químicos do solo e folha (macronutrientes e matéria orgânica), os aspectos produtivos do milho durante o cultivo, as características microbiológicas do solo (unidade formadora de colônia (UFC) do solo e da rizosfera) e endofítica (frequência de colonização endofítica de folha e raiz). Ao final, alguns fungos foram selecionados para se avaliar potencial biotecnológico *in vitro* (teste de patogenicidade, crescimento micelial e pareamento com o patógeno *Fusarium* sp.) Os resultados demonstraram que, apesar dos baixos teores de macronutrientes encontrados nas folhas e no solo cultivado sob a área pós cultivo de cogumelo, é possível a reutilização destas áreas. SMS+S+CB se mostrou mais eficiente que o controle em fornecer matéria seca de parte aérea (MSPA), e essa condição pode ser uma alternativa para um cultivo circular cogumelo-milho. SMS+S alcançou rendimentos e MSPA não diferentes significativos comparados ao controle, circunstância relevante ao produtor devidos aos custos e impactos causados pela fertilização de cobertura. A gessagem não apresentou incrementos produtivos relevantes. Para os aspectos microbianos avaliados, os fertilizantes e a aplicação de gesso se mostraram prejudiciais para UFC do solo no 1º ciclo, a UFC rizosférica apresentou menor flutuação microbiana durante as safras do que a UFC do solo, e a semeadura do milho em áreas pós cultivo se mostrou como uma rica fonte para elevação de microrganismos endofíticos, em específico os fungos endofíticos radiculares. Os isolados I08, I20, I29 e I36 apresentaram resultados interessantes de crescimento micelial e inibição de *Fusarium* sp. além de não serem patogênicos. Conclui-se que, nas condições realizadas essa experimentação, é possível se produzir milho após o cultivo do Cogumelo do Sol, entretanto, a fertilização se torna indispensável para reduzir as perdas de nutrientes. A fertilização

e gessagem influenciam na UFC do solo, e a reutilização das áreas incrementam a microbiota endofítica do milho. Os isolados I08, I20, I29 e I36 apresentam potencial biotecnológico a serem explorados.

Palavras-chave: *Zea mays*, produtividade, composto exaurido de cogumelo, *Agaricus subrufescens*, agricultura familiar

NEW ALTERNATIVES FOR SUSTAINABLE INTEGRATED MANAGERMENTS: AGRONOMIC AND MICROBIAL ASPECTS OF MAIZE AFTER CULTIVATION OF SUN MUSHROOM IN FIELD

ABSTRACT - Maize is one of the crops with relevance on the world stage. However, when comparing possible crop yields with the national reality, it is noted that technological advances are needed, which promote low environmental impact and profitability in small areas, especially in the family farming sector. Thus, intercropping management between crops becomes a great option to meet this need, which he cites management of corn in succession to mushroom production. This management may be efficient in reducing mineral fertilization and the use of soil conditioners necessary for corn production, in addition to increasing the cultivable microbial community and, consequently, the endophytic microbial abundance. Therefore, this study sought to evaluate the integrated management of Mushroom Sun-maize as an option for sustainable cultivation, and whether the different managements interfere in the soil microbial and endophytic community. It also aimed to evaluate the biotechnological potential of endophytic fungi obtained during cultivation. The experiment took place in two crops (1st and 2nd cycle), in a continuous system (mushroom-corn-corn), after the harvest of Mushroom of the Sun. The experiments consisted of a double factorial (2 x 4), being: gypsum (presence and absence) and fertility management (control treatment, post-grow area of 'SMS' mushroom, post-grow area of mushroom + 'SMS+S' sowing fertilization, post-grow mushroom area + sowing fertilization + top-dressing ' SMS+S+CB'). The chemical attributes of the soil and leaves (macronutrients and organic matter), the productive aspects of corn during cultivation, the microbiological characteristics of the soil (colony-forming unit (CFU) of the soil and rhizosphere), and endophytic (frequency of colonization) were evaluated endophytic root and leaf). In the end, some fungi were selected to evaluate in vitro biotechnological potential (pathogenicity test, mycelial growth, and pairing with the pathogen *Fusarium* sp.) The results showed that, despite the low levels of macronutrients found in the leaves and soil cultivated under the area after mushroom cultivation, it is possible to reuse these areas. SMS+S+CB was more efficient than the control in providing shoot dry matter (MSPA), and this condition can be an alternative for a mushroom-corn circular crop. SMS+S achieved yields and MSPA not significantly different compared to the control, a relevant circumstance for the producer due to the costs and impacts caused by top dressing. Gypsum application did not show relevant productive increments. For the microbial aspects evaluated, fertilizers and gypsum application were harmful to soil CFU in the 1st cycle, rhizosphere CFU showed less microbial fluctuation during harvests than soil CFU, and corn sowing in post-cultivation areas was shown to be a rich source for the elevation of endophytic microorganisms, specifically root endophytic fungi. Isolates I08, I20, I29, and I36 showed interesting results of mycelial growth and inhibition of *Fusarium* sp. in addition to being non-pathogenic. Concluded that, under the conditions carried out in this experiment, it is possible to produce maize after the cultivation of Mushroom of the Sun, however, fertilization becomes essential to reduce nutrient losses. Fertilization and plastering influence the CFU of the soil, and the reuse of areas increases the endophytic microbiota of maize. Isolates I08, I20, I29, and I36 have biotechnological potential to be explored.

Keywords: *Zea mays*, productivity, spent mushroom substrate, *Agaricus subrufescens*, family farming

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Em um cenário macroeconômico, observa a relevância da agricultura familiar (AF) no país. Presente em mais de 77% dos 5,07 milhões de estabelecimentos rurais do Brasil (IBGE, 2017), a AF se divide com grandes contribuições das atividades de pesca, horticultura, lavouras temporárias e permanentes no cenário nacional, além de contribuir com o equilíbrio hídrico em mais de 85% por meio da produção e preservação das florestas nativas (Freitas, 2021). Contudo, a AF apresenta sérias problemáticas que desalentam o setor. Assim, o êxodo rural, a rentabilidade em pequenas e médias propriedades e a baixa capacidade tecnológica são alguns dos principais desafios (Guanziroli et al., 2015; Delgado e Bergamasco, 2017, Saron et al., 2017).

Novas alternativas emergem como soluções destes entraves. Manejos produtivos que promovem renda multifacetada em pequenas e médias propriedades e preservam a bioeconomia são as principais fontes de financiamento públicos dos programas PRONAF (Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar), PNAE (Programa Nacional de Alimentação Escolar) e PAA (Programa de Aquisição de Alimentos) (MAPA, 2021). Essas políticas incentivam a produção, garantem a segurança alimentar, melhoram a vida dos camponeses e diminuem o impacto ambiental, por se tratar de manejos integrados sustentáveis (Guanziroli et al., 2015).

A produção agrícola integrada é mais eficiente pois utiliza de forma consciente os recursos naturais, promove a ciclagem de nutrientes, melhora qualidade do solo, reduz custos de produção e eleva a produtividade das culturas (Rosa-Schleich et al., 2019). Essas características os tornam vitais para a segurança alimentar em um âmbito global, principalmente em regiões subdesenvolvidas (Tanumihardjo et al., 2020).

Existem culturas que apresentam aptidão para esse manejo. O milho é uma ótima alternativa para produção agroalimentar integrada, com elevada importância alimentícia mundial (Tanumihardjo et al., 2020). Diminuir a necessidade de fertilizantes sintéticos no milho com esses manejos acarreta em desenvolvimento de

regiões marginais e melhoria da nutrição e saúde da população (Meybeck e Gitz, 2017).

Dentre as possibilidades de sistema integrado entre milho e outras culturas, a reutilização de áreas pós colheita de Cogumelo do Sol (*Agaricus subrufescens*) é fato inédito para o Brasil.

Depois da colheita dos basidiocarpos, a produção de Cogumelo do Sol produz diretamente no solo um composto exaurido, conhecido como *Spent Mushroom Substrate* (SMS). Esse produto gerado é considerado um resíduo no mundo todo, e a preocupação com o descarte do SMS é um problema atual (Hanafi et al., 2018). Há uma elevada quantidade de SMS produzido nas fazendas de cogumelos, e, a destinação correta é o maior desafio para os fungicultores (Rasib et al., 2015).

Dentre os principais problemas ambientais do inadequado descarte do SMS podem ser citados a proliferação de pragas e doenças indesejáveis, a contaminação do solo e do lençol freático além dos componentes odoríferos indesejáveis (Rinker, 2017). Porém, bem manejado, soluções sustentáveis para a agricultura são geradas a partir do mesmo.

O SMS de diversas espécies de cogumelos já foi relatado como fertilizante orgânico ou condicionador de solo em culturas hortícolas (Zied et al., 2021), ornamentais (Ngan e Riddech, 2021), anuais (Wang et al., 2021) e perenes (Malinowska e Jankowski, 2020). A literatura demonstra ótima utilização do resíduo como agentes de biocontrole de doenças (Noble et al., 2018) e promoção de crescimento vegetal (Paula et al., 2017).

O SMS causa impacto positivo em aspectos físicos (fornecimento de matéria orgânica e estabilização dos agregados), químicos (mineralização de nutrientes) e biológicos do solo (atividade antimicrobiana contra fitopatógenos) (Kwak et al., 2015; Meng et al., 2018; Leong et al., 2022).

Logo, é possível que manejos integrados que reaproveitam áreas pós colheita de Cogumelo do Sol com o cultivo do milho possam ser alternativas que reduzam a necessidade de fertilizantes minerais, e que esses cultivos possuam benefícios microbianos ao vegetal. Tem se como hipótese que as principais características agronômicas e microbianas do milho são afetados positivamente pelo o SMS gerado pelo Cogumelo do Sol à campo.

Portanto, a presente pesquisa se objetivou-se em avaliar: (I) os parâmetros agronômicos do milho semeado após colheita de Cogumelo do Sol à campo, sob diferentes manejos; (II) os teores de nutrientes no solo e nas folhas, bem como a condutividade elétrica e o pH do solo, (III) parâmetros de comunidade da microbiota de solo e endofítica e (IV) parâmetros biotecnológicos dos fungos endofíticos isolados das áreas influenciadas pelo SMS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COGUMELO DO SOL: UM ALIMENTO NUTRACEUTICO

A espécie *Agaricus subrufescens* é conhecido popularmente por Cogumelo do Sol ou Cogumelo Medicinal e é seguramente indicado para a produção no Brasil, pois exerce a capacidade de frutificação em temperaturas elevadas (ao redor de 25 a 28°C), com alta rusticidade de produção (Zied e et al., 2018).

Estes cogumelos são relevantes pois possuem elevada taxa metabólica e bioconversão, o que possibilita ser cultivado em diversos resíduos agroindustriais, em pequenos espaços físicos, num curto período de tempo, praticamente o ano todo, o que gera um produto final de elevada qualidade nutricional, superior aos diversos produtos de origem animal e vegetal. Fato ganha maior destaque ainda por não emitirem gases de efeito estufa no ciclo produtivo (Wang et al., 2014).

Além disso, como popularmente conhecido, este cogumelo tem presente em sua composição moléculas de β -glucanas, blazeispirol, ergosterol, agaritine e lectin (Xu et al., 2011), que possuem propriedades medicinais importantes frentes a problemas de saúde como Síndrome X, hipocolesterolêmica, HDL, homeostase lipídica e obesidade (Grothe et al. 2016).

Ressalta que o ergosterol presente nos cogumelos quando exposto a radiação ultravioleta (UV) é transformado em vitamina D2. Banlangsawan et al. (2016) reportaram que alguns cogumelos silvestres contêm vitamina D2 porque são naturalmente expostos à luz UV, enquanto espécies cultivadas contêm maior teor de ergosterol.

Após a produção dos cogumelos, o substrato mais o micélio do fungo cultivado gera um subproduto (Buswell, 1994). Alguns autores discordam em chamar este substrato de subproduto e preferem mencioná-lo como composto exaurido de cogumelo ou "*Spent Mushroom Substrate – SMS*", devido a sua elevada utilidade no meio agrônomo e biológico (Zied et al., 2021).

2.2 SPENT MUSHROOM SUBSTRATE (SMS): IMPORTÂNCIA E HISTÓRICO

Em qualquer produção agropecuária, depois da colheita, resta um subproduto, que podem ter alta significância. Isto não é diferente para o cogumelo. Segundo Gao

et al. (2021), para cada tonelada de cogumelos produzida são geradas cinco toneladas de material residual.

O SMS é gerado por não ser completamente degradado pelos fungos comestíveis cultivados (Leong et al., 2022). Governos e pesquisadores ao redor do mundo buscam a gestão ambientalmente consciente deste resíduo produzido pelo cultivo de cogumelos (Rinker, 2017).

Para sanar esta problemática, esse composto exaurido de alto potencial biológico começou a ser utilizado mundialmente. Segundo Rinker (2017), os primeiros relatos de sua utilização com fins benéficos na produção são datados na Europa no início da década de 60. Meados os anos 80 e 90 ocorreu uns crescentes estudos no Irã, Iraque, China e alguns países asiáticos e norte-americano.

2.3. APLICABILIDADE DO SMS

Atualmente, o SMS é amplamente utilizado no cenário agrícola, o que o torna de aplicabilidade diversa. Na literatura, podemos subdividir suas utilidades entre temas correlacionados indiretamente com a produção de alimentos e trabalhos que estão ligados diretamente com o aumento da produtividade agropecuária.

Os que estão ligados indiretamente, encontram-se trabalhos sobre biorremediação de solos, absorção de metais pesados e herbicidas (Stoknes et al; 2019). Compreende também o setor florestal, como agente degradante de lignina (Corrêa et al., 2016) e o setor energético, com a produção de combustíveis com baixa emissão de poluentes (Alves et al., 2021) e biopelletes para captura dos principais gases causadores do efeito estufa (Alves et al., 2022)

Ligado diretamente com a produção agropecuária, podemos citar trabalhos de SMS na incorporação de substratos para a produção de mudas (Meng et al., 2018), na proteção de plantas, aumentando a resistência ao ataque de pragas e doenças (Ashrafi et al., 2015; Noble et al., 2018).

Ainda temos a aplicação de SMS para melhorar a fertilidade do solo, resultando em promoção de crescimento e aumento de produtividade das plantas, por meio da construção e recuperação da matéria orgânica e da microbiota do solo (Becher et al., 2021, Yang et al., 2020).

Finalmente ainda se reporta que a interação microbiológica beneficia

microrganismos promotores de hormônios vegetais (Velazhahan et al., 2020).

2.4.EFEITO DO SMS NA FERTILIDADE E NA MICROBIOTA DO SOLO E PLANTA

A utilização deste material como condicionador de solo para a produção vegetal foi verificada em diversos países, devido sua elevada quantidade de macro e micronutrientes, alta capacidade de troca catiónica, pH próximo a neutralidade, além dos aspectos físicos que este material proporciona ao solo, como: aumento de porosidade e retenção de água e redução da compactação do solo (; Rinker, 2017; Becher et al.,2021; Meng et al., 2018; Leong et al., 2022).

Além destas características físico-químicas importantes, destaca-se as interações da comunidade microbiana no solo cultivado com esse tipo de manejo (Yang et al., 2020).

Os microrganismos que colonizam o SMS desempenham papel crucial na promoção do crescimento das plantas e nas propriedades de biocontrole do SMS (Velazhahan et al., 2020), além de aumentarem a produção de fitohormônios, moléculas vegetais chaves (Fontenelle et al., 2011). A microbiota do SMS também pode diminuir efeito tóxicos de moléculas tóxicas ao vegetal, condição que contribui para a saúde do cultivo e reduz o estresse ao vegetal (Zang et al., 2020).

A comunidade microbiana presente no substrato pós- cultivo de cogumelos, pode desempenhar um papel importante no controle da microbiota na região da rizosfera. *Bacillus cereus* é uma espécie comumente encontrada no substrato de cultivo de cogumelos que confere resistência em tomateiro contra várias espécies de patógenos, tanto de origem bacteriana como de origem fúngica (Romeiro et al., 2010).

Trichoderma spp. são espécies de fungos presentes no SMS que são amplamente conhecidas por sua capacidade endofítica, que melhora a absorção de nutrientes, biocontrole de fitopatógenos e auxilia no crescimento vegetal (Verma et al., 2017). Istifadah e Herawati (2021) isolaram diversos fungos e bactérias do SMS de *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* que apresentaram indução de resistência contra míldio no tomateiro.

Portanto, a microbiota do SMS pode ser um elicitor, e desencadear

mecanismos de defesa na planta, além das interações pertinentes da rizosfera poderem fornecer uma interação benéfica para o cultivo do milho.

2.5. MILHO E SUAS DIFICULDADES DE EXPANSÃO NA AGRICULTURA FAMILIAR

Dentre os cereais cultivados no Brasil, o milho é o mais expressivo, com estimativas de produção em cerca de 116,3 milhões de toneladas de grãos produzidos, em uma área de aproximadamente 19,93 milhões de hectares (CONAB, 2021), referentes a 1ª, 2ª e 3ª ciclo. Com suas particularidades fisiológicas, a cultura do milho tem alto potencial produtivo, com relatos de produtividade superior a 16 t ha⁻¹ (Alvarenga et al., 2010).

No entanto, o nível médio nacional de produtividade é baixo comparado com o teto que é cerca de 4,5 a 5,5 t ha⁻¹ na ciclo e safrinha (CONAB, 2021) demonstrando que os diferentes manejos de produção de milho deverão ser ainda bastante aprimorados para se obter aumento de produtividade e rentabilidade. Em específico, o estado de São Paulo se mantém muito próximo desta baixa média nacional, com produtividade estimada de cerca de 5,35 t ha⁻¹ (IEA, 2020).

Prioritariamente, grande parte da baixa tecnologia desenvolvida na cultura é empregada pela agricultura familiar, que é de subsistência em algumas regiões devida à dificuldade de gerir o negócio para fins lucrativos (Delgado et al., 2017).

A manutenção da fertilidade do solo provem suma importância, e é um dos fatores primordiais para o sucesso produtivo. Os fertilizantes minerais são responsáveis em incrementar a produtividade das culturas de 30 a 50% (Rehman et al., 2019). A aplicação de gesso agrícola fornece além de fontes de S e Ca, importantes nutrientes para o milho, reduz a toxicidade por Al³⁺ e disponibiliza vários nutrientes no subsolo (Khan e Jhan, 2018), além de promover uma melhoria da atividade microbiana no solo (Inagaki et al., 2016; Barcelos et al., 2021).

Porém, ambos insumos acrescentam custos elevados para sua obtenção, principalmente por ser fortemente dependente de importações dos insumos (Farias et al., 2020), e podem se tornar opções de baixa viabilidade para estes pequenos produtores.

Trabalhos demonstram que a adição de resíduos orgânicos ou minerais são ótimas alternativas de se elevar a produtividade do milho com a presença de fertilizantes NPK e/ou aplicação de gesso, em manejos consorciados ou cultivo solteiro (Geng et al., 2019; Senthikumar et al., 2021). Ressalta também que essas práticas podem melhorar o uso dos nutrientes e reduzir a emissão de gases do efeito estufa (Puga et al., 2020).

Portanto, é possível que a semeadura do milho nessas áreas pós colheita de Cogumelo do Sol possam diminuir e/ou extinguir a necessidade de fertilização da cultura do milho para essas regiões, tornando uma produção mais sustentável do cereal.

2.6. PROPOSTA DE UM NOVO SISTEMA INTEGRADO DE PRODUÇÃO PARA A AGRICULTURA FAMILIAR

Na literatura, a condição de reaproveitamento do SMS diretamente do solo, em modelos integrados agroalimentares é rara.

Como exemplo os manejos *Pleorutus*-Milho (Yang et al., 2020), *Pleurotus*-Feijão Fava (Hamed et al., 2021), *Volvariella*-Coco (Mohapatra e Niranjan, 2014) e *Morchella*-Pêssego (Song et al., 2021). Esses estudos foram recentemente publicados, porém todos foram realizados no continente Asiático ou Africano.

Além deste tipo de sistema ser pioneiro nas Américas, existe uma particularidade interessante de que o Cogumelo do Sol é um fungo nacional, de origem do Estado de São Paulo (Zied et al., 2017). Logo, tal sistema se caracteriza como de origem local, com todas as condições aptas para cultivo.

Em trabalho recente, Vieira Júnior (2021) demonstrou que o Cogumelo do Sol é um fungo que, no cultivo à campo é possível sua colheita somente nas épocas mais frias do ano (Outono-Inverno), para região de Dracena, São Paulo.

Trabalho como de Frias et al. (2019) que avaliou a produtividade do milho em manejos integrados com o cultivo de *Urochloa ruziziensis* na região da alta paulista demonstram que, apesar das condições ambientais desfavoráveis para a cultura na região, o milho pode alcançar médias maiores do que a nacional (acima dos 5,5 t ha⁻¹) em manejos integrados de produção.

O sistema integrado de produção Cogumelo do Sol-Milho (Figura 1)

contemporiza com as revisões publicadas de Hanafi et al. (2018), Leong et al. (2022) e Zied et al. (2020), que tratam o SMS como um subproduto de elevada exigência para manejos de economia circular, pois é um material fornecedor de fertilizante orgânico, agente de biocontrole e corretivo do solo.



Figura 1. Modelo de economia circular exemplificado em sistema integrado de produção Cogumelo do Sol-Milho

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarenga RC, Cruz JC, Viana JHM. (2010). Cultivo do milho. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**

Alves LS; Moreira BRA; Viana RS; Dias ES; Rinker DL.; Pardo-Gimenez A; Zied DC. (2022) Spent mushroom substrate is capable of physisorption-chemisorption of CO₂. **Environmental Research**, 204:11945

Alves LS; Moreira BRA; Viana RS; Pardo-Gimenez A.; Dias ES; Noble R; Zied DC. (2021) Recycling spent mushroom substrate into fuel pellets for low-emission bioenergy producing systems. **Journal of Cleaner Production**,127875

Ashrafi R; Rajib MRR; Sultana R; Rahman MM; Mian MH.; Shanta FH. (2015) Effect of spent mushroom compost on yield and fruit quality of tomato. **Asian Journal of Medical and Biological Research**, 1: 471–477

Banlangsawan N; Sripanidkulchai B; Sanoamuang N. (2016) Investigation of antioxidative, antityrosinase and cytotoxic effects of extract of irradiated oyster mushroom. **Songklanakarin J. Sci. Technol**,38: 31–39

Barcelos, J. P., Mariano, E., Jones, D. L., Rosolem, C. A. (2021). Topsoil and subsoil C and N turnover are affected by superficial lime and gypsum application in the short-term. **Soil Biology and Biochemistry**, 163:108456.

Becher M; Banach-Szott M; Godlewska A. (2021) Organic Matter Properties of Spent Button Mushroom Substrate in the Context of Soil Organic Matter Reproduction. **Agronomy**,11:204

Buswell JA. (1994) Potential of spent mushroom substrate for bioremediation purposes. **Compost Science & Utilization**, 2:31–36

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. (2021) Boletim- Ciclo de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/ciclos/graos/boletim-da-ciclo-de-graos>. Acessado em 05 de novembro de 2021.

Corrêa RCG; Silva BP; Castoldi R; Kato CG; Sá-Nakanishi AB; Peralta, RA; Souza CG; Bracht A.; Peralta RM. (2016) Spent mushroom substrate of *Pleurotus pulmonarius*: a source of easily hydrolyzable lignocellulose. **Folia microbiologica**, 61:439–448

Delgado GC; Bergamasco S. (2017) Agricultura familiar brasileira: desafios e perspectivas de futuro. **Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário**,470

Farias, P. I. V., Freire, E., Cunha, A. L. C. D., Grumbach, R. J. D. S., Antunes, A. M. D. S. (2020). The fertilizer industry in Brazil and the assurance of inputs for biofuels production: prospective scenarios after COVID-19. **Sustainability**, 12: 8889.

Fontenelle ADB; Guzzo SD; Lucon CMM; Harakava R. (2011) Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, 30:1492–1500

Freitas SM. (2021) PRONAF 21/22: o pilar da segurança alimentar “cada vez mais verde”. Análises e Indicadores do Agronegócio, São Paulo, 16:1-7 Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftp/iea/AIA/AIA-33-2021.pdf> acessado em: 24 de nov. de 2021.

Frias YA; Lima RC; Tomaz RS. (2019) Avaliação da produtividade de variedades de milho safrinha consorciado com *U. ruziziensis*, em SPD visando produção de grãos e de forragem, na região da Nova Alta Paulista. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 15:1

Grothe T; Stadler M; Kopcke B; Roemer E; Bitzer J; Wabnitz P; Kuper T. (2018) U.S. Patent No. 9,453,016. Washington, DC: U.S. **Patent and Trademark Office**.

Guanziroli CE; Buainain AM; Di Sabbato A. (2012) Dez anos de evolução da agricultura familiar no Brasil:(1996 e 2006). **Revista de Economia e Sociologia Rural**, 50:351–370

Hamed HA; Mohamed MF; El-Shaikh KA; Hosseney MH. (2020) Toward Optimizing Field Intercropping of Faba Bean and Edible *Pleurotus* Macro-fungi. **Asian Journal of Research and Review in Agriculture**, 2:90–100

Hanafi FHM; Rezania S; Taib SM; Din MFM; Yamauchi M; Sakamoto M; Hara H; Park J; Ebrahimi SS. (2018) Environmentally sustainable applications of agro-based spent mushroom substrate (SMS): an overview. **Journal of Material Cycles and Waste Management**, 20:1383–1396

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2017) Censo Agropecuário. Disponível em https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pdf/agricultura_familiar.pdf >. Acessado em 05 nov de 2021.

IEA, Instituto de Economia Agrícola. (2020). revisões e Estimativas das Safras Agrícolas do Estado de São Paulo, Ano Agrícola 2019/20. Disponível em: <https://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=14780>. Acessado em 23 dez 2021.

Inagaki TM; Moraes JC.; Caires EF; Gonçalves DRP. (2016) Lime and gypsum application increases biological activity, carbon pools, and agronomic productivity in highly weathered soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 231:156–165.

Istifadah, N.; Herawati, L. (2021) The Potential of Microbes Isolated from Spent Substrate of Shiitake and Oyster Mushrooms to Induce Resistance Against Early Blight Disease in Tomatoes. In: **10th International Seminar and 12th Congress of Indonesian Society for Microbiology (ISISM 2019)**.10: 80-85.

Leong YK; Ma T-W; Chang J-S; Yang, F-C. (2022) Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review. **Bioresource Technology**, 126:157

Levanon D.; Danai O. (1995) Chemical, physical and microbiological considerations in recycling spent mushroom substrate. **Compost Science & Utilization**, 3:72–79

Kwak, A. M et al. (2015) Water extract from spent mushroom substrate of *Hericium erinaceus* suppresses bacterial wilt disease of tomato. **Mycobiology**, 43:311-318

Malinowska E; Jankowski K. (2020) The Effect of Spent Mushroom Substrate and Cow Slurry on Sugar Content and Digestibility of Alfalfa Grass Mixtures. **International Journal of Agronomy**, 2020:90-100

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2021) PORTARIA SAF/MAPA Nº 123, DE 23 DE MARÇO DE 2021 Disponível em < <https://www.in.gov.br/web/dou/-/portaria-saf/mapa-n-123-de-23-de-marco-de-2021-310090949> > Acessado em 24 de novembro de 2021.

Meng L; Zhang S; Gong H; Zhang X; Wu C; Li W. (2018) Improving sewage sludge composting by addition of spent mushroom substrate and sucrose. **Bioresource technology**, 253:197–203

Meybeck A; Gitz V. (2017) Sustainable diets within sustainable food systems. **Proceedings of the Nutrition Society**, 76:1–11

Mohapatra KB; Niranjana C. (2014) Performance of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) raised as an intercrop in coconut plantations of coastal Odisha. In: Proceedings Of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (Icmbmp8), New Delhi, India, 19-22 November 2014. Volume I & II 2014, **Anais...**: ICAR-Directorate of Mushroom Research, 314-317.

Ngan NM; Riddech N. (2021) Use of spent mushroom substrate as an inoculant carrier and an organic fertilizer and their impacts on roselle growth (*hibiscus sabdariffa* L.) and soil quality. **Waste and Biomass Valorization**, 12:3801–3811.

Noble R; Dobrovinn-Pennington A; Fitzgerald J; Dew K; Wilson C; Ross K; Perkins C. (2018) Improving biocontrol of black vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus*) with entomopathogenic fungi in growing media by incorporating spent mushroom compost. **Biocontrol**, 63:697–706

Paula FS; Tatti E; Abram F; Wilson J; O'flaherty V. (2017) Stabilisation of spent mushroom substrate for application as a plant growth-promoting organic amendment. **Journal of environmental management**, 196:476–486

Puga AP; Grutmacher P; Cerri CEP; Ribeirinho VS; Andrade CA. (2020). Biochar-based nitrogen fertilizers: Greenhouse gas emissions, use efficiency, and maize yield in tropical soils. *Science of the Total Environment*, 704:135375.

Raij BVan; Cantarella H; Quaggio JA; Furlani AMC. (1997) **Boletim Técnico, 100. Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo**. Instituto Agrônomo, Campinas.

Rinker DL. (2017) Spent mushroom substrate uses. In.: Zied DC, Pardo-Giménez A. **Edible and medicinal mushrooms: technology and applications**, Wiley, Hoboken, p. 427–54.

Rehman, A et al. (2019) Fertilizer consumption, water availability and credit distribution: Major factors affecting agricultural productivity in Pakistan. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 18:269-274.

Romeiro RS; Lanna Filho R; Macagnan D; Garcia FA; Silva HS. (2010) Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassiicola*. **Tropical Plant Pathology**, 35:11–15.

Rosa-Schleich J; Loos J; Musshoff O; Tschardt T. (2019) Ecological-economic trade-offs of diversified farming systems—a review. **Ecological Economics**, 160:251–263

Saron F; Neto, CCN; Hespanhol AN. (2017) As dificuldades de implementação dos programas de apoio à agricultura familiar no Brasil. **Boletim de Geografia**, 35:1–16

Senthilkumar, I., Ramamoorthy, K., Rani, S., Maragatham, S. (2021). Effect of gypsum enriched poultry manure and graded levels of phosphorus on growth and yield of hybrid maize (*Zea mays* L.). **The Pharma Innovation Journal**, 10:1519-1553

Song H; Chen D; Sun S; Li J; Tu M; Xu Z; Gong R; Jiang G. (2021) Peach-*Morchella* intercropping mode affects soil properties and fungal composition. **PeerJ**, 9: e11705

Stoknes K; Scholwin F; Jasinska A; Wojciechowska E; Mleczek M; Hanc A; Niedzielski P. (2019) Cadmium mobility in a circular food-to-waste-to-food system and the use of a cultivated mushroom (*Agaricus subrufescens*) as a remediation agent. **Journal of Environmental Management**, 245:48–54

Tanumihardjo SA; McCulley L; Roh R; Lopez-Ridaura S; Palacios-Rojas N; Gunaratna N S. (2020) Maize agro-food systems to ensure food and nutrition security in reference to the Sustainable Development Goals. **Global Food Security**, 25:100327

Velazhahan R; Al-Mamari SNH.; Al-Sadi, AM; Al-Mahmooli IH; Babu SS. (2020) In vitro antagonistic potential, plant growth-promoting activity and indole-3-acetic acid producing trait of bacterial isolates from spent mushroom substrate of *Agaricus bisporus*. **Journal of Agricultural and Marine Sciences**, 25:22–29.

Verma NP; Kaur I; Masih H; Singh AK; Singla A. (2017) Efficacy of *Trichoderma* in controlling Fusarium wilt in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Research in Environment and Life Sciences**, 10:636–639

Vieira Júnior WG. (2021) **Caracterização genética e diferentes condições de cultivo em *Agaricus subrufescens***. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária)- Unesp, Jaboticabal

Wang H-W; Xu M; Cai X-Y; Tian F. (2021) Evaluation of soil microbial communities and enzyme activities in cucumber continuous cropping soil treated with spent mushroom (*Flammulina velutipes*) substrate. **Journal of Soils and Sediments**, 21:2938–2951.

Wang X-M; Zhang J; Wu L-H; Zhao Y-L.; Li T; Li J-Q; Wang Y-Z; Liu H-G. (2014) A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China. **Food chemistry**, 151:279–285.

Xu T; Beelman RB; Lambert JD. (2012). The cancer preventive effects of edible mushrooms. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, 12:255-1263.

Yang X; Wang Y; Sun L; Qi X; Song F; Zhu X. (2020) Impact of Maize–Mushroom Intercropping on the Soil Bacterial Community Composition in Northeast China. **Agronomy**, 10:1526

Zang, H et al. (2020) Bioremediation of historically chlorimuron-ethyl-contaminated soil by co-culture chlorimuron-ethyl-degrading bacteria combined with the spent mushroom substrate. **Microorganisms**, 8:369.

Zied DC; De Abreu CG; Alves LS; Prado EP; Pardo-Gimenez A; Melo PC; Dias ES. (2021) Influence of the production environment on the cultivation of lettuce and arugula with spent mushroom substrate. **Journal of Environmental Management**, 281:111799.

Zied DC; Sánchez JE; Noble R; Pardo-Giménez; A. (2020). Use of spent mushroom substrate in new mushroom crops to promote the transition towards a circular economy. **Agronomy**, 10:1239.

Zied, DC; Caitano, CE; Pardo-Gimenez, A; Dias, ES; Zeraik, ML; Pardo, JE. (2018) Using of appropriated strains in the practice of compost supplementation for *Agaricus subrufescens* production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, 2:26

Zied, DC; Pardo, JE; Tomaz, RS; Miasaki, CT; Pardo-Giménez, A. (2017) Mycochemical characterization of *Agaricus subrufescens* considering their morphological and physiological stage of maturity on the traceability process. **BioMed research international**, 2017:2713742.

CAPÍTULO 2 – ASPECTOS AGRONÔMICOS DO MILHO CULTIVADO EM SUCESSÃO AO COGUMELO DO SOL À CAMPO

RESUMO: Objetivou-se com o presente trabalho, avaliar o manejo integrado Cogumelo do Sol-milho como uma opção de cultivo sustentável de produção do cereal. O experimento foi desenvolvido à campo na cidade de Dracena, no 1º e 2º ciclos dos anos de 2020/2021, em um sistema contínuo de cultivo. Os experimentos consistiram de um fatorial duplo (2 x 4), sendo: gesso (presença e ausência) e manejo da fertilidade (tratamento controle, área pós cultivo de cogumelo 'SMS', área pós cultivo de cogumelo + adubação de semeadura 'SMS+S', área pós cultivo de cogumelo + adubação de semeadura + adubação de cobertura 'SMS+S+CB'). Se avaliou os atributos químicos do solo e folha (macronutrientes e matéria orgânica) e os aspectos produtivos do milho durante o cultivo. Os resultados demonstraram que apesar de condutividade elétrica e pH do solo estarem em níveis consideráveis para a produção do milho, os baixos teores de macronutrientes encontrados nas folhas e no solo cultivado sob a área pós cultivo de cogumelo foram pontos críticos para o cultivo. Entretanto, SMS+S+CB se mostrou mais eficiente que o controle em fornecer matéria seca de parte aérea (MSPA), e essa condição pode ser uma alternativa para um cultivo circular cogumelo-milho. SMS+S alcançou rendimentos e MSPA não diferentes significativos comparados ao controle, circunstância relevante ao produtor devidos aos custos e impactos causados pela fertilização de cobertura. SMS apresentou peso de 100 grãos (PCG) superiores ao controle no 1º ciclo, porém, o desempenho agrônomo e os teores de N foliar no 2º ciclo demonstraram que para se obter maiores produtividades a fertilização é de suma importância. A gessagem não apresentou incrementos produtivos relevantes em nenhum dos manejos testados. Conclui-se que o cultivo do milho em área pós cultivo de cogumelo do sol à campo é uma opção sustentável de produção, entretanto a fertilização se torna indispensável para reduzir as perdas de nutrientes. SMS+S se mostrou uma alternativa de redução da fertilização de cobertura, porém SMS+S+CB produz maior MSPA, condição que possibilita um sistema econômico circular na produção.

Palavras-chave: *Zea mays*, produtividade, composto exaurido de cogumelo, *Agaricus subrufescens*, manejo integrado de produção.

CHAPTER 2 – AGRONOMIC ASPECTS OF MAIZE GROWN IN SUCCESSION TO THE SUN MUSHROOM IN THE FIELD

ABSTRACT: his work aimed to evaluate the integrated management of Mushroom Sun-maize as an option for sustainable cultivation of cereal production. The experiment was carried out in the field in the city of Dracena, in the 1st and 2nd cycles of the years 2020/2021, in a continuous cultivation system. The experiments consisted of a double factorial (2 x 4), being: gypsum (presence and absence) and fertility management (control treatment, post-grow area of mushroom 'SMS', post-grow area of mushroom + fertilization of seeding 'SMS+ S', post-grow area of mushroom + sowing fertilization + top dressing 'SMS+S+CB'). The chemical attributes of the soil and leaves (macronutrients and organic matter) and the productive aspects of corn during cultivation were evaluated. The results showed that despite the electrical conductivity and soil pH being at considerable levels for corn production, the low levels of macronutrients found in the leaves and the soil cultivated under the mushroom post-growing area were critical points for cultivation. However, SMS+S+CB was more efficient than the control in providing shoot dry matter (MSPA), and this condition can be an alternative for a mushroom-maize circular crop. SMS+S achieved yields and MSPA not significantly different compared to the control, a relevant circumstance for the producer due to the costs and impacts caused by top dressing. SMS presented weight of 100 grains (PCG) superior to the control in the 1st cycle, however, the agronomic performance and the contents of foliar N in the 2nd cycle showed that to obtain higher yields, fertilization is of paramount importance. The gypsum did not show relevant productive increments in any of the tested managements. It is concluded that the cultivation of corn in an area after mushroom cultivation in the field is a sustainable production option, however fertilization becomes essential to reduce nutrient losses. SMS+S proved to be an alternative for reducing top dressing, but SMS+S+CB produces higher MSPA, a condition that allows for a circular economic system in production.

Keyword: *Zea mays*, yield, spent mushroom substrate, *Agaricus subrufescens*, integrated production management.

1. INTRODUÇÃO

O milho é a segunda cultura mais importante da agricultura brasileira. Dados mostram que este cereal representou 116,3 milhões de toneladas de grãos produzidos, em uma área de aproximadamente 19,93 milhões de hectares (CONAB, 2021). No entanto, a produtividade nacional está muito longe de países com alta competitividade. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos demonstra que EUA ($10,5 \text{ t ha}^{-1}$), Canadá ($9,2 \text{ t ha}^{-1}$), Argentina ($8,1 \text{ t ha}^{-1}$), e China ($6,3 \text{ t ha}^{-1}$) possui produtividades médias maiores que as obtidas no Brasil ($5,5 \text{ t ha}^{-1}$) (USDA, 2021).

Para a melhoria dessa condição, é necessário buscar soluções que aumentem a produtividade, sem causar danos ao ambiente, direcionadas principalmente a produtores com baixo nível tecnológico. Dentre as possíveis opções, destaca-se o manejo integrado de produção.

A produção que visa o manejo integrado agropecuário é mais eficiente, pois utiliza de forma consciente os recursos naturais, promove a ciclagem de nutrientes, melhora o solo, reduz custos de produção e eleva a produtividade (Rosa-Schleich et al., 2019).

Dentre a diversidade de possíveis manejos integrados de produção, a reutilização de áreas pós colheita de Cogumelo do Sol (*Agaricus subrufescens*) é fato inédito para o Brasil.

Depois da colheita dos basidiocarpos, a produção de Cogumelo do Sol produz diretamente no solo um composto exaurido, conhecido como *Spent Mushroom Substrate* (SMS). Este resíduo liberado diretamente ao solo exerce propriedades de promoção de crescimento vegetal, biocontrole de doenças e melhora as características físico-químico-biológicas do solo (Leong et al., 2022).

Por atualmente contribuírem por cerca de 30 a 50 % dos incrementos das culturas agrícolas (Rehman et al., 2019), a fertilização é pratica essencial para lavoura. A gessagem também se reporta como relevante condicionador do solo para se elevar a produtividade em solos tropicais (Khan e Jhan, 2018; Inagaki et al., 2016; Barcelos et al., 2021).

Porém, a alta do preço do petróleo e os custos de importações dos fertilizantes

(Farias et al., 2020), tornam essas tecnologias inacessíveis para diversos produtores no país. É possível que, a necessidade desses insumos possa ser reduzida e/ou mitigada com a adição do SMS para a fertilização do milho.

Apesar da literatura apresentar recentes trabalhos em manejos de produção cogumelo-vegetal (Mohapatra e Niranjana, 2014; Hamed et al., 2021; Yang et al., 2020; Song et al. 2021), em específico, a recuperação do SMS de *A. subrufescens* diretamente no solo em combinações com fertilizantes minerais para o cultivo do milho nunca foi reportado mundialmente.

Com isso, hipotetiza-se que a produção de milho seria beneficiada pelo a semeadura posterior a colheita dos basidiocarpos de *A. subrufescens*, e tal condição reduziria a necessidade de fertilizantes minerais no cultivo. A presente pesquisa tem como objetivo avaliar o desempenho agrônômicos da cultura do milho cultivada em uma área pós cultivo de Cogumelo do Sol à campo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

O experimento foi conduzido na cidade de Dracena, SP, (Latitude 21° 29' S e Longitude 51° 52' W, altitude média: 420 m), contendo dois cultivos sucessivos do milho, nos meses de agosto de 2020 à maio de 2021, em um ARGISSOLO VERMELHO Distrófico (Santos et al., 2018). Amostras de terra foram coletadas antes da instalação do experimento nas camadas de 0-20 e 20-40 cm de profundidade para a caracterização químicas do solo (Tabela 1).

O clima, segundo a classificação Köpen é Cwa (subtropical úmido), com verão quente e chuvoso de outubro a março e inverno seco e ameno com baixa precipitação pluvial de abril a setembro.

Tabela 1. Atributos químicos ⁽¹⁾ e granulometria do solo no tratamento controle e experimental nas camadas de 0-20 e 20-40 cm.

Área Controle							
Camada 0-20 cm	pH	M.O.	P ¹	S	Al ³⁺	H+Al	K
	CaCl ²	g dm ³	mg dm ³		mmol _c dm ³		
	5,0	8	4	17	0	16	1,1
	Ca	Mg	SB	CTC	V	m	
	mmol _c dm ³		%				
	16	7	24	40	60	0	
Camada 20-40 cm	pH	M.O.	P	S	Al ³⁺	H+Al	K
	CaCl ²	g dm ³	mg dm ³		mmol _c dm ³		
	4,5	6	2	5	3	17	1,1
	Ca	Mg	SB	CTC	V	m	
	mmol _c dm ³		%				
	11	3	15	32	47	17	
Área pós cultivo de cogumelo (SMS)							
Camada 0-20 cm	pH	M.O.	P	S	Al ³⁺	H+Al	K
	CaCl ²	g dm ³	mg dm ³		mmol _c dm ³		
	5,9	9	21	10	0	13	1,8
	Ca	Mg	SB	CTC	V	m	
	mmol _c dm ³		%				
	25	7	34	47	72	0	
Camada 20-40 cm	pH	M.O.	P	S	Al ³⁺	H+Al	K
	CaCl ²	g dm ³	mg dm ³		mmol _c dm ³		
	6,9	13	47	16	0	12	6,6
	Ca	Mg	SB	CTC	V	m	
	mmol _c dm ³		%				
	52	13	72	84	86	0	
Granulometria							
Camada 0-20 cm	Argila		Silte		Areia		
			g kg ⁻¹				
	130		20		850		
Camada 20-40 cm	Argila		Silte		Areia		
			g kg ⁻¹				
	160		35		805		

⁽¹⁾ Conforme descrito em Rajj et al. (2001). Fósforo extraído pelo método resina. **SB**, soma de bases; **CTC**, capacidade de troca catiónica; **V**, saturação por base; **m**, saturação por alumínio.

As médias anuais de temperatura são de 23,97°C e umidade relativa de 64,23%. A temperatura e precipitação média mensal durante o período

experimental (2020-2021) se encontra na Figura 1.

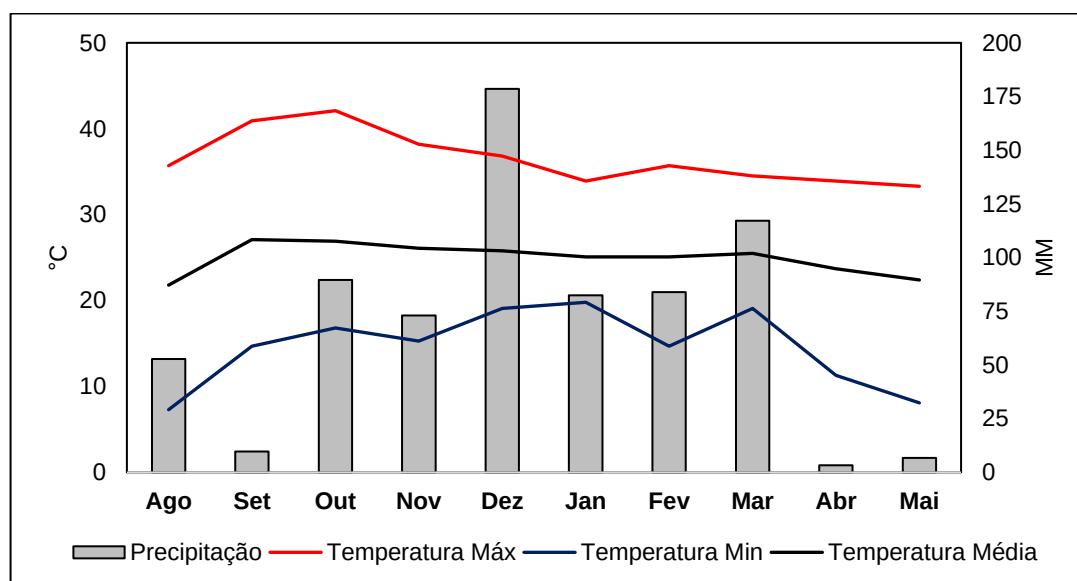


Figura 1. Precipitação pluvial e temperatura médias, mínimas e máximas durante a condução experimental em Dracena, São Paulo, Brasil. Os dados foram obtidos da estação meteorológica da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT-UNESP).

2.2 O CULTIVO DE COGUMELO DO SOL E PREPARO DA ÁREA

O cultivo de Cogumelo do Sol foi realizado entre os períodos de novembro de 2019 a julho de 2020 e são dados constituintes da pesquisa realizada por Vieira Júnior (2021). Resumidamente, foi adicionado composto colonizado de *A. subrufescens* em sulcos com cerca de 50 cm de largura e 30 cm de profundidade, espaçados em uma distância de 60 cm.

Uma camada de capim com cerca de 50 cm também foi utilizada por cima do sulco de cultivo, para evitar a perda de umidade do substrato no solo. As colheitas ocorreram periodicamente até o final do cultivo experimental.

Posterior a colheita de todos os basidiocarpos do cultivo e três semanas antecedente a semeadura do milho foi feita na área a operação agrícola mecanizada de subsolagem, gradagem profunda nos 40 centímetros superficiais do solo e posterior nivelamento, com o intuito de manter uma incorporação homogênea do SMS contido no solo.

Também foi aplicado calcário agrícola ($0,5 \text{ t ha}^{-1}$) entre as operações de gradagem e nivelamento, para elevar a saturação de base para 70% (Raij et al., 1997).

2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, FERTILIZAÇÃO E GESSAGEM

A experimentação foi realizada sob delineamento em blocos casualizados (DBC), em um esquema fatorial 4×2 (manejos do SMS e aplicação do gesso agrícola). Os tratamentos foram descritos como:

T1- Controle Experimental (Controle), fertilização adicionada seguindo as recomendações de adubação no milho para o Estado de São Paulo, popularmente conhecido como Boletim 100 (Raij et al., 1997).

T2- Controle Experimental + aplicação de gesso agrícola (G+Controle), baseado nas recomendações de Vitti et al. (2008).

T3- Semeadura do milho na área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral (SMS)

T4- Semeadura do milho na área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura recomendada pelo Boletim 100, somente (SMS+S)

T5- Semeadura do milho na área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura + fertilização de cobertura recomendada pelo Boletim 100 (SMS+S+CB).

T6- Semeadura do milho na área pós cultivo de *A. subrufescens* + aplicação de gesso agrícola (G+SMS)

T7- Semeadura do milho na área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura recomendada pelo Boletim 100 + aplicação de gesso agrícola (G+SMS+S)

T8- Semeadura do milho na área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura + fertilização de cobertura recomendada pelo Boletim 100 + aplicação de gesso agrícola (G+SMS+S+CB)

Os dois cultivos (1º e 2º cultivo) foram cultivadas sucessivamente após a colheita do Cogumelo do Sol. Cada cultivo possuía 4 blocos experimentais, constituindo 32 parcelas por experimentação.

Como fonte de fertilização de N, P e K, foram utilizados os adubos ureia (45% N), superfosfato triplo (46% P_2O_5) e cloreto de potássio (60% K_2O), respectivamente. Para as parcelas experimentais que continham fertilizantes na sementeira (Controle, G+Controle, SMS+S, G+SMS+S, SMS+S+CB e G+SMS+S+CB) foram adicionados 30 kg ha^{-1} de N (produtividade média esperada de 6000 kg), 90 kg ha^{-1} (área controle) e 50 kg ha^{-1} de P_2O_5 (área experimental SMS) e 50 kg ha^{-1} de K_2O (Raij et al. 1997).

Para as parcelas experimentais que continham fertilizantes na cobertura (Controle, G+Controle, SMS+S+CB e G+SMS+S+CB), além da fertilização de sementeira citada anteriormente, foi adicionado 60 kg ha^{-1} de N e 20 kg ha^{-1} de K_2O . A fertilização foi realizada em dois momentos, aos 30 dias após a sementeira (DAS) e 45 DAS, dividida igualmente.

Foi aplicado e incorporado antes da sementeira de cada experimento, 1200 kg ha^{-1} de gesso agrícola (15 % S), em função da textura média do solo experimental (16% a 35% de argila) (Vitti et al., 2008).

Esses procedimentos foram adotados para o 1^a ciclo e 2^a ciclo sucessivo do milho. O esquema das etapas pré experimental até o preparo e instalação das parcelas semeadas são apresentados na Figura 2.



Figura 2. Etapas pré experimental e instalação das parcelas: Sulco para recebimento do composto de colonizado (a), canteiros de produção de cogumelo a campo (b), colheita de cogumelos *A. subrufescens* (c). Preparo da área experimental (d), aplicação de gesso nas parcelas (e), abertura de sulcos, adubação e sementeira (f), área experimental semeada (g).

2.5 CONDUÇÃO EXPERIMENTAL

As etapas sobre o cultivo do milho (Figura 4) seguiram as técnicas de semeadura, tratos culturais, colheita e beneficiamento amplamente descritos pelo Boletim 100 (AGUIAR, 2014). As plantas daninhas que surgiram durante os dois cultivos foram controladas com capina manual, seguindo as premissas de período crítico de interferência (PCI) da cultura (Kozlowski, 2002).

Entre a colheita da 1º ciclo e semeadura do 2º ciclo foi realizada a aplicação do herbicida Reglone® (DIQUAT, 2 L ha⁻¹) com o intuito de dessecação das plantas daninhas para a semeadura do 2º cultivo.



Figura 4. Parcelas experimentais aos 15 DAS (1º ciclo) e 80 DAS (2º ciclo).

O monitoramento integrado de pragas e doenças (MIPD) foi realizado, ocorrendo somente uma aplicação do inseticida Engeo Pleno™ S (TIAMETOXAM+LAMBDAHALOTRINA, 200 mL ha⁻¹) para controle do percevejo-gaúcho (*Leptoglossus zonatus*).

A irrigação do experimento foi feita por meio de microaspersores (4,5 L por hora) em função de deficits hídricos durante todo o período experimental. Ao final de sua maturação fisiológica, as espigas foram colhidas e os aspectos agronômicos avaliados.

2.6 PARÂMETROS AVALIADOS

2.6.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS

Na fase de espigamento das duas duplicatas, foi mensurado o Índice de Clorofila Falker (ICF) através do clorofilômetro (modelo SPAD-502/FALKER), seguindo a metodologia adaptada de Argenta et al. (2001).

A colheita foi feita aos 118 dias após a semeadura (DAS) para a 1ª ciclo e 125 DAS para a 2ª ciclo. Foram avaliadas oito plantas, escolhidas aleatoriamente, descartados as bordaduras, de cada parcela experimental.

Foram avaliados os seguintes parâmetros biométricos e produtivos do milho: altura de planta (H) (cm por planta), altura da inserção da 1ª espiga (H1E) (cm por planta), diâmetro do caule (D) (mm por planta), matéria seca de parte aérea (MSPA) (g por planta); número de espigas por planta (NEP) (unidade por planta); número de fileiras na espiga (NFE); massa de espiga empalhada (ESP) (g por planta), peso de cem grãos (P100) (g por planta) e rendimento de grãos (REND) (kg ha^{-1}) considerando a correção da umidade para 13%.

Os resultados foram mensurados com o auxílio de uma balança de precisão digital (modelo SF400) e analítica (modelo CBRN11988), fita métrica graduada e paquímetro digital (ABSOLUTE- Multitoyo).

2.6.2. CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E pH DO SOLO

A análise de condutividade elétrica (CE) e pH de cada parcela foi realizada em triplicata, utilizando o método descrito por Carmo e Silva (2016).

Na determinação do pH em água e da CE, utilizou-se a relação solo: água de 1:2,5 (10 cm^3 de TFSA: 25ml de água). A mistura solo-água foi agitada por 30 min, mantida em repouso por 30 min e agitada por 30 s. Em seguida, procedeu-se à leitura do pH e da CE. A CE foi determinada em condutímetro TEC-4MP (Tecnal Equipamentos Científicos) e o pH em pHmetro de bancada (Gehaka PG 2000).

2.6.3. ANÁLISES MINERAL DE SOLO E FOLHA

Ao final de cada ciclo da cultura do milho foi avaliada a quantidade de matéria orgânica (MO) e os teores de macronutrientes (P, K, Ca, Mg e S) no solo conforme protocolos analíticos descrito por Raji et al. (2001). Para tal, foram realizadas amostragens do solo na camada de 0-20 cm, sendo coleta dos três pontos na entrelinha de cultivo dentro da área útil da parcela para formar uma amostra composta.

Para avaliar o estado nutricional da cultura do milho, foi realizada amostragem da folha oposta à espiga superior no momento que 50% das plantas (folha diagnose) encontravam-se pendoadas (Malavolta et al., 1997). Foram coletadas quatro folhas por parcelas, que compuseram uma amostra composta por parcela.

Depois de lavadas, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar, à temperatura de 65°C por 72 h, trituradas em moinho tipo Willey e armazenadas até o momento das análises. Nas amostras das folhas diagnose foram determinados os teores de N, P, K, Ca, Mg e S, conforme metodologia descrita por Malavolta et al. (1997).

2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias obtidas comparadas pelo teste *t*-Student (LSD) para o fator aplicação de gesso (sem gessagem e com gessagem), e teste Tukey para o fator manejo de fertilidade (controle, SMS, SMS+S e SMS+S+CB), ambos testes a 5% de probabilidade, realizadas no software SisVar versão 5.7.91. Para a confecção das figuras se utilizou o software GraphPad Prism v.9.

3. RESULTADOS

3.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS

Os dados agronômicos referentes a altura (H), altura de inserção da 1ª espiga (H1ESP), diâmetro (D), número de espigas por planta (NEP), número de folhas (NF)

e massa de espiga empalhada (MEE) obtidos na 1º e 2º ciclo estão presentes na Tabela 2.

Observou-se que os valores de NF, H e ICF obtiveram médias significativas para efeito isolado da gessagem. A aplicação de gesso decresceu em 0,6 NF avaliadas do 1º ciclo. Entretanto, a gessagem incrementou em cerca de 3,3% para H obtido no 2º ciclo e 2,51 ICF no 1º ciclo.

Os resultados obtidos em H, H1ESP, NF e MEE na semeadura em áreas pós cultivo de cogumelo do Sol sem nenhuma fertilização (SMS) não diferiram do tratamento com fertilização mineral recomendada (Controle). Entretanto, no 2º cultivo, o controle foi superior cerca de 13,14% e 18,84% comparado ao tratamento SMS para D e ICF, respetivamente.

A adição da fertilização mineral, somente em semeadura (SMS+S) ou presente em semeadura e cobertura (SMS+S+CB) não demonstraram diferença significativa para D, NEP, NF e MEE comparada ao controle.

Destaca-se também que no 1º ciclo, SMS+S+CB incrementou H1ESP em 0,06 m, além de aumentar cerca de 5,2 % NF obtido, ambas variáveis comparadas a média obtida para tratamento controle.

SMS+S+CB apresentou destaque com a maior média obtida para ICF no 1º ciclo. Já no 2ª ciclo, o ICF obtido por plantas cultivadas em parcelas sob efeito de SMS+S+CB não diferiram do controle experimental.

Tabela 2. Altura (H), inserção da 1ª espiga (H1ESP), número de espigas por planta (NEP), número de fileiras por espiga (NF), massa de espiga empalhadas (MEE) e índice de clorofila FALKER (ICF) de milho em 2 ciclos em área pós cultivo de Cogumelo do Sol.

Tratamentos	1ª ciclo			2ª ciclo		
	Gesso		Média	Gesso		Média
	G+	G-		G+	G-	
H (m por planta)						
Controle	2,00 Aab	2,03 Aa	2,01	2,20 a	2,09	2,14 a
SMS	1,88 Ab	2,06 Aa	1,97	2,06 b	2,07	2,07 ab
SMS+S	2,37 Aa	2,01 Ba	2,19	2,09 ab	2,02	2,05 b
SMS+S+CB	2,11 Aab	2,19 Aa	2,15	2,16 ab	2,07	2,12 ab
Média	2,09	2,07		2,13 A	2,06 B	
C.V.		22,24			8,78	
H1ESP (m por planta)						
Controle	0,87 Aab	0,80 Bb	84,0 b	0,75	74,0	74,0 a
SMS	0,82 Bb	0,89 Aab	85,0 ab	0,73	70,0	71,0 ab
SMS+S	0,93 Aa	0,82 Bb	88,0 ab	0,72	73,0	73,0 ab
SMS+S+CB	0,88 Aab	0,93 Aa	90,0 a	0,69	67,0	68,0 b
Média	0,86	0,88		0,72	0,71	
C.V.		14,60			16,25	
D (mm por planta)						
Controle	19,09 Ba	18,41 Aab	18,75 ab	20,76 a	19,06	19,91 a
SMS	16,46 Ab	18,39 Aab	17,42 b	16,77 b	17,62	17,19 b
SMS+S	18,40 Aab	17,15 Ab	17,77 b	18,89 ab	18,16	18,51 ab
SMS+S+CB	18,66 Aa	19,8 Aa	19,23 a	19,38 a	18,24	18,78 ab
Média	18,15	18,44		18,93	18,27	
C.V.		16,47			20,01	
NEP (unidade por planta)						
Controle	1,37	1,34	1,35	1,25	1,09	1,17
SMS	1,59	1,56	1,57	1,06	1,06	1,06
SMS+S	1,34	1,56	1,39	1,12	1,06	1,09
SMS+S+CB	1,50	1,68	1,59	1,18	1,15	1,17
Média	1,43	1,50		1,15	1,09	
C.V.		29,01			20,45	
NF (g por planta)						
Controle	13,96 Ab	15,06 Ba	14,51 b	14,98	14,56	14,76
SMS	14,43 Aab	14,87Aa	14,54 ab	14,81	15,18	15,00
SMS+S	14,68 Bab	15,56 Aa	15,12 ab	14,81	14,33	14,59
SMS+S+CB	15,34 Aa	15,31 Aa	15,32 a	14,68	14,96	14,82
Média	14,60 B	15,20 A		14,82	14,75	
C.V.		10,13			9,04	
MEE (g por planta)						
Controle	170,62 Aa	130,93 Bb	150,78 ab	191,87 a	137,50	164,68
SMS	102,1 Bb	147,8 Aab	125,0 b	134,06 b	138,43	136,25
SMS+S	158,75 Aa	138,12 Ab	148,43 ab	134,06 b	127,57	130,76
SMS+S+CB	157,50Aa	184,37 Aa	170,93 a	164,06 ab	159,37	161,71
Média	147,26	150,31		156,01	140,62	
C.V.		46,67			42,46	
ICF (por planta)						
Controle	51,16 b	48,51 ab	49,83 b	45,09 Aa	41,09 Ba	43,09 a
SMS	47,26 b	48,33 b	47,66 b	32,88 b	36,22 b	34,97 b
SMS+S	50,26 b	46,21 b	49,83 b	31,09 b	33,18 b	32,37 b
SMS+S+CB	60,33 Aa	54,48 Ba	57,40 a	42,67 a	41,88 a	42,67 a
Média	51,96 A	49,45 B		38,77	37,71	
C.V.		12,10			19,61	

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste *t* (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, Controle= Fertilização de semeadura e cobertura recomendada segundo o Boletim 100, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

Os valores obtidos de MSPA, PCG, PROD e REND estão presentes na Tabela 3. Observa-se que nas principais características produtivas agrônômicas avaliadas, a aplicação de gesso não apresentou efeito significativo.

Tabela 3. Matéria seca de parte aérea (MSPA), massa de 100 grãos (PCG), produtividade por planta (PROD) e rendimento (REND) do milho em 2 ciclos em área pós cultivo de Cogumelo do Sol.

Manejo do resíduo	1º ciclo			2º ciclo		
	Gesso		Média	Gesso		Média
	G+	G-		G+	G-	
MSPA (g por planta)						
Controle	205,62 Ba	169,68Ab	187,65 ab	234,68 ab	209,06 b	221,87 ab
SMS	122,50 Ab	175,0 Bb	148,75 c	199,68 ab	199,06	199,37 b
SMS+S	188,12 a	159,68 b	173,90 bc	189,84 b	208,78 b	199,46 b
SMS+S+CB	194,06 a	225,5 a	208,28 a	242,34 a	259,68 a	251,01 a
Média	177,57	181,71		216,64	219,06	
C.V.		37,87			34,00	
PCG (g por 100 grãos)						
Controle	17,42 b	18,10	17,77 b	27,59 a	25,80 a	26,69 a
SMS	19,96 Aa	18,57 B	19,26 a	23,12 b	24,47 ab	23,79 b
SMS+S	17,03 Bb	18,54 A	17,79 b	23,24 b	22,46 b	26,10 b
SMS+S+CB	19,35 Aa	17,33 B	18,34 ab	26,41 a	25,79 a	26,10 a
Média	18,45	18,14		25,09	24,61	
C.V.		14,67			13,28	
REND (kg ha ⁻¹)						
Controle	6395,76 Aa	4687,45 Bb	5541,61 ab	6278,90	5617,96 ab	5948,43 ab
SMS	3708,29 Bb	5666,61Aab	4687,45 b	5146,13	5232,42 b	5189,27 b
SMS+S	6041,60 a	5249,94ab	5645,77ab	5204,88	5216,28 b	5210,67 b
SMS+S+CB	5916,60 a	6729,09 a	6322,85 a	6260,54	6958,20 a	6609,37 a
Média	5515,56	5583,27		5722,61	5752,03	
C.V.		43,11			35,00	

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, Controle= Fertilização de semeadura e cobertura recomendada segundo o Boletim 100, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

O tratamento SMS obteve, para efeitos isolados do manejo de resíduo, a maior média de PCG para o 1º ciclo (19,26 g), valor esse cerca de 8,3% maior que o tratamento controle. Porém, no somatório do 1º e 2º ciclo, observa-se que os valores encontrados de PCG, MAS e REND não foram incrementados comparadas ao controle (Figura 5).

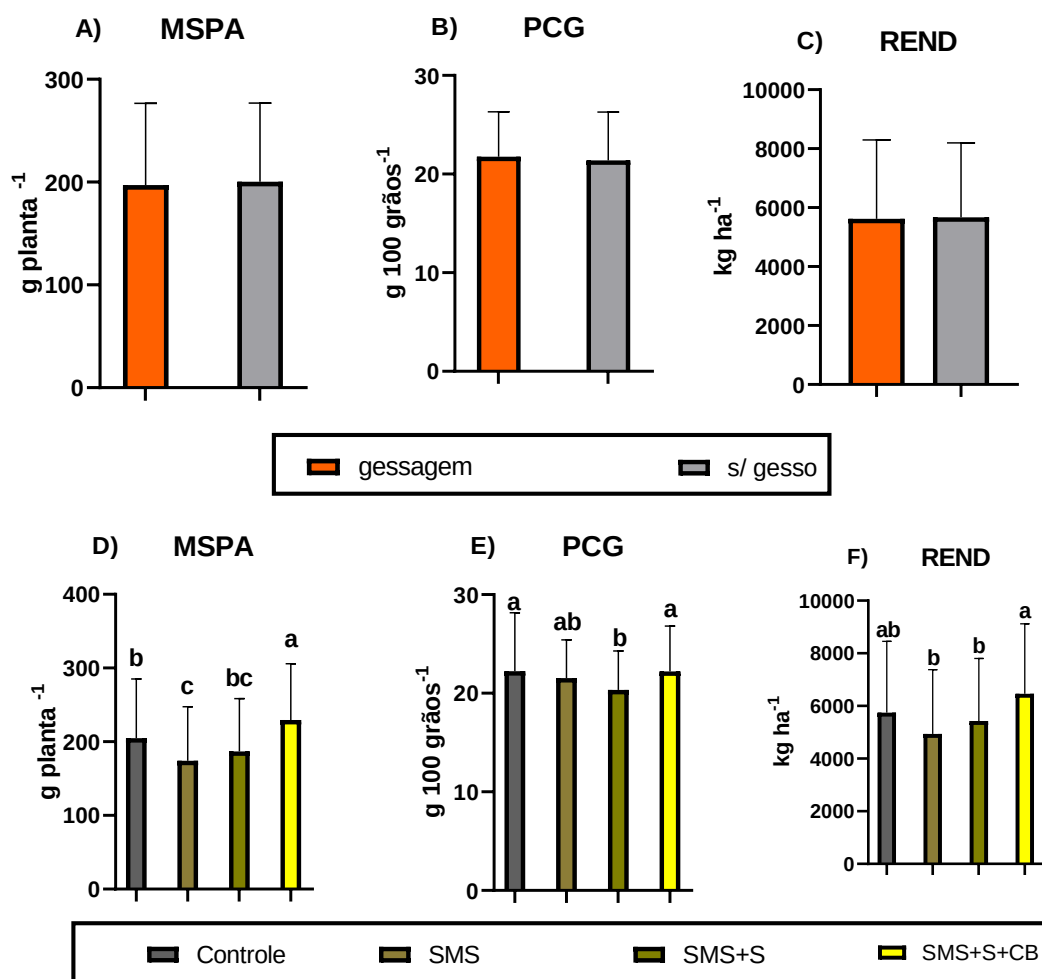


Figura 5. Matéria seca de parte aérea (MSPA) (A) e (D); peso de 100 grãos (PCG) (B) e (E); e rendimento (REND) (C) e (F) de 2 ciclos de milho em sucessão cultivado sob área pós cultivo de cogumelo. Letras minúsculas distintas entre barras diferem, segundo teste Tukey ($p>0,05$). Controle= Fertilização de semeadura e cobertura recomendada segundo o Boletim 100, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S + CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

Observa-se também que, em efeitos desdobrados, a aplicação de gesso para o tratamento SMS reduziu a MSPA e REND no 1º ciclo em cerca de 30,0 e 34,5%, efeitos não observados para o 2º ciclo (Tabela 3).

A fertilização de semeadura na área após o cultivo de cogumelos (SMS+S) não diferiu de controle experimental para os valores de MSPA e REND, em ambos

ciclos (Tabela 3).

Ressalta-se que, foram obtidos para SMS+S valores de REND de mais de 6000 kg ha⁻¹, no 1º ciclo, sob efeitos desdobrados com a presença de gesso. Esses efeitos contribuíram para que, no somatório dos ciclos, não houvesse diferença significativa entre os diferentes manejos adotados (Figura 5).

Entretanto, o PCG obtido em SMS+S foi reduzido no 2º ciclo na comparação com controle em cerca 3,84 g (efeitos isolados, Tabela 3), tal condição citada reflete na redução apresentada na Figura 5 (Gráfico E) quando somadas os cultivos experimentais do milho.

Foi possível observar que, os ciclos sucessivos em área pós cultivo de cogumelo com a fertilização de semeadura e cobertura (SMS+S+CB) aumentaram MSPA no 1º e 2º ciclo (Tabela 3) e em ambos somados (Figura 5). O tratamento SMS+S+CB incrementou em média cerca de 55,58 g por planta comparadas ao controle (Figura 5, Gráfico D). O PCG e REND não apresentaram diferença média significativas comparadas ao controle para este tratamento.

3.2. CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E pH DO SOLO

Observa-se na Tabela 4 os valores médios de condutividade elétrica e pH da solução do solo obtidos na experimentação.

Durante os cultivos foi observado que, os valores médios de pH e CE foram reduzidos. Inicialmente, pH e CE obtiveram no 1º ciclo valores de 6,37 e 130,18 $\mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente, enquanto os valores do 2º ciclo resultaram em pH de 6,27 e CE de 89,36 $\mu\text{S cm}^{-1}$.

A aplicação de gesso influenciou na CE (2ª ciclo). Foi possível observar que a gessagem incrementou em cerca de 19,52 $\mu\text{S cm}^{-1}$ a CE.

O SMS também impactou em pH e CE. Foram observados os maiores valores de pH no 1ª ciclo para as parcelas cultivadas sob os tratamentos SMS e SMS+S (6,62 e 6,48, respectivamente). O maior valor obtido no 2ª ciclo de CE foi referente as

médias de parcelas cultivadas em áreas pós cultivo de cogumelo.

Tabela 4. Condutividade elétrica e pH do solo de 2 ciclos de milho em sucessão cultivado sob área pós cultivo de cogumelo

Manejo do resíduo	1ª ciclo			2ª ciclo		
	Gesso		Média	Gesso		Média
	G+	G-		G+	G-	
pH em H ₂ O						
Controle	6,20 bc	6,30	6,25 bc	6,26 A	6,01 Bb	6,14 b
SMS	6,69 a	6,55	6,62 a	6,21	6,36 a	6,28 ab
SMS+S	6,45 ab	6,51	6,48 ab	6,38	6,32 a	6,35 a
SMS+S+CB	5,89 Bc	6,42 A	6,15 c	6,26	6,37 a	6,32 a
Média	6,31	6,44		6,28	6,26	
C.V.		3,98			1,97	
CE (µS cm ⁻¹)						
Controle	96,00 Bb	168,75 Aa	132,37 ab	74,75 b	62,75	68,75 b
SMS	146,0 a	123,00 ab	134,50 ab	136,25 a	86,25	111,25 a
SMS+S	96,75 b	93,25 b	95,00 b	70,25 b	81,15	75,70 b
SMS+S+CB	232,25 Aa	85,50 Bb	158,87 a	115,25 a	88,25	101,75 a
Média	142, 75	117,62		99,12 A	79,60 B	
C.V.		27,35			20,03	

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, Controle= Fertilização de semeadura e cobertura recomendada segundo o Boletim 100, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

3.3. MATÉRIA ORGÂNICA E TEORES DE NUTRIENTES NO SOLO E NAS FOLHAS

Os resultados de matéria orgânica e teores de nutrientes do solo e folha estão contidos nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

De acordo com Raij et al. (1997) a interpretação do solo inicial (Tabela 1) apresentou para o solo controle na camada de 0-20 cm teores muito baixos e baixos para P e K, teores médios para Mg e teores elevados para Ca e S. Para a área SMS, os teores foram apresentados como médios para P, K e Mg, e elevados para Ca e S.

Apesar dos teores dos macronutrientes serem inicialmente incrementados (P e K passaram de muito baixo e baixo respectivamente, para teores médios) com a adição do cultivo do cogumelo na área, de forma geral, as classificações de interpretação avaliadas foram prejudicadas, para todos nutrientes (exceto Mg, no 1º ciclo, para tratamento SMS, que passou de teores médios para elevados)

Tabela 5. Teores de matéria orgânica e macronutrientes do solo em cultivo milho em 1ª e 2ª ciclo em área após o cultivo de Cogumelo do Sol em função dos tratamentos avaliados

Tratamentos	1º ciclo			2º ciclo		
	Gesso		Média	Gesso		Média
	+	-		+	-	
Matéria orgânica (g dm ⁻³)						
Controle	7,28	8,78	8,03	9,00	8,14	8,57
SMS	9,00	9,21	9,10	8,78	10,28	9,53
SMS+S	8,46	7,71	8,08	7,92	11,03	9,48
SMS+S+CB	8,03	6,85	7,44	8,67	7,49	8,08
Média	8,19	8,14		8,59	9,24	
C.V.		23,51			18,49	
Fósforo (mg dm ⁻³)						
Controle	4,91	4,87	4,89	4,84 b	4,85	4,84 b
SMS	5,04	5,09	5,06	4,90 ab	4,95	4,92 a
SMS+S	5,00	4,91	4,95	4,92 ab	4,91	4,91 ab
SMS+S+CB	4,90	4,90	4,90	4,98 a	4,92	4,95 a
Média	4,96	4,94		4,91	4,91	
C.V.		2,12			0,63	
Potássio (mmol _c dm ⁻³)						
Controle	1,93	1,77	1,85	1,29	1,15	1,22
SMS	1,67	2,35	2,01	1,07	1,93	1,50
SMS+S	1,79	1,52	1,66	1,38	2,01	1,69
SMS+S+CB	1,07	1,74	1,41	1,37	1,59	1,48
Média	1,61	1,85		1,28	1,67	
C.V.		27,85			24,94	
Cálcio (mmol _{cwe} dm ⁻³)						
Controle	28,66	28,75	28,90	15,37	19,06	17,22 b
SMS	92,94	50,34	71,64	37,70	32,52	35,11 a
SMS+S	58,66	34,25	46,45	27,33	30,84	29,09 ab
SMS+S+CB	37,77	30,58	34,18	35,20	30,35	32,77 ab
Média	54,51	35,98		28,90	28,19	
C.V.		48,92			24,55	
Magnésio (mmol _c dm ⁻³)						
Controle	7,77	5,87	6,82	5,73	4,80	5,27
SMS	7,40	9,58	8,49	5,68	4,44	5,06
SMS+S	6,65	6,79	6,72	6,79	4,37	5,58
SMS+S+CB	4,57	6,96	5,76	5,97	4,96	5,46
Média	6,60	7,30		6,04 A	4,64 B	
C.V.		19,55			8,88	
Enxofre (mg dm ⁻³)						
Controle	2,00 b	12,05 a	7,06 a	1,53 b	4,86	3,20
SMS	2,97 b	2,74 b	2,86 b	9,84 a	2,21	6,03
SMS+S	5,14 a	1,71 b	3,43 b	3,01 b	1,46	2,24
SMS+S+CB	6,44 a	2,30 b	4,37 b	4,22 ab	1,43	2,82
Média	4,14	4,70		4,65	2,49	
C.V.		15,28			38,77	

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

Comparados com o controle, de acordo com o teste estatísticos proposto, nota-se que as reduções de P e Ca foram menos drásticas para o tratamento SMS

(2º ciclo). Os teores de Ca para SMS foram cerca de 50% maior do que controle.

Os teores médios de macronutrientes foliares avaliados seguem na Tabela 6.

Tabela 6. Teores de macronutrientes foliares do cultivo de milho em 1º e 2º ciclo em área após o cultivo de Cogumelo do Sol em função dos tratamentos avaliados

Manejo do SMS	Análise. Mineral Foliar					
	1ª ciclo			2ª ciclo		
	Gesso		Média	Geso		Média
	+	-		+	-	
Nitrogênio (g kg ⁻¹)						
Controle	10,85	12,60	11,72	15,40 a	14,00	14,70 a
SMS	13,30	11,20	12,25	10,50 b	12,60	11,55 b
SMS+S	11,55	14,00	12,77	11,20 b	13,30	12,25 ab
SMS+S+CB	11,20	14,00	12,60	13,30 ab	15,40	14,35 a
Média	11,72	12,95		12,60	13,82	
C.V.		13,4			8,79	
Fosforo (g kg ⁻¹)						
Controle	1,43	1,32	1,37	1,14	1,14	1,14
SMS	1,21	1,22	1,21	1,31	1,21	1,26
SMS+S	1,33	1,38	1,35	1,28	1,13	1,21
SMS+S+CB	1,29	1,20	1,25	1,28	1,35	1,32
Média	1,32	1,28		1,26	1,21	
C.V.		11,94			12,97	
Potássio (g kg ⁻¹)						
Controle	8,86	8,43	8,65	4,40	8,76	6,58
SMS	7,46	4,20	5,83	7,41	4,87	6,14
SMS+S	7,58	7,19	7,38	6,90	7,70	7,30
SMS+S+CB	8,03	9,86	8,94	8,06	7,36	7,71
Média	7,98	7,42		6,69	7,17	
C.V.		28,75			22,70	
Cálcio (g kg ⁻¹)						
Controle	1,33	1,22	1,28	2,02	4,52	3,27
SMS	1,40	1,52	1,46	1,32	1,08	1,20
SMS+S	1,43	1,41	1,42	1,26	0,94	1,10
SMS+S+CB	1,53	2,44	1,98	1,61	1,48	1,58
Média	1,42	1,65		1,55	2,00	
C.V.		60,04			65,16	
Magnésio (g kg ⁻¹)						
Controle	5,91	6,44	6,17	12,20	19,34	15,77
SMS	5,73	5,50	5,62	4,23	5,71	4,97
SMS+S	6,77	6,69	6,73	6,90	4,29	5,59
SMS+S+CB	6,59	12,88	9,74	10,08	10,35	10,21
Média	6,25	7,88		8,35	9,92	
C.V.		60,51			58,06	
Enxofre (g.kg ⁻¹)						
Controle	1,17	1,14	1,16	1,08	1,18	1,13
SMS	1,39	1,06	1,23	1,35	1,09	1,22
SMS+S	1,23	1,19	1,21	1,36	1,11	1,23
SMS+S+CB	1,16	1,13	1,15	1,07	1,22	1,14
Média	1,13	1,24		1,21	1,15	
C.V.		9,35			10,54	

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

Assim como no solo, os teores de suficiência dos macronutrientes (Malavolta et al., 1997) se mantiveram abaixo do adequado para todos os macronutrientes (exceto para Mg).

Perante ao teste estatístico proposto, nota-se somente diferença estatística para teores de N foliar (Tabela 6). Foram obtidas reduções de $3,15 \text{ g kg}^{-1}$ de N para o tratamento SMS (sem fertilização), comparado ao controle experimental, no 2º ciclo, demonstrando a sensibilidade do fornecimento de N sem a fertilização mineral.

4 DISCUSSÃO

4.1. CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS

O gesso além de fonte de enxofre para o milho, tem o objetivo de melhorar as condições físicas do solo e proporcionar um ambiente favorável ao crescimento e desenvolvimento das lavouras (Khan e Jan, 2018). A gessagem, apresentou alguns acréscimos agronômicos como os reportados para H (2º ciclo) e ICF (1º ciclo) (Tabela 2), porém insuficientes para obter significância em MSPA, PCG ou REND.

Avaliando a resposta da aplicação de gesso em um sistema produtivo em Argissolo de textura arenosa sob plantio direto no bioma Pampa Brasileiro, Alves et al. (2021) obtiveram efeitos adversos nos rendimentos do milho com a prática da gessagem nos primeiros cultivos avaliados.

Alves et al. (2021) ainda sugerem que em solos de textura arenosa, com CTC baixa ($<70,5 \text{ mmol c dm}^{-3}$) não seriam adequadas a aplicação de gesso para o aumento do rendimento das culturas. A mesma condição se aplica a área experimental estudada, e justifica os resultados obtidos neste trabalho.

A semeadura em áreas pós cultivo de cogumelo sem fertilização obteve um PCG superior no 1º ciclo (Tabela 3) além de não diferir estaticamente o PCG e REND no somatório dos ciclos para o tratamento controle (Figura 5).

Gobbi et al. (2015) demonstraram que o SMS é um substituto adequado para

fertilizantes minerais para alface e alho-poró. Este estudo sugere que, é possível obter rendimentos interessantes para a produção sem a fertilização mineral, porém insuficientes para se elevar a produtividade ao longo dos ciclos.

Cabe ressaltar ainda que, esse resultado possivelmente não foi mais expressivo que o comparado a literatura, pois a área não tinha histórico agrícola, e possuía condições de degradação e baixos teores de P e K no solo (Tabela 1).

Comparado o rendimento com outros resíduos utilizados para fertilização no Estado de São Paulo como o Biochar, um produto rico em carbono obtido por pirólise, Puga et al. (2020) encontraram rendimentos médios de 5026 kg ha⁻¹ para o milho aplicado Biochar em combinação com fertilização nitrogenadas e potássicas em semeadura e cobertura.

O resultado dessa pesquisa para o tratamento somente com SMS obteve rendimentos médios de 4938,36 kg ha⁻¹, sem nenhuma fertilização mineral aplicada, destacando a boa condição agrônômica proporcionada pela reutilização dessa área e que o desempenho do SMS como fertilizante orgânico para a produção de milho a princípio é satisfatório.

O SMS é uma fonte de matéria orgânica estabilizada, através de um longo processo de compostagem realizada antes do cultivo (Paula et al., 2017). Becher et al. (2021) demonstraram que SMS de *Agaricus bisporus* é rico em matéria orgânica e ácidos húmicos, caracterizando a alta qualidade do resíduo para introdução direta ao solo. O *A. bisporus* é um cogumelo que possui os processos de compostagem, adição de camada de cobertura e colheita semelhantes ao cogumelo *A. subrufescens* (Dias et al., 2013), acarretando em resíduo com propriedades físico-químicas semelhantes.

A fertilização de semeadura (SMS+S) e cobertura (SMS+S+CB) acarretaram nos principais incrementos agrônômicos obtidos presentes nas Tabelas 3 e 4. Destaca-se também a maior média significativa de MSPA obtidas para o tratamento SMS+S+CB, além dos resultados indiferentes de MSPA e REND obtidos por SMS+S, comparados ao controle, ao longo dos ciclos (Figura 5).

Os benefícios de práticas de adição de fertilizantes minerais associados à prática de aplicação do SMS já são conhecidos pela literatura, como mostram os

trabalhos de Coles et al. (2020), Zied et al. (2021) e Kwiatkowski e Harasim (2021).

No cultivo do milho no Estado de São Paulo, cerca de 65 e 28 % da adubação nitrogenada e potássica recomendada pelo Boletim 100, respectivamente, são aplicadas em cobertura (Raij et al., 1997). Rabelo et al. (2017) considerou que a aplicação de ureia e cloreto de potássio para o milho custa ao produtor cerca de 35,63% dos custos de insumos, o que gera um montante de R\$937,20/ha (R\$ 665,00 provenientes dos custos de aquisição da ureia e R\$272,20 restante do cloreto de potássio).

Portanto, uma redução da fertilização de cobertura geraria uma economia de R\$ 486,69/ha, situação possível com a recuperação de áreas de cogumelo com parte da fertilização recomendada somente na semeadura (SMS+S).

Cabe ressaltar ainda que, a fertilização de cobertura contribui para a emissão de gases poluentes do aquecimento global (Lykhovyd, 2021) perda de parte da lavoura por injúrias causadas pelo maquinário e custos com mão de obra (Wang et al., 2015). Logo sugere-se que a redução da fertilização de cobertura no milho em manejo de áreas após o cultivo do cogumelo do sol possa ser relevante para se aumentar a sustentabilidade sem reduções drásticas nos principais atributos agronômicos do milho.

Ressalta-se também que é possível implementar um modelo eficiente para produção de Cogumelo do Sol-Milho com o manejo baseado no tratamento SMS+S+CB, devido aos incrementos significativos de MSPA. Coles et al. (2020) em trabalho de aplicação de SMS de *A. bisporus* no milho em sistema de plantio direto, demonstrou que a retirada de 70 a 100% da palha de milho gerada no campo para a produção do cogumelo não afeta a sua produtividade, quando fertilizada com SMS.

A fertilização de cobertura acrescenta maior quantidade de palha (diretamente correlacionada com MSPA) em áreas que contem o SMS, que por sua vez, pode ser reutilizada para a produção de substratos para os cogumelos, e ao final do ciclo, se tornam fertilizantes orgânicos para o milho e propiciam uma economia circular na produção. Esse sistema apresenta uma maior vantagem ainda pois, os resíduos no início do cultivo, são dispostos diretamente ao solo.

4.2. CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E pH DO SOLO

O pH do solo é provavelmente a medição mais informativa que pode ser feita para determinar as características do solo de acidez por H^+ (Thomas, 1996).

A faixa de valores de pH obtida neste trabalho (5,89 a 6,69) se classificam em uma faixa de valores de acidez fraca (Vasconcellos et al., 1982). Sirisuntornlak et al. (2020) reporta que o pH ligeiramente ácido é o mais adequado para a produção do milho. Portanto, apesar de médias significativas, o resultado de pH obtidos nesta pesquisa se mantém dentro dos limites aceitáveis.

A CE é uma medida substituta de salinidade (Corwin, Yemoto, 2020). Foi reportado essa preocupação por diversos autores com a utilização de SMS para fertilização vegetal, por sua composição possuir elevados teores de sais, principalmente os altos teores K disponível (Meng et al., 2018; Meng et al., 2019; Hřebečková et al., 2020)

A faixa de valores de CE obtidos nesta experimentação foi entre 62,75 (para controle, sem aplicação de gesso, no 2º ciclo) e 235,25 $\mu S\ cm^{-1}$ (para SMS+S+CB, com aplicação de gesso, no 1ª ciclo). Oliveira et al. (2002) obtiveram uma CE para latossolos sob nenhum efeito de fertilização valores entre 70,8 a 127,3 $\mu S\ cm^{-1}$.

Para um solo ser considerado salino deve possuir CE maior que 4000 $\mu S\ cm^{-1}$ (Pereira, 1998). O SMS de *Agaricus subrufescens* avaliado isoladamente possui CE maior que 4000 $\mu S\ cm^{-1}$ (Hřebečková et al., 2020), condição 17 vezes maior do que a mais elevada CE obtida nesta pesquisa.

O solo apresentou um efeito redutor do potencial de salinidade do resíduo, condição interessante para a implantação do sistema integrado nessas áreas. Os solos da região do Oeste Paulista, em grande parte são caracterizados como áreas marginalizadas, e são um problema por serem caracterizados improdutivos e suscetíveis a degradação e erodibilidade (Cordeiro e Echer, 2019).

4.3. MATÉRIA ORGÂNICA E TEORES DE NUTRIENTES NO SOLO E NAS FOLHAS

Foi possível somente observar efeito do gesso para os teores de Mg no solo (1º ciclo) (Tabela 5).

O gesso não possui MgO em sua composição e o mesmo é responsável pela lixiviação de cátions para as camadas mais profundas do solo, tais como Al^{3+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} (Bossolani et al., 2018).

Gesso aplicado sucessivamente também fornece Ca^{2+} , que em altas quantidades no solo, promove a lixiviação de Mg^{2+} (Prakash et al., 2020), condição não observada nessa pesquisa.

Experimentos avaliando a aplicação de gesso demonstram que Mg é reduzido, e não incrementado com a gessagem (Alves et al., 2021; Pias et al., 2020), contrariando os resultados obtidos neste trabalho.

Portanto, sugere-se que novos estudos sobre os efeitos do gesso em manejos que possuem o SMS por longos ciclos possam ser interessantes para elucidação destes mecanismos.

Os níveis de N foliares foram os menores obtidos quando plantas de milho foram cultivadas sob tratamento SMS, no 2ª ciclo (Tabela 6). Nitrogênio é o nutriente mais importante para as plantas, pois desempenha um papel vital no crescimento e desenvolvimento vegetal (Louarn et al., 2021)

O SMS de *A. subrufescens* não é um bom fornecedor de N, e em um período inicial apresenta até taxas de imobilização de N (Hřebečková et al., 2020, Medina et al., 2012; Stewart et al., 1997).

Lou et al. (2017) avaliaram a composição de diversos compostos exaurido de cogumelos e concluíram que o uso combinado de ureia com o SMS fornece ao solo um N mineral aprimorado por mais tempo, justificando os teores de N superiores obtidos em SMS+S e SMS+S+TD no 2ª ciclo.

5 CONCLUSÃO

O manejo integrado do milho reaproveitando as áreas após colheita de *A. subrufescens* se manteve em faixas de pH e CE adequadas para o desenvolvimento do milho.

A adição de gesso em associação com SMS não promoveu melhora nos principais parâmetros agronômicos avaliados.

O manejo SMS+S+CB demonstrou-se uma alternativa para produzir maior MSPA do que somente a fertilização recomendada mineral. Essa condição possibilita desenvolver modelos econômicos circulares entre cogumelo-milho.

Somente a fertilização de semeadura (SMS+S) não difere estatisticamente no somatório dos ciclos para os componentes produtivos MSPA e REND. Entretanto, os teores de nitrogênio foliar foram mais prejudicados na ausência da fertilização mineral de cobertura, o que pode se tornar crítico para a produção do cereal.

O milho semeado nas áreas após a colheita de *A. subrufescens* apresentou dados produtivos relevantes para o Estado de São Paulo, porém em termos de fertilidade do solo e nutrição vegetal não supriu adequadamente as necessidades da cultura.

Sugere-se para estudos futuros, além da incorporação de outras culturas, como as leguminosas no manejo integrado, em específico, a disponibilidade mineral durante o desenvolvimento vegetal e a quantidade de extração e exportação dos nutrientes para se compreender a dinâmica mineral no ciclo produtivo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, L. A., Tiecher, T. L., Flores, J. P. M., Filippi, D., Gatiboni, L. C., Bayer, C., Tiecher, T. (2021). Soil chemical properties and crop response to gypsum and limestone on a coarse-textured Ultisol under no-till in the Brazilian Pampa biome. **Geoderma Regional**, 25:e00372.

Argenta G; Silva PRFD; Bortolini CG; Forsthofer EL; Strieder ML. (2001) Relação da leitura do clorofilômetro com os teores de clorofila extraível e de nitrogênio na folha de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, 13:158–167.

Arruda MR; Moreira A.; Pereira JCR. (2014) Amostragem e cuidados na coleta de solo para fins de fertilidade, Embrapa, 2014. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1007420>>. Acesso em: 5 nov. 2021.

Barcelos, J. P., Mariano, E., Jones, D. L., Rosolem, C. A. (2021). Topsoil and subsoil C and N turnover are affected by superficial lime and gypsum application in the short-term. **Soil Biology and Biochemistry**, 163:108456.

Becher M; Banach-Szott M; Godlewska A. (2021) Organic Matter Properties of Spent Button Mushroom Substrate in the Context of Soil Organic Matter Reproduction. **Agronomy**, 11: 204

Bossolani JW.; Lazarini E; Santos FL; Sanches IR; Meneghette HHA.; Parra LF; Souza LGM. (2018) Surface Reapplication of Lime and Gypsum on Maize Cultivated Sole and Intercropped with Urochloa. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 49:855–1868.

Carmo, DL; Silva, CA. (2016) Condutividade elétrica e crescimento do milho em solos contrastantes sob aplicação de diversos níveis de calagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51:762–1772

Coles PS; Nogin G; Fidanza M; Roth, G. (2020) Evaluation of Fresh Mushroom Compost in a Field Corn Production System. **Compost Science & Utilization**, 28:76–86.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento (2021) Boletim- Ciclo de grãos. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/ciclos/graos/boletim-da-ciclo-de-graos>. Acessado em 05 de novembro de 2021.

Cordeiro, CFS, Echer FR. (2019). Interactive effects of nitrogen-fixing bacteria inoculation and nitrogen fertilization on soybean yield in unfavorable edaphoclimatic environments. **Scientific reports**, 9:1-11.

Corwin DL; Yemoto K. (2020) Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. **Soil Science Society of America Journal**, 84:1442–1461

Dias ES; Zied DC; Rinker DL. (2013) Physiologic response of *Agaricus subrufescens*

using different casing materials and practices applied in the cultivation of *Agaricus bisporus*. **Fungal Biology**, 117:569–575.

Farias, P. I. V., Freire, E., Cunha, A. L. C. D., Grumbach, R. J. D. S., Antunes, A. M. D. S. (2020). The fertilizer industry in Brazil and the assurance of inputs for biofuels production: prospective scenarios after COVID-19. **Sustainability**, 12: 8889.

Gobbi V; Bonato S; Nicoletto C; Zanin G. (2016) Spent mushroom substrate as organic fertilizer: vegetable organic trials. **Acta Horticulturae**, 1146:49–56

Hamed HA; Mohamed MF; El-Shaikh KA; Hosseney MH. (2020) Toward Optimizing Field Intercropping of Faba Bean and Edible *Pleurotus Macro-fungi*. **Asian Journal of Research and Review in Agriculture**, 2020:90–100

Hřebečková T; Wiesnerová L; Hanč A. (2020) Change in agrochemical and biochemical parameters during the laboratory vermicomposting of spent mushroom substrate after cultivation of *Pleurotus ostreatus*. **Science of The Total Environment**, 739:140085

Inagaki TM; Moraes JC.; Caires EF; Gonçalves DRP. (2016) Lime and gypsum application increases biological activity, carbon pools, and agronomic productivity in highly weathered soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 231:156–165.

Khan MI, Jan A. (2018). Impact of Soil Conditioning and Irrigation Regimes on the Performance of Maize Crop. **Sarhad Journal of Agriculture**, 34:173-187.

Kozłowski, L. A (2002). Período crítico de interferência das plantas daninhas na cultura do milho baseado na fenologia da cultura. **Planta Daninha**, 20:365–372

Kwiatkowski CA; Harasim E. (2021) The Effect of Fertilization with Spent Mushroom Substrate and Traditional Methods of Fertilization of Common Thyme (*Thymus vulgaris* L.) on Yield Quality and Antioxidant Properties of Herbal Material. **Agronomy**, 11: 329

Leong YK; Ma T-W; Chang J-S; Yang F-C. (2022) Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): A review. **Bioresource Technology**, 344:126157.

Lou Z; Sun Y; Zhou X.; Baig SA; Hu B; Xu X. (2017) Composition variability of spent mushroom substrates during continuous cultivation, composting process and their effects on mineral nitrogen transformation in soil. **Geoderma**, 307:30–37.

Louarn, G., Bedoussac, L., Gaudio, N., Journet, E. P., Moreau, D., Jensen, E. S., Justes, E. (2021). Plant nitrogen nutrition status in intercrops—a review of concepts and methods. **European Journal of Agronomy**, 124:126229.

Lykhovyd, P. (2021) Crop production and land use inputs to global warming. **International Journal of Modern Agriculture**, 10: 4706–4714.

Malavolta E; Vitti GC; Oliveira SA. (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.

Medina E; Paredes C; Bustamante MA; Moral R; Moreno-Caselles J. (2012). Relationships between soil physico-chemical, chemical and biological properties in a soil amended with spent mushroom substrate. **Geoderma**, 173:152-161.

Meng X; Dai J; Zhang Y; Wang X; Zhu W; Yuan X; Yuan H; Cui Z. (2018) Composted biogas residue and spent mushroom substrate as a growth medium for tomato and pepper seedlings. **Journal of Environmental Management**, 216:62–69.

Meng X; Liu B; Zhang H; Wu J; Yuan X; Cui Z. (2019) Co-composting of the biogas residues and spent mushroom substrate: Physicochemical properties and maturity assessment. **Bioresource Technology**, 276:281–287.

Mohapatra KB; Niranjana C. (2014) Performance of straw mushroom (*Volvariella volvacea*) raised as an intercrop in coconut plantations of coastal Odisha. In: Proceedings Of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (Icmbmp8), New Delhi, India, 19-22 November 2014. **Anais....** ICAR-Directorate of Mushroom Research, 314-317.

Oliveira FC; Mattiazzi ME; Marciano CR; Rossetto R. (2002). Efeitos de aplicações sucessivas de lodo de esgoto em um Latossolo Amarelo distrófico cultivado com cana-de-açúcar: carbono orgânico, condutividade elétrica, pH e CTC. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, 26:505-519.

Paula FS; Tatti E; Abram F; Wilson J; O'flaherty V. (2017) Stabilisation of spent mushroom substrate for application as a plant growth-promoting organic amendment. **Journal of Environmental Management**, 196:476–486.

Pereira, JR (1998). **Solos afetados por sais** In: Recomendação de Adubação para o estado de Pernambuco. Embrapa/CPATSA. p. 76-82.

Pias OHC; Tiecher T; Cherubin MR; Silva AGB; Bayer, C. (2020) Does gypsum increase crop grain yield on no-tilled acid soils? A meta-analysis. **Agronomy Journal**, 112:675–692

Prakash NB; Dhumgond P; Shruthi TC; Ashrit S. (2020) Performance of Slag-Based Gypsum on Maize Yield and Available Soil Nutrients over Commercial Gypsum under Acidic and Neutral Soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, 51:1780–1798.

Puga AP; Grutzmacher P; Cerri CEP; Ribeirinho VS; Andrade CA. (2020). Biochar-based nitrogen fertilizers: Greenhouse gas emissions, use efficiency, and maize yield in tropical soils. **Science of the Total Environment**, 704:135375.

Rabelo CG; Souza LH; Oliveira FG. (2017) Análise dos custos de produção de silagem de milho: estudo de caso. **Caderno de Ciências Agrárias**, 9:8–15.

Raij BVan; Andrade JC; Cantarella H; Quaggio JA. (2001) **Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais**. Instituto Agronômico, Campinas. 285p.

Raij BVan; Cantarella H; Quaggio JA; Furlani AMC. (1997) **Boletim Técnico, 100. Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo**. Instituto Agronômico, Campinas. 154p.

Rosa-Schleich J; Loos J; Musshoff O; Tschardt T. (2019) Ecological-economic trade-offs of Diversified Farming Systems – A review. **Ecological Economics**, 160:251–263

Rehman, A et al. (2019) Fertilizer consumption, water availability and credit distribution: Major factors affecting agricultural productivity in Pakistan. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, 18:269-274.

Santos, H. G.; Jacomine, P. K. T.; Anjos, L. H. C.; Oliveira, V. A.; Lumberras, J. F.; Coelho, M. R.; Almeida, J. A.; Cunha, T. J. F.; Oliveira, J. B. (2018) **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. rev. e ampl. Brasília: Embrapa.

Sirisuntornlak N; Ullah H; Sonjaroon W; Anusontpornperm S; Arirob W; Datta A. (2021). Interactive effects of silicon and soil pH on growth, yield and nutrient uptake of maize. **Silicon**, 13:289-299.

Song H; Chen D; Sun S; Li J; Tu M; Xu Z; Gong R; Jiang G (2021). Peach-Morchella intercropping mode affects soil properties and fungal composition. **PeerJ**, 9:e11705

Stewart DPC; Cameron KC; Cornforth IS; Main BE. (1997) Release of sulphate, potassium, calcium and magnesium from spent mushroom compost under laboratory conditions. **Biology and Fertility of Soils**, 26:146–151.

Thomas G W. 1996. Soil pH and soil acidity. In Sparks D L, Page A L, Helmke P A, Loeppert R H, Soltanpour P N, Tabatabai M A, Johnston C T, Sumner M E (eds.) **Methods of soil analysis: part 3 chemical methods**. Madison, Wisconsin. pp.475–490.

USDA- United States Department of Agriculture (2021). **World Agricultural Production**. Circular Series. 41 p. Disponível em < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> > Acessado em 25 de novembro de 2021.

Vasconcellos CA; Santos HI; Franca GE. (1982) Adubação e calagem na cultura do sorgo. **RECOMENDAÇÕES PARA O CULTIVO DO SORGO**. Circular Técnica, EMBRAPA/CNPMS, 1:21-30.

Vieira Junior WG. (2021) Caracterização genética e diferentes condições de cultivo em *Agaricus subrufescens*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) Unesp, Jaboticabal

Vitti GC; Luz PHC; Malavolta E; Dias AS; Serrano CGE. (2008) Uso do gesso em sistemas de produção agrícola. GAPE. Piracicaba.

Wang Y; Bian Y; Xu H. (2015) Water use efficiency and related pollutants' abatement costs of regional industrial systems in China: a slacks-based measure approach. **Journal of Cleaner Production**, 101:301-310.

Yang X; Wang Y; Sun L; Qi X; Song F.; Zhu X. (2020) Impact of Maize–Mushroom Intercropping on the Soil Bacterial Community Composition in Northeast China. **Agronomy**, 10:1526.

Zied DC; De Abreu CG; Alves LS; Prado EP; Pardo-Gimenez A; Melo PC; Dias ES. (2021) Influence of the production environment on the cultivation of lettuce and arugula with spent mushroom substrate. **Journal of Environmental Management**, 281:111799

CAPÍTULO 3 – ASPECTOS MICROBIANOS E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFITICOS DO MILHO CULTIVADO EM SUCESSÃO AO COGUMELO DO SOL À CAMPO

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi estimar a microbiota do solo do cultivo do milho em manejo integrado com *A. subrufescens*, a frequência de colonização endofítica e o potencial biotecnológico de isolados fúngicos, em um sistema contínuo de cultivo. O experimento ocorreu em dois cultivos (1º e 2º ciclo), em um sistema contínuo (cogumelo-milho-milho), posterior a colheita do Cogumelo do Sol. Os experimentos consistiram de um fatorial duplo (2 x 4), sendo: gesso (presença e ausência) e manejo da fertilidade (tratamento controle, área pós cultivo de cogumelo 'SMS', área pós cultivo de cogumelo + adubação de semeadura 'SMS+S', área pós cultivo de cogumelo + adubação de semeadura + adubação de cobertura 'SMS+S+CB'). No estágio VT da cultura foram avaliados via diluição seriada, unidade formadora de colônia do solo (UFC), frequência endofítica (FC) de fungos e bactérias, e os fungos endofíticos isolados provenientes do efeito de áreas pós cultivo de cogumelo foram selecionados e avaliados patogenicidade, crescimento micelial e taxa de crescimento (TCM). Foi observado que a aplicação de gesso e fertilizantes influencia nas unidades formadora de colônia (UFC) obtidas no 1ª ciclo de milho, porém essas diferenças são mitigadas no 2º ciclo. A FC bacteriana não diferiu em nenhum tratamento proposto para efeitos isolados nos dois ciclos. Entretanto a FC fúngica da raiz foi mais elevada em tratamentos que foram semeados em área pós cultivo de cogumelo e FC fúngica foliar reduzida quando aplicado gesso. Cerca de 95% dos isolados endofíticos obtidos não apresentaram patogenicidade e se mostraram promissores em meios de cultivo *in vitro*. O I 38 apresentou o maior crescimento micelial em 48 e 72 h, além do maior TCM obtido. Conclui-se que as práticas antrópicas de manutenção da fertilidade e aplicação de gesso afetam a microbiota do solo e endofítica e que as áreas pós cultivo de cogumelo do sol favorecem a UFC e FC radicular para fungos. Grande parte dos isolados endofíticos fúngicos obtidos nessa pesquisa não patogênicos e alguns possuem ótimas características de crescimento micelial *in vitro*.

Palavras-chave: microbiologia do solo, potencial biotecnológico, micobioma, endofitismo, diluição seriada.

CHAPTER 3 – MICROBIAL ASPECTS AND BIOTECNOLOGIC POTENTIAL OF ENDOPHYTIC FUNGI ON MAIZE CULTIVATED IN SUCCESSION TO THE SUN MUSHROOM IN THE FIELD

ABSTRACT: The objective of the present work was to estimate the soil microbiota of maize cultivation in an integrated system with *A. subrufescens*, the frequency of endophytic colonization and the biotechnological potential of fungal isolates. The experiment took place in duplicate (1st and 2nd corn) in a continuous cultivation system. The experiments consisted of a double factorial (2 x 4), being: gypsum (presence and absence) and fertility management (control 'recommended fertilization', mushroom post-growing area 'SMS', mushroom post-growing area + sowing fertilization 'SMS+S', post-fertilization area. mushroom cultivation + sowing fertilization + top dressing 'SMS+S+CB'). In the maize tassel stage, they were evaluated via serial dilution, soil colony forming unit (CFU), endophytic frequency (FC) of fungi and bacteria, and endophytic fungi isolated from the effect of post-growing mushroom areas were selected and evaluated for pathogenicity, mycelial growth and growth rate (TCM). It was observed that the application of gypsum and fertilizers influence the CFU obtained in the 1st corn crop, but these differences are mitigated in the 2nd crop. Bacterial FC did not differ in any treatment proposed for isolated effects in the two crops. However, root fungal FC was higher in treatments that were sown in an area after mushroom cultivation and leaf fungal FC reduced when gypsum was applied. About 95% of the endophytic isolates obtained were not pathogenic and showed promise *in vitro* culture media. I 38 showed the greatest mycelial growth at 48 and 72 h, in addition to the highest TCM obtained. It is concluded that the anthropic practices of maintenance of fertility and application of gypsum affect the soil and endophytic microbiota and that the areas after cultivation of mushroom of the sun favor the CFU and FC root for fungi. Most of the fungal endophytic isolates obtained in this research are non-pathogenic and some have excellent *in vitro* mycelial growth characteristics.

Keywords: soil microbiology, biotechnological potential, mycobiome, endophytism, serial dilution

1. INTRODUÇÃO

Micróbios dominam a biodiversidade do planeta e impulsionam as funções essenciais do sistema terrestre (Geisen, 2021). Essa microbiota é fonte de produtos biotecnológicos, porém são processos complexos que exigem compreensão das comunidades ecológicas (Sessitsch et al., 2019).

Estimativas dessa comunidade microbiana presente no solo podem ser realizadas com técnicas de diluição seriada e contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Atrelado a essa condição, microrganismos presentes em tecidos internos vegetais, conhecidos como endofíticos, também são influenciados por efeitos diretos no solo e podem ser mensurados (Anjum et al., 2019).

Endofíticos são capazes de elicitar hormônios vegetais e compostos benéficos, controlar pragas e doenças e, conseqüentemente, promover o crescimento vegetal (Bilal et al., 2018; Huang et al., 2020; Rai et al., 2021).

Os fungos são um importante grupo dentro desses microrganismos. Estima-se que fungos endofíticos têm se associados a plantas há mais de 400 milhões de anos (Krings et al., 2007). Grande gama desses fungos são Ascomycota, porém é possível encontrar diversos táxons de Basidiomycota, Zygomycota e Oomycota (Sun e Guo, 2012).

O milho é um dos cereais mais cultivados no mundo (USDA, 2021), o qual possui diversos trabalhos referente a utilização de fungos endofíticos como promotor de crescimento (Mehmood et al., 2018; Jan et al., 2019; Miirsam et al., 2021). Porém, a literatura é escassa sobre o impacto do resíduo pós colheita de cogumelo (conhecido Spent Mushroom Substrate - SMS) na cultura do milho.

Em contrapartida, pesquisadores já demonstraram que o SMS pode aprovisionar uma microbiota que promova o crescimento vegetal e o antagonismo contra fitopatógenos (Wang et al., 2020; Singh et al., 2021). O tradicional promotor de crescimento vegetal encontrado no SMS, é o *Trichoderma*, já reportado endofiticamente em outras pesquisas (Singh et al., 2018).

Com isso, este trabalho hipotetiza-se que a microbiota do solo e endofítica

possam ser incrementadas quantitativamente, e que esses microrganismos isolados possuem características relevantes para o cultivo do milho. O objetivo da pesquisa é estimar a microbiota do solo cultivável da produção de milho em manejo integrado com *A. subrufescens*, a frequência de colonização endofítica e o potencial biotecnológico *in vitro* de isolados fúngicos endofíticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. LOCAL DA EXPERIMENTAÇÃO

O experimento foi conduzido à campo, e as análises foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia Agropecuária e na Clínica de Fitopatologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, da Universidade Estadual Paulista - Campus Dracena (Latitude 21° 29' S e Longitude 51° 52' W, Altitude média: 420m).

2.2. CONDUÇÃO DA EXPERIMENTAÇÃO A CAMPO

O experimento realizado compreende ao Capítulo 2 descrito neste trabalho. Resumidamente, foram conduzidos em uma área pós cultivo de Cogumelo do Sol, o híbrido de milho K9606 VIP da KWS®, por duas ciclos consecutivas. Foi adotado o delineamento em blocos causalizados (DBC), em fatorial 4 x 2 (quatro manejos de SMS x com e sem aplicação de gesso agrícola), contendo quatro repetições e totalizando 32 unidades experimentais por ciclo.

Os tratamentos foram descritos como: T1- Controle Experimental (Controle), fertilização seguindo as recomendações do Boletim 100 (Raij et al., 1997); T2- Controle Experimental + aplicação de gesso agrícola (G+Controle) baseado nas recomendações de Vitti et al. (2008); T3- Semeadura do milho na área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral (SMS); T4- SMS+ fertilização de semeadura recomendada pelo Boletim 100, somente (SMS+S); T5- SMS+S +

fertilização de cobertura recomendada pelo Boletim 100 (SMS+S+CB); T6- SMS + aplicação de gesso agrícola (G+SMS); T7-SMS+S + aplicação de gesso agrícola (G+SMS+S) e T8- SMS+S+CB + aplicação de gesso agrícola (G+SMS+S+CB).

Os experimentos foram conduzidos entre os meses de agosto de 2020 a maio de 2021.

2.3. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Para realizar a contagem e isolamento dos microrganismos envolvidos na dinâmica do sistema produtivo, foram utilizados meios seletivos descritos em Rêgo et al. (2018).

Para bactéria, foi utilizado o meio de cultura *Plate Counter Agar* (PCA).

PCA (APHA e ISSO 4833) - KASVI

Tryptone (5,0 g/l)

Glucose (1,0 g/l)

Yeast Extract (2,5 g/l)

Agar (15 g/l)

pH 7,0 (25°C)

Já para o cultivo de fungos, foi utilizado o meio Sabouraud enriquecido com bactericida Cloranfenicol.

Meio Sabouraud CAF Agar – KASVI

Enzymatic Digest of Casein (5,0 g/l)

Enzymatic Digest of Animal Tissue (5.0 g/l)

Glucose (40.0 g/l)

Cloramphenicol (0.5 g/l)

Agar (15.0 g/l)

pH 5.6 (25°C)

Todas as análises seguiram, os procedimentos indicados por seus fabricantes para a avaliação. Portanto, para o crescimento bacteriano, as placas foram incubadas por 48 h a 35,5°C e para crescimento fúngico, foram incubadas por 72 h a 28°C.

2.4. CONTAGEM DE UFC DO SOLO E DA RIZOSFERA

No estágio de pendoamento (VT) do milho foram coletadas as amostras de solo e rizosfera, no 1º e 2º ciclo.

Para o solo, foram realizadas amostragens do solo na camada de 0-20 cm, sendo coleta dos três pontos na entrelinha de cultivo dentro da área útil da parcela para formar uma amostra composta. A amostragem da rizosfera consistiu na coleta do solo aderido as raízes.

Para obtenção da amostra de solo rizosférico, as raízes de três plantas de milho dentro da área útil da parcela foram fortemente agitadas em saco plástico estéril e geraram uma amostra composta.

Durante a coleta, o solo das parcelas amostradas foi mantido resfriado em caixa térmica com gelo, e posteriormente homogeneizado e, em seguida, foi retirado uma alíquota de 10 gramas de solo. Esse solo foi diluído em 100 mL de água (diluição 10^{-1}) e, posteriormente, aplicada a diluição em série, até a diluição de trabalho. Para essa avaliação foram adotados os procedimentos metodológicos adaptados descritos em Cavaglieri et al. (2009).

Foi considerado a diluição seriada de 10^{-3} para a quantificação geral da microbiota. Foram realizadas duplicata de cada amostras. O método de plaqueamento utilizado foi o em profundidade (método *pour plate*) em meio seletivo para crescimento bacteriano (PCA) e fúngico (*Sabourand*). Os dados obtidos foram expressos em 10^3 UFC g. solo⁻¹.

2.5. FREQUÊNCIA DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA E ISOLAMENTO FÚNGICO

No estágio de pendoamento (VT) do milho, foram isolados os microrganismos baseando-se na metodologia adaptada contida em Hallman et al. (2006).

A avaliação consistiu na coleta de folhas e raízes do milho, e posteriormente, em câmara de fluxo laminar, na desinfecção de estruturas vegetal externa por meio de imersões sucessivas em etanol 70% (1 min) e hipoclorito de sódio 2% (2 min), seguido de dois enxagues em água destilada autoclavada (Figura 1).

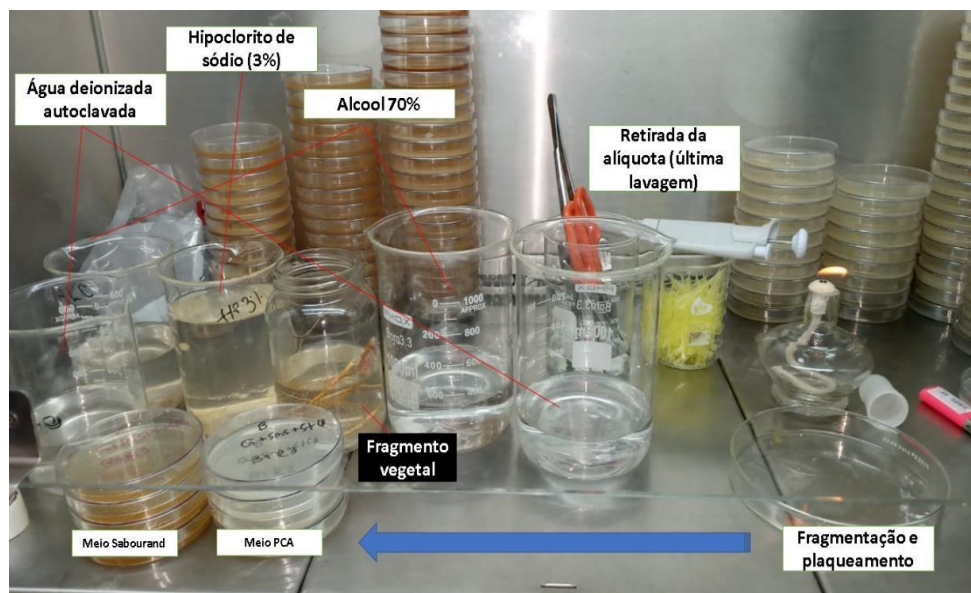


Figura 1. Metodologia utilizada para avaliação de frequência de colonização endofítica dos fragmentos vegetais.

A cada avaliação, todo material usado para esterilização era substituído. A eficácia deste processo de desinfecção da superfície externa vegetal foi constatada através de alíquotas (0, 05 ml) de água destilada que foram utilizadas nesta última lavagem, realizando o plaqueamento nos meios de cultura BDA.

Desinfetada a superfície externa, as amostras foliares e radicular foram fragmentadas e plaqueadas. Oito fragmentos foram acondicionados equidistantes em cada placa contendo o meio de cultura específico, para a colonização dos

microrganismos que se encontram endofiticamente na planta. Todo esse procedimento ocorreu em triplicata.

Para avaliação, foi realizada a análise de frequência de colonização (FC%) conforme equação a seguir, de acordo com Petrini et al. (1991):

$$FC (\%) = (NCOL / NFRAG) * 100$$

em que:

FC= Frequência de colonização de oito fragmentos (%) **NCOL** = número de fragmentos colonizados por placa e **NFRAG** = fragmentos totais inoculados

As placas foram monitoradas diariamente pelo período de 48 h (bactéria) e 72 h (fungo). Todos os fragmentos que apresentaram crescimento fúngico ou bacteriano foram contabilizados. Portanto, considerou-se 100% aqueles apresentaram os oito fragmentos com colonização em cada placa.

Após plaqueamento no meio específico com as condições ideais para crescimento (item 2.3.), os fungos endofíticos que diferiram em aspectos visuais foram purificados e isolados. Somente foram isolados os fungos que eram originários de plantas sob o efeito pós cultivo de cogumelo.

Na Figura 2 é possível observar o diagrama completo das avaliações de contagem de UFC do solo e isolamento de microrganismos endofíticos, juntamente com a aplicação dos meios de cultura seletivos.

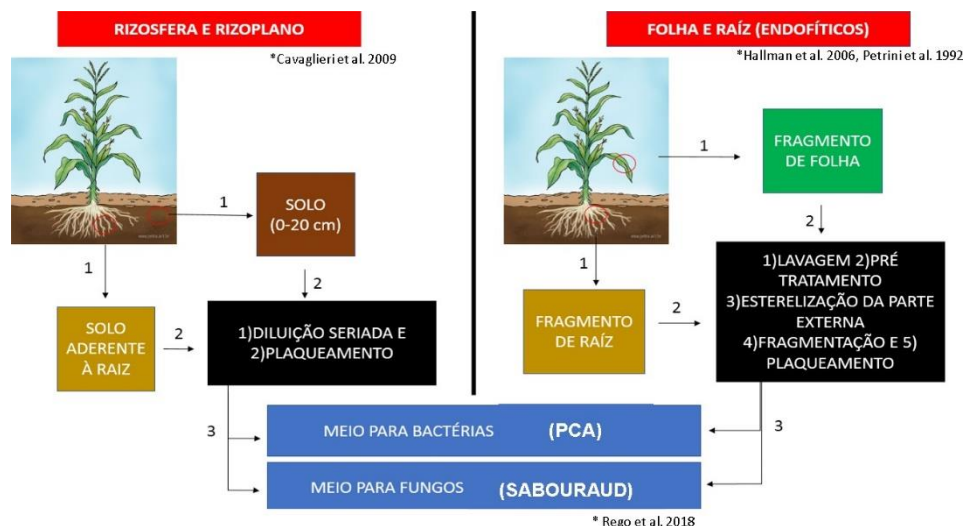


Figura 2. Esquematização da metodologia utilizada para a caracterização microbológica. 1) Local de coleta da amostra. 2) Processo metodológico que foi utilizado. 3) Meio de cultura para o crescimento e isolamento dos microrganismos.

2.6. MANUTENÇÃO DOS FUNGOS ENDÓFITOS

Os fungos endófitos que foram isolados de fragmentos foliares e radiculares nos dois ciclos de milho, foram inoculados em meio BDA com sucessivas repicagens até a obtenção de uma cultura pura.

Posteriormente, foi retirado discos de 10 mm e mantidos em microtubos eppendorfs sob água destilada autoclavada (Método Castellani) (Figura 3).

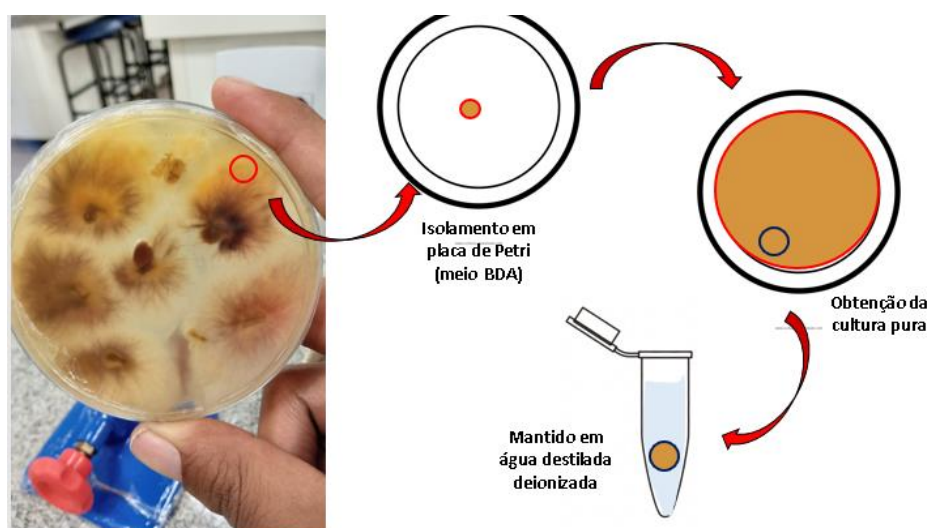


Figura 3. Método utilizado para manutenção dos fungos endófitos.

2.7 TESTE DE PATOGENICIDADE

Os fungos endofíticos apesar de serem isolados de tecidos saudáveis, foram testados sua patogenicidade através do Postulado de Koch (Fernandez, 1993), por ser possível o isolamento de patógenos latentes nos tecidos.

Os discos mantidos em Castellani foram reativados e inoculados em placas de BDA, cultivados por 7 dias. Posteriormente, os esporos da cultura pura fúngica foram inoculados em plantas de milho (hibrido K9606VIP3, KWS®) cultivadas em copos plásticos de aproximadamente 500 mL.

A inoculação ocorreu quando as plântulas de milho possuíam cerca de 3 folhas totalmente abertas (15 dias após a semeadura). A solução de esporos foi preparada em água deionizada autoclavada, e cada solução calibrada em câmara de Neubauer para 10^6 esporos mL^{-1} .

Cerca de 100 mL da solução de esporos foram aplicadas por planta, incluindo parte aérea e solo. O procedimento ocorreu em duplicata.

Durante 15 dias, diariamente as plantas foram monitoradas, e as que manifestaram algum sintoma patológico ou anomalia e “fecharam” o postulado, ou seja, apresentaram patogenicidade ao milho, foram excluídas da seguinte fase experimental.

2.8 CRESCIMENTO E TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL

Os fungos que não manifestaram doença no milho foram avaliados quanto a taxa de crescimento micelial. Para isso discos de 6 mm de diâmetro foram cortados e depositados no centro de placas contendo meio de cultura BDA, e avaliado o crescimento micelial. Como desafio, também de forma separada, foi conduzido o patógeno *Fusarium* sp., causador da Murcha de Fusarium, isolado de uma plantação de milho da Fazenda do Campus da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Dracena.

As medições foram realizadas diariamente até o quinto dia de incubação, realizado em câmaras BOD. A mensuração foi feita com o auxílio de um paquímetro digital (MULTITOYO- 500-172-30B), em dois sentidos perpendiculares no mesmo sentido, marcados no fundo de cada placa. Para obter os dados de crescimento, foram utilizadas as médias diárias de duas medidas perpendiculares obtidas.

Além do crescimento micelial, baseada em Lilly e Barnett (1951), também foi calculado a taxa de crescimento micelial (TCM) a partir da seguinte fórmula:

$$TCM = \frac{(C2 - C1)}{(T2 - T1)}$$

em que:

TCM: Taxa de crescimento, em mm.h⁻¹;

C2: crescimento após 48 horas de incubação;

C1: crescimento após 24 horas de incubação;

T2: 48 h e T1:24h.

2.9 TESTE DE ANTAGONISMO IN VITRO

Posteriormente a essa etapa, os isolados que sobressaíram na avaliação de crescimento micelial foram pareados no teste de antagonismo, em metodologia presente em Miguel-Ferrer et al. (2021).

Basicamente, um disco de meio de cultura BDA (6 mm) contendo o patógeno foi colocado a uma distância de 0,5 cm da borda das placas de Petri, incubadas por 48 h a 20°C, com fotoperíodo de 12 h. Posterior a esse período, um novo disco contendo o isolado antagonista foi inserido na extremidade oposta, em triplicata.

Foi adotado como controle, as placas de *Fusarium* sp. que não obtiveram

nenhum isolado antagonista. Essas placas foram novamente incubadas em BOD com as mesmas condições descritas anteriormente, por sete dias.

Para a avaliação, seguiram dois critérios propostos por Bell et al. (1982), que consiste em notas de antagonismo com base na análise visual das placas, variando de 1 a 5 (Tabela 1).

Tabela 1. Escala de Bell para teste de pareamento de culturas

Escala de Bell et al. (1982)	
Nota	Avaliação
1	Antagonista cresce e ocupa toda placa
2	Antagonista cresce sobre 2/3 da placa
3	Antagonista e patógeno crescem até metade da placa
4	Patógeno cresce sobre 2/3 da placa
5	Patógeno cresce por toda placa de Petri

Para avaliação do percentual de inibição das colônias de *Fusarium* sp. pelos isolados endofíticos, foi medido a colônia do patógeno com o auxílio de um paquímetro digital e estimado a porcentagem de inibição, baseado na seguinte equação:

$$\text{Inibição patógeno (\%)} = \frac{(\text{diam test} - \text{diam trat})}{(\text{diam test})} * 100$$

em que:

Inibição patógeno (%): inibição do crescimento de *Fusarium* in vitro

Diam test: diâmetro da colônia testemunha de *Fusarium*, em mm

Diam trat: diâmetro da colônia de *Fusarium*, pareada com o isolado, em mm

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação de UFC do solo e microrganismos endofíticos, as médias obtidas foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste estatístico t-LSD ($p>0.05$) para a fator gessagem e o teste Tukey para o fator manejo do SMS ($p>0.05$).

Para a avaliação de crescimento micelial e TCM, foi aplicado o teste Scott Knott ($p<0.05$). Os testes estatísticos foram realizados no software SisVar versão 5.7.91.

As figuras apresentadas foram confeccionadas no software GraphPad Prism v.9.

3. RESULTADOS

3.1 UFC DO SOLO E DA RIZOSFERA

Os dados obtidos referente a UFC do solo na diluição 10^3 estão presentes na Tabela 2.

A aplicação de gesso influenciou a UFC fúngica do solo na 1ª ciclo. A UFC diminuiu em cerca de $4,13 \cdot 10^3$ UFC g^{-1} solo com a gessagem.

O tratamento SMS, na 1ª ciclo, apresentou UFC fúngica maior do que a UFC obtida pelos tratamentos SMS+S e SMS+S+CB.

Foram observadas reduções de até $18,87 \cdot 10^3$ UFC g^{-1} solo com a adição de fertilizantes na semeadura na semeadura nessas áreas.

Em efeitos desdobrados, observou que a gessagem afetou negativamente o tratamento SMS, na 1ª ciclo, nas avaliações de colônias fúngicas e bacterianas. Foram reportados decréscimos cerca de 15,35 (fungo) e $35,75 \cdot 10^3$ UFC g^{-1} solo para o tratamento citado.

Tabela 2. Unidade formadora de colônia (10^3 UFC g⁻¹ solo) de bactéria e fungo de solo de produção de milho em área pós cultivo de cogumelo

Manejo do SMS	Ciclo					
	1º ciclo			2º ciclo		
	Gesso		Média	Gesso		Média
	+	-		+	-	
Bactéria (10³ UFC g⁻¹ solo)						
Controle	106,62	103,62 b	105,12	37,75	35,50	36,62
SMS	109,37B	145,12 Aa	127,25	36,62	41,87	39,25
SMS+S	108,37	125,75 ab	117,06	40,12	32,37	36,43
SMS+S+CB	117,37	108,25 ab	112,81	40,50	30,12	35,12
Média	110,43	120,68		38,75	34,96	
C.V.		26,31			44,66	
Fungo (10³ UFC g⁻¹ solo)						
Controle	25,62	30,00 ab	27,81 ab	7,62	4,12	5,87
SMS	24,37 B	39,75 Aa	32,06 a	7,25	9,62	8,43
SMS+S	15,25	22,50 b	18,87 b	8,25	7,87	8,06
SMS+S+CB	19,37	20,87 b	20,12 b	6,25	4,62	5,43
Média	21,15 B	28,28 A		7,34	6,56	
C.V.		48,03			66,02	

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, Controle= Fertilização de semeadura e cobertura recomendada segundo o Boletim 100, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

Nenhum valor obtido na 2ª ciclo, seja para UFC fúngica ou bacteriana, foi reportado como significante. A 2ª ciclo obteve médias menores para todos os tratamentos avaliados, comparados a 1ª ciclo.

As médias obtidas da UFC de solo rizosférico estão contidos na Tabela 3. Observa-se que em números absolutos, os valores de UFC bacteriana foram superiores no solo rizosférico do que o solo coletado na entrelinha.

A UFC fúngica rizosférica apresentou superioridade somente na 2ª ciclo, comparando os mesmos tratamentos com o solo da entrelinha.

Tabela 3. Unidade formadora de colônia (10^3 UFC g^{-1} solo) de bactéria e fungo de solo rizosférico de plantas de milho em área pós cultivo de cogumelo em função dos tratamentos testados

Manejo do SMS	Ciclo					
	1ª ciclo			2ª ciclo		
	Gesso		Média	Gesso		Média
	+	-		+	-	
	Bactéria (10³ UFC g⁻¹ solo)					
Controle	352,00	331,83	343,35	355,12	295,66	329,64
SMS	314,62	402,50	358,56	311,25	373,25	342,25
SMS+S	394,37	303,12	348,75	346,00	363,87	354,93
SMS+S+CB	296,00B	463,87A	370,61	362,50	309,50	338,94
Média	336,70	378,23		344,82	338,23	
C.V.		41,53			46,57	
	Fungo (10³ UFC g⁻¹ solo)					
Controle	9,50 Bb	27,12 Aa	19,57 a	35,83	31,37	33,28
SMS	13,12 ab	19,5 ab	16,31 ab	26,25	26,62	29,43
SMS+S	24,62 Aa	13,00 Bb	18,16 a	26,84	31,70	29,27
SMS+S+CB	8,50 b	11,00 b	9,43 b	27,90	30,83	29,00
Média	13,87	17,78			30,18	
C.V.		55,06			42,28	

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, Controle = Fertilização de semeadura e cobertura recomendada segundo o Boletim 100, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

A comunidade microbiana da 2ª ciclo na rizosfera não foi tão drasticamente reduzida como apresentou o solo da entrelinha, demonstrando certa abundância biológica.

Foi observado valores cerca de 9,27 vezes maiores para fungo (média no solo de entrelinha de 36,85 e na rizosfera 341,44 10^3 UFC g^{-1} de solo) e 4,35 vezes maiores para bactéria (média no solo de entrelinha de 6,94 e na rizosfera 30,24 10^3 UFC g^{-1} de solo).

Para efeitos isolados da UFC em solo rizosférico, foi obtido diferença significativa somente para o fator aplicação de SMS, para a comunidade fúngica na 1ª ciclo. Observa-se que o tratamento SMS+S+CB foi reduzido sua UFC fúngica rizosférica em cerca de 10,14 10^3 UFC g^{-1} solo, comparada a UFC obtida para controle somente com fertilização mineral.

Para efeitos desdobrados para a comunidade fúngica na 1ª ciclo observa-se que, na presença do gesso, o tratamento SMS+S obteve médias superiores aos tratamentos SMS+S+CB e controle. Porém esse efeito não é obtido quando não tratadas as parcelas com gessagem.

A maior média de UFC fúngica rizosférica é obtida pelo tratamento controle ($27,12 \cdot 10^3$ UFC g⁻¹ solo). Com ou sem presença do gesso, o tratamento SMS possuiu valores intermediários (entre $13,12$ e $19,5 \cdot 10^3$ UFC g⁻¹ solo), não diferindo de nenhum tratamento.

Para efeitos desdobrados, o gesso foi benéfico para UFC fúngica para o tratamento SMS+S (de 13,00 para $24,62$ UFC g⁻¹ solo) e prejudicial para UFC bacteriana em SMS+S+CB (de 468,87 para 296,00 UFC g⁻¹ solo) e UFC fúngica em controle (de 27,12 para 9,50 UFC g⁻¹ solo), todos pertinentes a 1ª ciclo colhida.

3.2. FREQUÊNCIA DE COLONIZAÇÃO ENDOFÍTICA

Os valores obtidos da frequência de colonização bacteriana (FC Bac) seguem na Tabela 4. Não foi possível a obtenção de dados de FC Bac das raízes, comprometida pelas contaminações presentes na inoculação das placas testemunha do processo de esterilização (Figura 4)

Se tratando de FC Bac dos fragmentos foliares, não foi possível observar diferença média significativa para aplicação de gesso ou diferentes manejo de fertilidade com SMS.

Observou aumento médio entre a FC Bac obtida na 1ª e 2ª ciclo. A média geral obtida passou de 87,23% de FC Bac (1ª ciclo) para 96,81% de FC Bac (2ª ciclo).

Tabela 4. Valores de frequência de colonização endofítica bacteriana- FC Bac (%) de fragmentos foliares de plantas de milho cultivado em área pós cultivo de cogumelo

FC BACTÉRIA (%) - FRAGMENTO FOLIAR						
	1ª CICLO			2ª CICLO		
	Gesso					
	G+	G-	Media	G+	G-	Media
Controle	81,25 ab	85,41 a	83,33	93,75	96,87	95,25
SMS	75,00 Bb	91,66 Aa	83,33	98,87	91,62	95,25
SMS+ S	94,79 a	82,29 b	88,54	99,87	98,87	97,87
SMS+ S+ CB	91,66 a	95,83 a	93,75	98,87	98,87	98,87
Media	85,67	88,67		97,12	96,50	
C.V. (%)		17,15			7,80	

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, Controle= Fertilização de semeadura e cobertura recomendada segundo o Boletim 100, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de semeadura e cobertura.

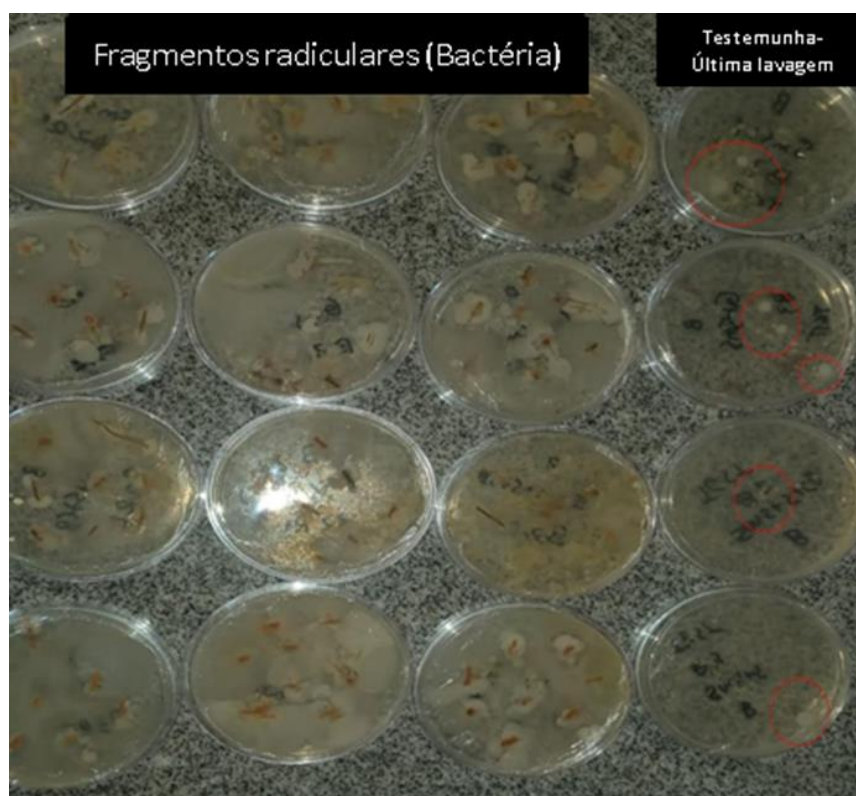


Figura 4. Fragmentos radiculares plaqueados com suas devidas triplicatas (meio PCA) e a testemunha (água da última lavagem) do processo demonstrando a não segurança do processo de esterilização epifítica

Os valores obtidos da frequência de colonização fúngica (FC Fun) de tecidos foliares e radiculares seguem na Tabela 5. Observou que, em efeitos isolados, a gessagem promoveu efeitos significativos para FC Fun foliar (1ª ciclo). A aplicação de gesso decresceu em cerca de 15,11 % FC Fun de fragmentos foliares.

Tabela 5. Valores de frequência de colonização endofítica bacteriana- FC Bac (%) de fragmentos foliares de plantas de milho cultivado em área pós cultivo de cogumelo

FC FUNGÍCA (%) - FRAGMENTO FOLIAR						
1ª CICLO				2ª CICLO		
	Gesso					
	G+	G-	Media	G+	G-	Media
Controle	31,25 Bb	61,45 Aa	46,35	75,75	77,89	76,87
SMS	46,87 Aab	57,29 Aa	52,08	73,75	78,87	76,25
SMS+ S	53,12 Bab	72,91 Aa	63,02	77,87	75,75	76,75
SMS+ S+ CB	58,33 Aa	58,33 Aa	58,33	78,87	78,89	78,86
Media	47,39 B	62,5 A		76,5	77,87	
C.V. (%)	24,88			7,21		
FC FUNGÍCA (%) - FRAGMENTO RADICULAR						
1ª CICLO				2ª CICLO		
	Gesso					
	G+	G-	Media	G+	G-	Media
Controle	87,5?	80,20 b	83,85 b	89,5 b	87,5 b	88,5 b
SMS	93,75	90,62 ab	92,18 a	97,87 a	95,75 a	97,87 a
SMS+ S	89,58	95,83 a	93,22 a	100,0 a	97,87 a	97,87 a
SMS+ S+ CB	97,91	96,87 a	96,87 a	100,0 a	97,87 a	98,87 a
Media	92,18	90,88		96,87	94,75	
C.V. (%)	11,75			7,37		

Médias nas colunas, seguidas por letras maiúsculas distintas, diferem entre si pelo teste t (LSD) ($p < 0,05$). Médias nas linhas, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). G+ = Gessagem, G- = Sem gesso, Controle = Fertilização de sementeira e cobertura recomendada segundo o Boletim 100, SMS = Área pós cultivo de *A. subrufescens*, sem nenhuma fertilização mineral, SMS + S = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de sementeira, SMS + S+ CB = Área pós cultivo de *A. subrufescens* + fertilização de sementeira e cobertura.

As parcelas experimentais que foram cultivadas na área pós cultivo de cogumelo, acrescidas ou não de fertilizante mineral, foram maiores significativamente em FC Fun de fragmentos radiculares, comparadas ao controle com fertilização mineral.

Observou acréscimos de até 13,02% de FC Fun de fragmentos no 1ª ciclo (SMS+S+CB obtiveram 96,87 %, versus 83,85% obtidos em Controle).

Os efeitos FC Fun para fragmentos foliares e radiculares, totalizando os ciclos,

podem ser visualizados na Figura 2. Na análise conjunta, observa-se que as médias de FC Fun de fragmentos foliares observadas foram afetadas negativamente pela gessagem, e, FC Fun de fragmentos radiculares incrementadas pela utilização de áreas pós cultivo.

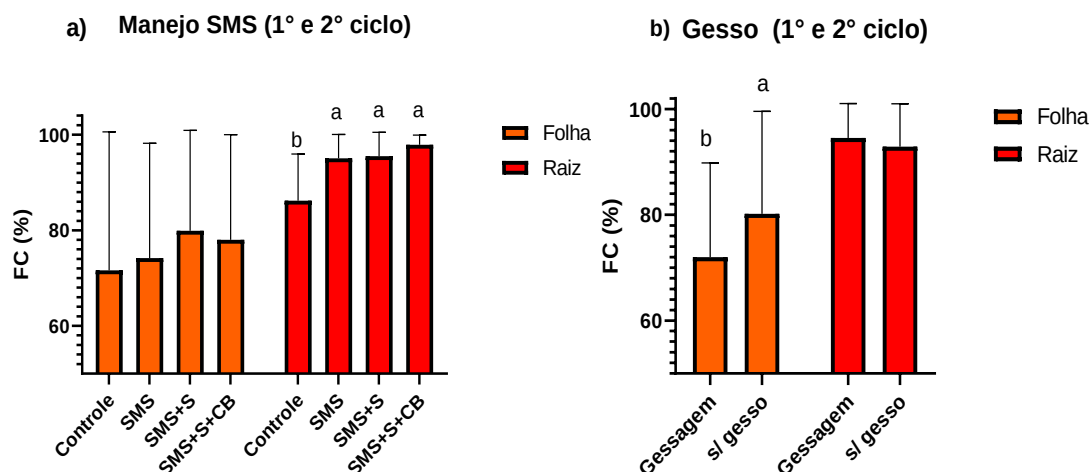


Figura 2. Frequência de colonização fúngica (FC Fun) de fragmentos radiculares e foliares obtidos de 2 ciclos consecutivos de milho cultivado em área pós cultivo de cogumelo. Efeitos isolados de manejo do SMS (a) e efeitos isolados de gessagem (b). Letras minúsculas distintas entre barras diferem, segundo o teste Tukey 0.05 (manejo do SMS) e teste t-LSD (gessagem).

3.3. OBTENÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS

Durante os dois ciclos, foi possível a obtenção de 37 isolados fúngicos endófitos. A identificação, o local de isolamento e a ciclo estão presentes na Tabela 4.

Tabela 6. Fungos isolados obtidos na experimentação

Isolado	Local de isolamento	Ciclo (cultivo)
I01	Folha	Primeiro cultivo
I02	Folha	Primeiro cultivo
I03	Folha	Primeiro cultivo
I04	Folha	Primeiro cultivo
I05	Folha	Primeiro cultivo
I06	Folha	Primeiro cultivo
I07	Folha	Primeiro cultivo
I08	Raiz	Primeiro cultivo
I09	Raiz	Primeiro cultivo
I10	Raiz	Primeiro cultivo
I11	Raiz	Primeiro cultivo
I12	Raiz	Primeiro cultivo
I13	Folha	Segundo cultivo
I14	Folha	Segundo cultivo
I15	Folha	Segundo cultivo
I16	Folha	Segundo cultivo
I17	Folha	Segundo cultivo
I18	Folha	Segundo cultivo
I19	Folha	Segundo cultivo
I20	Folha	Segundo cultivo
I21	Folha	Segundo cultivo
I22	Folha	Segundo cultivo
I23	Raiz	Segundo cultivo
I24	Raiz	Segundo cultivo
I25	Raiz	Segundo cultivo
I26	Raiz	Segundo cultivo
I27	Raiz	Segundo cultivo
I28	Raiz	Segundo cultivo
I29	Raiz	Segundo cultivo
I30	Raiz	Segundo cultivo
I31	Raiz	Segundo cultivo
I32	Raiz	Segundo cultivo
I33	Folha	Primeiro cultivo
I34	Folha	Primeiro cultivo
I35	Folha	Primeiro cultivo
I36	Raiz	Segundo cultivo
I37	Raiz	Primeiro cultivo

Ao todo, 14 isolados foram obtidos na 1ª ciclo e 20 isolados obtidos na 2ª ciclo. Ocorreu uma maior presença de isolados foliares, totalizando cerca de 19 isolados obtidos.

3.4. TESTE DE PATOGENICIDADE, CRESCIMENTO MICELIAL E TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL

O teste de patogenicidade apresentou, dentre os isolados obtidos, 2 isolados possivelmente patogênicos: I11 (isolado de fragmento radicular, na 1ª ciclo) e I23 (isolado de fragmento radicular na 2ª ciclo).

Ambos os isolados, em todas as repetições aplicadas a solução de esporos, apresentaram micro lesões necróticas, e foram reisolados nesta região. Na figura 3, pode-se notar as lesões ocorridas, bem como uma fotografia dos esporos em microscópio óptico.

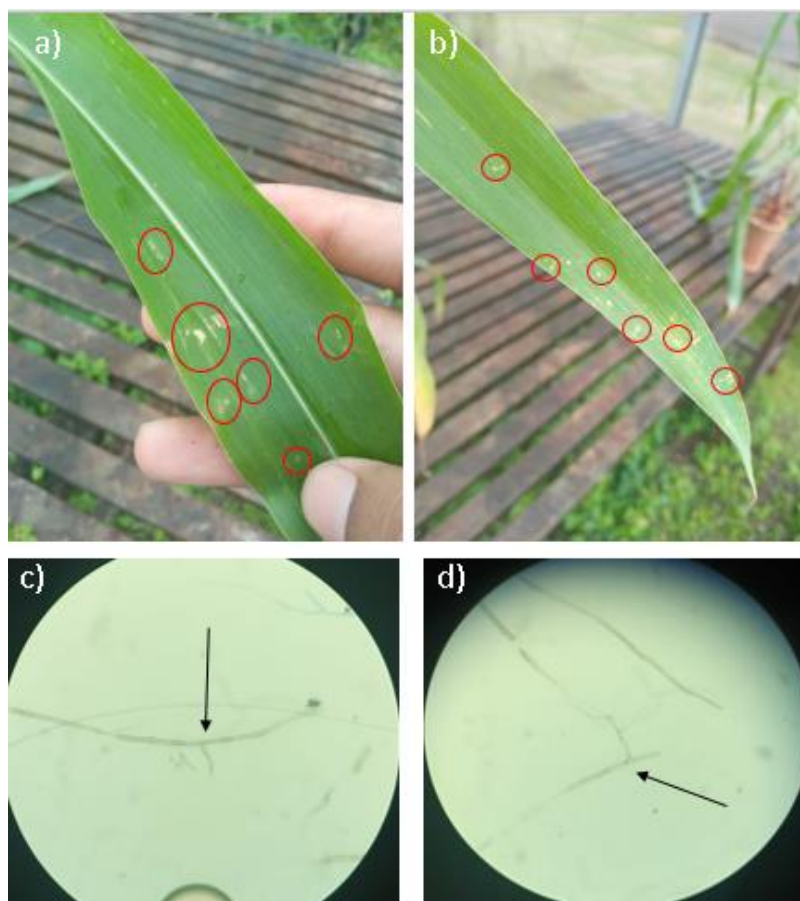


Figura 3. Isolados que obtiveram patogenicidade segundo o postulado de Koch. Micro lesões obtidas pelos isolados I11 (a) e I23 (b). Observa-se também que ambos isolados possuem hifas melanizadas e septadas em ângulo de 90° (c) e (d)

O crescimento micelial dos isolados obtidos e de *Fusarium* sp. segue na Tabela 7.

Tabela 7. Crescimento micelial (mm) de isolados endofíticos obtidos

Isolado	horas após inoculação		
	24	48	72
I01	18,4 c	31,20 b	40,34 c
I02	0,00 e	32,04 b	45,50 b
I03	20,22 c	29,94 b	35,09 c
I04	0,00 e	0,00 c	0,00 f
I05	0,00 e	0,00 c	0,00 f
I06	0,00 e	39,49 b	62,83 b
I07	0,00 e	0,00 c	0,00 f
I08	50,34 a	84,0 a	84,0 a
I09	0,00 e	0,00 c	0,00 f
I10	0,00 e	0,00 c	0,00 f
I12	0,00 e	0,00 c	0,00 f
I13	0,00 e	36,98 b	49,02 b
I14	12,97 c	24,49 b	39,36 c
I15	0,00 e	0,00 c	0,00 f
I16	0,00 e	48,42 b	84,00 a
I17	0,00 e	2,10 c	13,62 e
I18	0,00 e	6,81 c	36,51 c
I19	25,72 b	29,50 b	34,75 c
I20	0,00 e	33,96 b	48,24 b
I21	24,54 b	36,75 b	53, 32 b
I22	22,36 b	25,64 b	51,18 b
I24	0,00 e	0,00 c	0,00 f
I25	14,09 c	38,86 b	23,05 d
I26	10,70 d	16,29 c	84,00 a
I27	0,00 e	25,33 b	26,78 d
I28	15,20 c	45,36 b	46,63 b
I29	24,82 b	39,53 b	35,31 c
I30	0,00 e	22,29 c	48,56 b
I31	17,69 c	37,58 b	38,21 c
I32	7,25 d	11,42 c	47,49 b
I33	15,40 c	60,71 a	52,30 b
I34	19,80 c	33,82 b	47,22 b
I35	32,29 b	73,91 a	84,00 a
I36	19,44 c	84,00 a	84,00 a
I37	19,99 c	33,39 b	41,60 c
Fusarium	15,38 c	33,37 b	44,16 b
Média	11,25	29,34	40,40
C.V. (%)	46,51	47,16	17,64

Médias seguidas de letras distintas diferem entre linhas, segundo teste Scott-Knott ($p>0.05$)

O crescimento micelial médio de *Fusarium* sp. foi de 15,38 (24 h), 33,37 (48 h) e 44,16 mm (72 h). Esses valores estão muito próximos da média geral do ensaio obtida de 11,25; 29,34 e 40,40 mm para 24, 48 e 72 h, respectivamente.

O isolados I36 obteve crescimento micelial máximo (84,0 mm) em 48 horas, obtendo o maior valor nesta avaliação e fechando a placa totalmente neste período.

Na avaliação de 72 h os isolados I08, I16, I26, I35 e consequentemente I36 também obtiveram resultado satisfatório, alcançando os maiores valores significativos nesta última avaliação.

Os isolados I04, I05, I07, I09, I10, I12, I15 e I24 não obtiveram crescimento micelial possível de se avaliar em 72 e 48 horas, e foram descartados da avaliação da taxa de crescimento micelial (TCM). Os valores de TCM estão presentes na Figura 4.

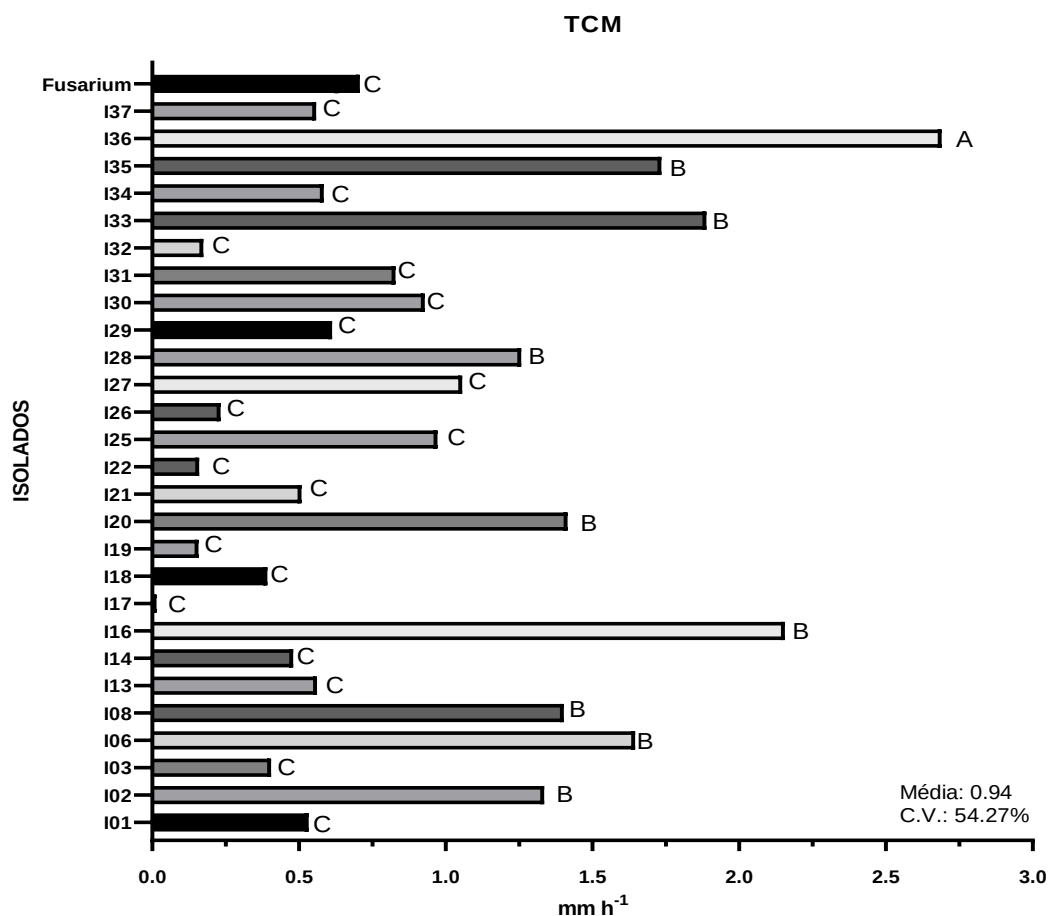


Figura 4. Taxa de crescimento micelial (mm h⁻¹) dos isolados fúngicos endofíticos obtidos. Médias seguidas de letras distintas diferem entre barras, segundo teste Scott-Knott ($p > 0.05$)

Fusarium sp. obteve TCM de 0,70 mm h⁻¹, valor abaixo da média obtida neste ensaio de 0,94 mm h⁻¹.

Confirmando a avaliação de 48 horas de crescimento micelial, o I36 apresentou a mais rápido crescimento micelial obtido. O isolado obteve TCM de 2,69 mm h⁻¹ e é o destaque da avaliação.

Os isolados I02, I06, I08, I16, I20, I28, I33 e I35 obtiveram TCM intermediário, variando entre 1,25 e 2,15 mm h⁻¹. Todos esses isolados foram superiores a *Fusarium* sp.

3.5. TESTE DE ANTAGONISMO *IN VITRO*

Para o ensaio de antagonismo *in vitro* (pareamento) foram utilizados os isolados que obtiveram TCM superior estatisticamente que *Fusarium* sp. (I02, I06, I08, I16, I20, I28, I33, I35 e I38) (Figura 5).

Além destes, foram selecionados os isolados I21, I31, I34 e I13, que não diferiram estatisticamente do desenvolvimento de *Fusarium* sp. Esses isolados também foram escolhidos devido as observações posteriores a 72 horas, dos quais todos colonizaram toda extensão da placa no período de 10 dias (Figura 5).

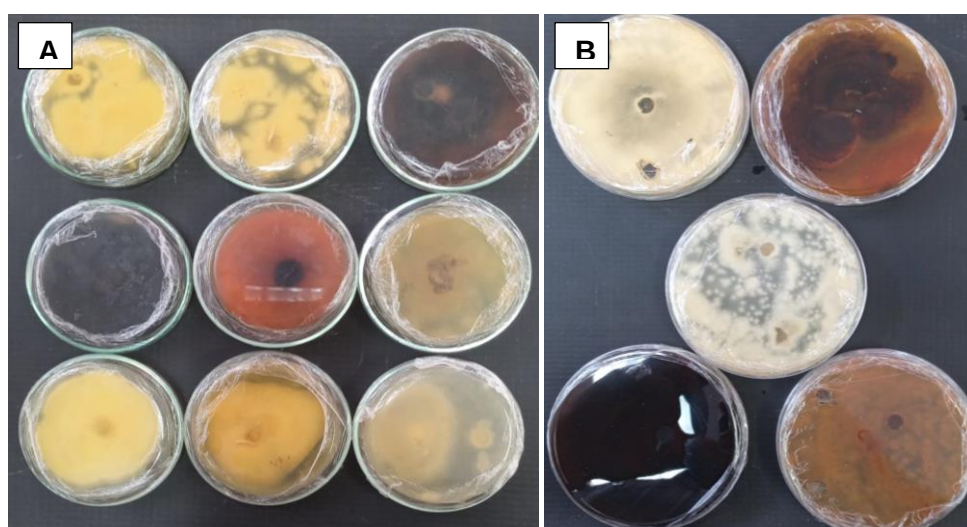


Figura 5. Isolados endofíticos utilizados no ensaio de antagonismo (A) Os isolados que apresentaram superioridade de crescimento micelial para *Fusarium* sp., (B) Os isolados que não diferiram o crescimento micelial para *Fusarium* sp. e boa colonização em 10 dias.

A Tabela 8 apresenta as médias referentes a nota da escala de Bell e porcentagem de inibição do crescimento *in vitro* de *Fusarium* sp.

Tabela 8. Escala de Bell e inibição do crescimento *in vitro* de *Fusarium* sp. de isolados fúngicos endofíticos obtidos de milho cultivado em áreas pós colheita de cogumelo.

Isolado	Nota (Escala de Bell)	Inibição crescimento <i>Fusarium</i> (%)
I02	4,0 d	37,31 c
I06	4,0 d	28,56 c
I08	1,66 a	76,33 a
I13	2,66 b	51,42 b
I16	4,00 d	39,32 c
I20	3,33 c	56,20 b
I21	2,33 b	54,73 b
I28	3,33 c	47,41 b
I31	3,33 c	40,71 c
I33	4,00 d	31,12 c
I34	4,00 d	32,84 c
I35	3,00 b	52,90 b
I36	2,00 a	72,28 a
I37	3,33 c	44,61 b
<i>Fusarium</i>	5,00 e	0,00 d
Média	3,33	45,03
C.V.	14,14	18,72

Médias seguidas de letras distintas diferem entre linhas, segundo teste Scott-Knott ($p>0.05$)

Com relação as notas obtidas da escala de Bell, foram observados que as melhores médias encontradas foram referentes aos isolados I08 e I36, alcançando notas de 1,66 e 2,00, respectivamente.

As notas médias obtidas pelos isolados endofíticos I13, I21 e I35 se mantiveram entre as notas de 2,33 a 3,00, representando o segundo melhor resultado estatístico e crescendo até o meio da placa no pareamento com o patógeno. As notas dos isolados I02, I06, I16, I33, I34 obtiveram os piores resultados estatísticos, com notas médias ao redor de 4,00.

Para porcentagem de inibição do crescimento de *Fusarium* sp. observa-se que, novamente, os isolados I08 e I36 obtiveram a maior ação antagonista sobre o patógeno, obtendo valores de inibição cerca de 76,33 e 72,28%, respectivamente.

Os valores de inibição do crescimento de *Fusarium* sp. obtidos pelos os isolados I13, I20, I21, I28, I35 e I37 obtiveram o segundo melhor resultado estatístico para esta avaliação, se mantendo em faixas de inibição de 44,61 a 56,20%.

A figura 6 apresenta as placas de alguns isolados pareados com *Fusarium* sp., demonstrando as diferentes respostas obtidas no bioensaio.

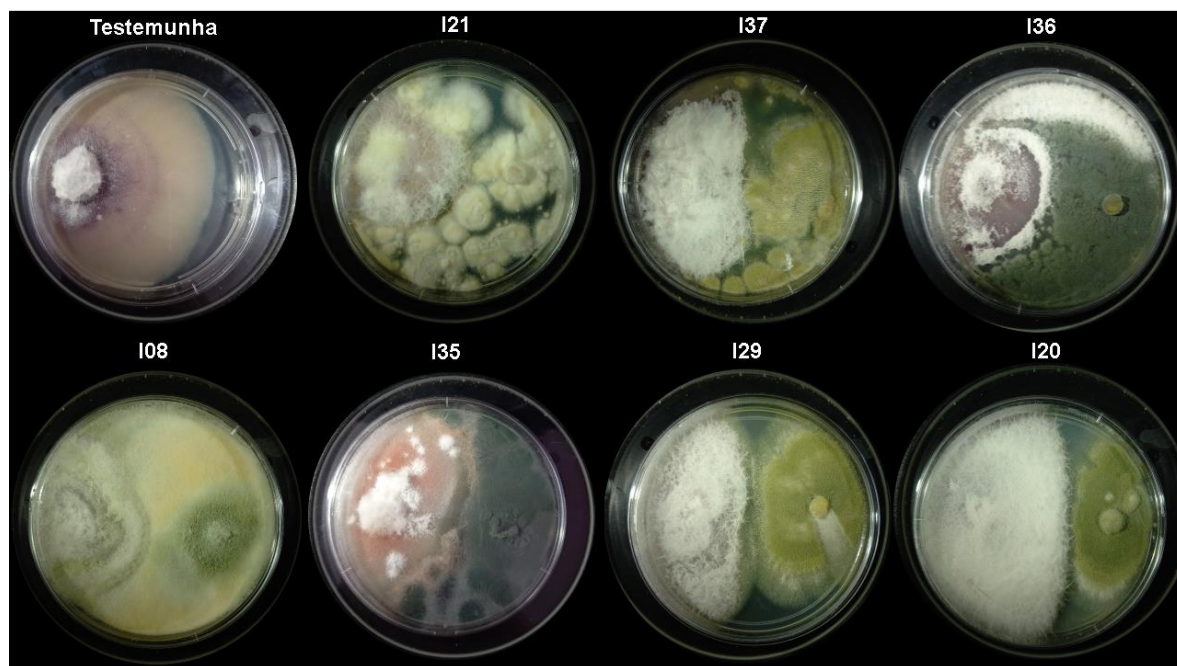


Figura 6. Bioensaio de pareamento de culturas. Observa-se o tratamento controle (lado esquerdo superior) inserida somente o disco de *Fusarium* sp. e as diferentes respostas obtidas por alguns isolados testados na experimentação.

Destaca-se na figura 6, além dos destacáveis resultados obtidos pelos os isolados I08 e I36, a presença de halo de inibição bem definido nos isolados I29 e I20 (notável pelo o centro da placa não apresentar interpolação de hifas).

4. DISCUSSÕES

4.1. UFC DO SOLO E DA RIZOSFERA

Observa-se que o gesso obteve redução significativa na 1ª ciclo do milho para

UFC fúngicas no solo em efeitos isolados, ou para UFC bacteriana e fúngicas no solo para efeitos desdobrados no tratamento SMS (Tabela 2).

Na rizosfera (Tabela 3), para efeitos desdobrados, tratamentos como SMS+S+CB (UFC bactéria) e Controle (UFC fungos) na 1ª ciclo também apresentaram redução na presença do condicionador.

Muneer et al. (2021) evidenciaram que, bem manejado, o gesso promove um efeito positivo no crescimento das raízes e das comunidades de fungos no solo, divergindo dos resultados obtidos nessa pesquisa.

Porém, esse efeito redutor do gesso para fungos não é observado na 2ª ciclo para a UFC do solo e UFC da rizosfera, o que pode sugerir um período de adaptação momentânea da microbiota.

A gessagem é reportada para diminuição da comunidade bacteriana no solo. Yuan et al. (2021) descreveram que a utilização de gesso em arroz reduz significativamente a abundância e diversidade de procariotos.

Sampaio et al. (1999) reporta que a presença de gesso reduziu potencialmente a UFC de bactérias em cama de frango, resíduo orgânico amplamente utilizado como fertilizante agrícola. É possível que esta condição também tenha, para estes resultados citados, afetado a microbiota cultivável do solo, justificando os resultados obtidos.

Os solos com tratamento SMS obtiveram a maior quantificação de UFC bacteriana e fúngica, na 1ª ciclo, quando não fertilizados e nem aplicados gesso (Tabela 2). Foi observado também que a comunidade fúngica rizosfera sem fertilização e gessagem obteve um resultado considerável intermediário, não diferindo do maior resultado obtido pelo controle.

Esta condição corrobora com Meng et al. (2018) que destaca que manejos orgânicos favorecem a microbiota do solo e da rizosfera, e que a mesma pode ser o protagonista para o sucesso de uma produção sem utilização de fertilizantes minerais sintéticos.

Os cultivos com integração *Pleorutus*-milho já se mostraram potenciais em

aumentar a riqueza e a diversidade microbiana do solo comparados a sistemas de produção de monocultivos (Yang et al., 2020). Porém, essa é a primeira reportagem científica que demonstra que o sistema cogumelo do sol-milho pode gerar uma microbiota por si só favorável para regiões tropicais.

Boas práticas de manejo de nutrientes do solo, como a reutilização de resíduos orgânicos pós colheita de cogumelos eleva a comunidade de fungos simbiotróficos benéficos, e na contraversão, fungos potencialmente patogênicos são elevados com práticas exaustivas de aplicação de fertilizantes minerais (Muneer et al., 2021).

Foram observadas diminuições da UFC bacteriana e fúngica no solo coletadas no 2ª ciclo, comparadas a 1ª ciclo (Tabela 2). Entretanto, para as comunidades microbianas rizosférica essa situação não ocorre.

Essas variações de UFC do solo também são obtidas por Almeida et al. (2008) no cultivo de mamão. Eles atribuem essa variação por condições relevantes de umidade e temperatura.

Moura et al. (2015) verificaram que diferentes condições climáticas ocasionadas pelas estações do ano alteram as relações que ocorrem entre o solo e a cobertura vegetal, especialmente nas regiões subtropicais, que por sua vez, apresenta uma microbiota com uma flutuação elevada intra-anual, principalmente nas camadas menos profundas (0-20 cm), mais sensíveis as alterações climatológicas.

A avaliação da UFC do solo foi avaliada em meados dos meses de abril, condição que apresentou o menor índice hídrico e médias consideráveis de elevadas temperaturas. É possível, que mesmo em manejos irrigados, tenha sido percebido essa alteração, justificando o resultado obtido.

Esta redução drástica não foi observada da 1ª para a 2ª ciclo para rizosfera pois, segundo Kuzyakov e Razavi (2019) as raízes funcionam como “engenheiros” do ecossistema terrestre, construindo seu ambiente e moldando a extensão da rizosfera. Essa condição apresenta gradientes agudos em um curto período, porém ao longo dos ciclos, as comunidades microbianas se estabelecem e diminuem esse gradiente de variação (Kuzyakov e Razavi, 2019).

4.2. FREQUÊNCIA DE COLONIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS

Os valores médios de taxa de colonização endofítica bacteriana desta experimentação se deram entre as faixas de 75 a 96% de FC para fragmentos foliares do milho.

Esses valores diferem de Souza (1996), que em estudo pioneiro de colonização endofítica do milho no Brasil, obteve médias de até 45% de FC. O endofitismo é afetado por fatores bióticos e abióticos, hospedeiros e patógenos (Anjum et al., 2019).

Considera-se que possivelmente a interação desses fatores justifica a condição tão diferente do que é reportado na literatura.

Não se sabe exatamente por que a FC bacteriana não foi influenciada pela reutilização de áreas pós cultivo de cogumelo. Wang et al. (2021) mostra que comunidades bacterianas no solo são afetadas quantitativa e qualitativamente pela aplicação de SMS.

A FC apesar de especular a quantidade possível de microrganismos endofíticos, a mesma é inviabilizada por não caracterizar quais são os possíveis agentes isolados, necessitando de outras técnicas moleculares para a caracterização.

Em contrapartida, FC fúngicos são afetados negativamente por gesso (fragmentos foliares) e o plantio em áreas pós cultivo de cogumelo (fragmentos radiculares) (Figura 2).

A aplicação de gesso no milho se dá principalmente para fornecimento de alguns nutrientes, em especial, fonte de S (Inagaki et al., 2016).

Wu et al. (2021) reporta que a aplicação S como ação antropogênica de fertilização de cultivos pode alterar negativamente a microbiota fúngica, além de elevar o nível de patógenos no solo. Tal situação é plenamente cabível, visto que FC dos fragmentos foi afetada negativamente por essa fonte de fertilizante no solo.

Fraç et al. (2021) reporta em trabalho avaliando a composição e diversidade

do microbioma do solo afetado por SMS e estrume de galinha ao longo dos ciclos que a mesma é afetada positivamente com a aplicação desses aditivos orgânicos no solo.

O trabalho reporta também que a aplicação de SMS reduziu a unidade taxonômicas operacionais, que são potenciais patógenos para infecção da cultura (Frac et al., 2021).

Logo, é possível que além da área pós colheita de cogumelo influenciar na quantidade de fungos endofíticos, a mesma, reduz potenciais ataques de doenças no cultivo. Essas são premissas que estão possivelmente correlacionadas com os ganhos produtivos agrônômicos reportados no Capítulo 2 deste trabalho.

4.3. TESTE DE PATOGENICIDADE

A partir do teste de patogenicidade foi possível avaliar que I11 e I23 não poderiam apresentar um potencial biotecnológico a ser explorado. Os dois isolados mostravam ramificação de hifas em ângulo reto e constrição da hifa na altura do septo (Figura 3D e C), características marcantes do micélio vegetativo de rizoctonias (Sneh et al., 1991).

Há dois fortes indícios que ambos os fungos possuem característica de rizoctonias. A primeira é referente aos sintomas acometidas nas folhas. As lesões de cor palha (Figura 3 A e B) são característicos de *Rhizoctonia solani*, fungo patogênico que acomete o milho

O outro indicio é que *Rhizoctonia solani* é um fungo frequentes de solo, ambiente que provém a coleta das raízes avaliadas dos dois isolados patogênicos (Sabato, 2014). Porém, somente técnicas de biologia molecular poderá afirmar com propriedade e precisão a caracterização dos isolados.

Cerca de 95% dos fungos endofíticos testados (totalizando 35 isolados) não apresentaram características patogênicas, condição interessante para se prospectar possíveis microrganismos benéficos ao cultivo.

4.4. CRESCIMENTO MICELIAL E TAXA DE CRESCIMENTO MICELIAL

O isolado I36 apresentou as melhores características de crescimento micelial e TCM. Silva et al. (2015) obteve o maior TCM de isolados de *Trichoderma spp* de 2.1 mm h⁻¹. Esse valor obtido é menor cerca de 0,59 mm h⁻¹ ao obtido por I38, demonstrando o alto potencial biotecnológico que esse isolado possui.

Fungos que crescem rapidamente em meios de cultivos podem competir por espaço e promover o biocontrole de doenças importantes que acometem tecidos vegetais (Spadaro e Droby, 2016).

Em uma condição de fungos endofíticos potencialmente interessantes, os isolados I02, I06, I08, I16, I20, I28, I33 e I35, obtiveram valores de TCM semelhantes aos valores obtidos dos principais isolados que possuíram efeito antagônico em trabalho de Silva et al. (2015).

Estudando características patogênicas de diferentes complexos de *Fusarium* isolados em cultivos de milho no Brasil, Kuhnem Júnior et al. (2013) obteve valores médios de TCM de 0,34 mm h⁻¹. Esse valor é cerca de duas vezes menor ao obtido do *Fusarium* testado nesta pesquisa (TCM de 0,74 mm h⁻¹), demonstrando a alta capacidade de colonização do patógeno ao meio utilizado.

4.5. TESTE DE ANTAGONISMO *IN VITRO*

Os resultados obtidos pelos isolados I08 e I36 podem ser considerados promissores pela literatura. Comparado ao estudo de Díaz-Gutiérrez et al. (2021), que estudou a ação antagonista de *Trichoderma asperellum* no controle da murcha de *Fusarium* em *Stevia*, os isolados I08 e I36 apresentaram inibição do crescimento do patógeno maior (76,33 e 72,28%, respectivamente) (Tabela 8) do que ao trabalho citado (57% de inibição do crescimento de *Fusarium*).

Nesses processos de crescimento são envolvidos mecanismos de antibiose, como a produção de metabólitos secundários, compostos voláteis e não voláteis,

sinais químicos, como a comunicação inter e intra-espécies, uma maior eficiência da utilização de nutrientes disponíveis e micoparasitismo (Moya et al., 2021). É possível que um ou mais destes mecanismos estejam ligados ao bom desempenho dos isolados I08 e I36, e compreendido em futuras pesquisas.

Os isolados I29 e I20, apesar de obterem valores médios inibitórios abaixo dos 50% e notas médias na escala de Bell maiores que 3, apresentaram características de formação de halo de inibição bem definido em condições *in vitro*.

A formação de zona de inibição em condições *in vitro* é induzida por maior atividade antimicrobiana como a produção de diversos metabolitos fúngicos (Guo et al., 2021). Fungos antagonistas podem produzir compostos enzimáticos antifúngicos, tais como quitinase e β -1,3 glucanase, importantes para o controle de fungos patogênicos (Lee et al., 2012). Portanto é possível que, estes isolados possam produzir algum desses metabolitos interessantes para a indústria biotecnológica.

5. CONCLUSÕES

As práticas antrópicas de manutenção da fertilidade por meio de gessagem (para fungos) e fertilizantes minerais (fungos e bactérias) influenciaram a contagem de UFC do solo no 1º cultivo do milho realizado posterior a reutilização de áreas pós colheita de *A. subrufescens*.

A contagem de UFC do solo não se diferenciou entre os tratamentos propostos, porém foi drasticamente reduzida na 2ª ciclo de cultivo, demonstrando um fluxo cíclico da comunidade microbiana no solo. Entretanto, a comunidade na rizosfera foi considerada estável, e se manteve semelhante ao longo dos cultivos.

Cultivos com SMS foram potenciais para prospecção de microrganismos endofíticos. Esse impacto é acometido principalmente nas raízes do milho.

Cerca de 95% dos isolados de fungos endofíticos testados não manifestaram características patogênicas, caracterizando possivelmente uma boa influência microbiana das áreas pós colheita de *A. subrufescens* na colonização de endófitos.

Os isolados fúngicos endofíticos obtidos nessa pesquisa tem potencial biotecnológico a ser explorado pois apresentaram crescimento micelial, TCM e antagonismo *in vitro* maior do que os valores comparados na literatura. Dentre eles, se destacam I08 e I36 por sua boa colonização do meio e os isolados I29 e I20 pela formação de halo de inibição contra *Fusarium* sp.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida MDC, Trindade AV, Maia ICS, Marques MC. (2008) Influências dos diferentes sistemas de manejo no comportamento da microbiota do solo em áreas sob cultivo de mamão na região de Cruz das Almas, BA. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 8:67-75.
- Anjum R; Afzal M; Baber R; Khan MAJ; Kanwal W; Sajid W; Raheel A. (2019) Endophytes: As Potential Biocontrol Agent—Review and Future Prospects. **Journal of Agricultural Science**, 11:113.
- Bell DK, Wells HD, Markham CR. (1982). In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, 72:379-382.
- Bilal L; Asaf S; Hamayun M; Gul H; Iqbal A; Ullah I; Lee I-J; Hussain A. (2018) Plant growth promoting endophytic fungi *Aspergillus fumigatus* TS1 and *Fusarium proliferatum* BRL1 produce gibberellins and regulates plant endogenous hormones. **Symbiosis**, 76: 117–127.
- Cavaglieri L; Orlando J; Etcheverry M. (2009) Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. **Microbiological Research**, 164: 391–399
- Díaz-Gutiérrez C, Arroyave C, Llugany M, Poschenrieder C, Martos S, Peláez, C. (2021). *Trichoderma asperellum* as a preventive and curative agent to control *Fusarium* wilt in *Stevia rebaudiana*. **Biological Control**, 155:104537.
- Fernandez MR. (1993) **Manual para laboratório de fitopatologia**. Embrapa Trigo-Documentos (INFOTECA-E).
- Fraç M, Pertile G, Panek J, Gryta A, Oszust K, Lipiec J, Usowicz, B. (2021). Mycobiome Composition and Diversity under the Long-Term Application of Spent Mushroom Substrate and Chicken Manure. **Agronomy**, 11: 410.
- Geisen S. (2021) The Future of (Soil) Microbiome Studies: Current Limitations, Integration, and Perspectives. **mSystems**, 6: e00613-21.
- Guo Y, Fan Z, Yi X, Zhang Y, Khan RAA, Zhou Z. (2021). Sustainable Management of Soil-Borne Bacterium *Ralstonia solanacearum* In Vitro and In Vivo through Fungal Metabolites of Different *Trichoderma* spp. **Sustainability**, 13:1491.
- Hallmann J; Berg G; Schulz B. (2019) **Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms**. In: SCHULZ, B. J. E.; BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. (Eds.). Microbial Root Endophytes. Soil Biology Berlin, Heidelberg: Springer, p. 299–319.
- Huang L-Q; Niu Y-C; Su L; Deng H; Lyu H. (2020) The potential of endophytic fungi isolated from cucurbit plants for biocontrol of soilborne fungal diseases of cucumber. **Microbiological Research**, 231:126369

Inagaki TM; Moraes JC.; Caires EF; Gonçalves DRP. (2016) Lime and gypsum application increases biological activity, carbon pools, and agronomic productivity in highly weathered soil. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, 231:156–165.

Jan FG; Hamayun M; Hussain A; Jan G; Iqbal A; Khan A; Lee I-J. (2019) An endophytic isolate of the fungus *Yarrowia lipolytica* produces metabolites that ameliorate the negative impact of salt stress on the physiology of maize. **BMC Microbiology**, 19:3

Krings M; Taylor TN; Hass H; Kerp H; Dotzler N; Hermesen EJ. (2007) Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. **New Phytologist**, 174:648–657.

Kuhnem Júnior PR, Stumpf R, Spolt, P, Ponte EMD. (2013). Pathogenic traits of *Fusarium graminearum* complex and *Fusarium verticillioides* isolates on seeds and seedlings of maize. **Ciência Rural**, 43:583-588.

Kuzyakov Y, Razavi BS. (2019). Rhizosphere size and shape: Temporal dynamics and spatial stationarity. **Soil Biology and Biochemistry**, 135:343-360.

Lee, SY, Tindwa, H., Lee, YS, Naing, KW, Hong, SH, Nam, Y., & Kim, KY (2012). Biocontrole de antracnose em pimenta usando quitinase, β -1, 3 glucanase e 2-furancarboxaldeído produzido por *Streptomyces cavourensis* SY224. **Journal of microbiology and biotechnology**, 22:1359-1366.

Lilly VG; Barnett HL. (1951) Physiology of the fungi. **Physiology of the fungi**.

Mehmood A, Khan N, Irshad M, Hamayun M, Husna I, Javed A, Hussain A. (2018). IAA producing endopytic fungus *Fusarium oxysporum* wlvw colonize maize roots and promoted maize growth under hydroponic condition. **European Journal of Experimental Biology**, 8:24.

Meng X; Dai J; Zhang Y; Wang X; Zhu W; Yuan X; Yuan H; Cui Z. (2018) Composted biogas residue and spent mushroom substrate as a growth medium for tomato and pepper seedlings. **Journal of Environmental Management**, 218: 62–69.

Miguel-Ferrer L, Romero-Arenas O, Andrade-Hoyos P, Sánchez-Morales P, Rivera-Tapia J A, Fernández-Pavía SP. (2021). Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and *T. koningiopsis* against *Fusarium solani* in seed germination and vigor of Miahuateco chili seedlings. **Revista mexicana de fitopatología**, 39:228-247.

Mirsam H; Kalqutny SH; Aqi IMS.; Azrai M; Pakki S; Muis A; Djaenuddin N; Rauf AW. (2021). Indigenous fungi from corn as a potential plant growth promoter and its role in *Fusarium verticillioides* suppression on corn. **Heliyon**, 7: e07926.

Moura QL; Ruivo MLP; Rodrigues HJB; Rocha EJP; Silva Junior, JA; Vasconcelos SS; Andrade MC; Manes C-LO. (2015) Variação Sazonal Da População De Bactérias E Fungos E Dos Teores De Nitrato E Amônio Do Solo Nos Sítios Do Lba E Ppbio, Na Amazônia Oriental. **Revista Brasileira de Meteorologia**, 30:265–274.

Moya P; Barrera V; Cipollone J; Bedoya C; Kohan L; Toledo A; Sisterna M. (2020) New isolates of *Trichoderma* spp. as biocontrol and plant growth-promoting agents in the pathosystem *Pyrenophora teres*-barley in Argentina. **Biological Control**, 141: 104152.

Muneer MA; Huang X; Hou W; Zhang Y; Cai Y; Munir MZ; Wu L; Zheng C. (2021) Response of Fungal Diversity, Community Composition, and Functions to Nutrients Management in Red Soil. **Journal of Fungi**, 7: 554, 2021.

Petrini, O. (1991) Fungal Endophytes of Tree Leaves. In: (J. H. Andrews, S. S. Hirano, Eds.) MICROBIAL ECOLOGY OF LEAVES 1991, New York, NY. **Anais...** New York, NY: Springer.

Rai N; Kumari Keshri P; Verma A; Kamble SC; Mishra P; Barik S; Kumar Singh S; Gautam, V. (2021) Plant associated fungal endophytes as a source of natural bioactive compounds. **Mycology**, 12:139–159.

Raij BVan; Cantarella H; Quaggio JA; Furlani AMC. (1997) **Boletim Técnico, 100. Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo**. Instituto Agrônomo, Campinas.

Régo, A. P.; Mendes, K.; Coneglian, C.; Tornisielo, V. (2018) Effects of Ametryn on Microbial Activity in Soil with Biofertilizer Addition. **Journal of Agricultural Studies**,6.

Sabato, EO; Fernandes FT. (2014) **Doenças do milho**. Sociedade Brasileira de fitopatologia (SBF). Embrapa Milho e Sorgo.

Sampaio MAPM.; Schocken-Iturrino RP; Sampaio AAM; Berchielli SCP; Biondi A. (1999) Estudo da população microbiana e da liberação de amônia da cama de frangos tratada com gesso agrícola. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 51:559–564.

Sessitsch A; Pfaffenbichler N; Mitter B. (2019) Microbiome Applications from Lab to Field: Facing Complexity. **Trends in Plant Science**, 24:194–198.

Silva, GBPD; Heckler LI; Santos RFD; Durigon MR; Blume E. (2015) IDENTIFICAÇÃO E UTILIZAÇÃO DE *Trichoderma* spp. ARMAZENADOS E NATIVOS NO BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*. **Revista Caatinga**, 28:33–42

Singh G; Tiwari A; Gupta A; Kumar A.; Hariprasad P; Sharma S. (2021) Bioformulation development via valorizing silica-rich spent mushroom substrate with *Trichoderma asperellum* for plant nutrient and disease management. **Journal of Environmental Management**, 297:113278.

Singh UB; Malviya D; Khan W; Singh S; Karthikeyan N; Imran M; Rai JP; Sarma BK; Manna MC; Chaurasia R.; Sharma AK; Paul D.; Oh J-W. (2018) Earthworm Grazed-*Trichoderma harzianum* Biofortified Spent Mushroom Substrates Modulate Accumulation of Natural Antioxidants and Bio-Fortification of Mineral Nutrients in Tomato. **Frontiers in Plant Science**, 9:1017.

SNEH, Baruch et al. (1991) **Identification of Rhizoctonia species**. APS press.

Souza AOD. (1996) Bactérias Endofíticas De Milho (*Zea mays* L.) E Sua Variabilidade Genética Analisada Por RAPD. Dissertação (Mestrado em Agronomia) USP, Piracicaba.

Spadaro D; Droby S. (2016) Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. **Trends in Food Science & Technology**, 47:39–49.

Sun X; Guo L-D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. **Mycology**, 3:65–76.

USDA- United States Department of Agriculture (2021). **World Agricultural Production**. Circular Series. 41 p. Disponível em < <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> > Acessado em 25 de novembro de 2021.

Vitti GC; Luz PHC; Malavolta E; Dias AS; Serrano CG. (2008) Uso do gesso em sistemas de produção agrícola. **GAPE**, Piracicaba.

Wang H-W; Xu M; Cai X-Y; Feng T; Xu W-L. (2020) Application of spent mushroom substrate suppresses *Fusarium* wilt in cucumber and alters the composition of the microbial community of the cucumber rhizosphere. **European Journal of Soil Biology**, 101:103245

Wang, H-W; Xu M; Cai X-Y; Tian F. (2021) Evaluation of soil microbial communities and enzyme activities in cucumber continuous cropping soil treated with spent mushroom (*Flammulina velutipes*) substrate. **Journal of Soils and Sediments**, 21:2938–2951.

Wu L, Zheng H, Wang X. (2021). Effects of soil amendments on fractions and stability of soil organic matter in saline-alkaline paddy. **Journal of Environmental Management**, 294:112993.

Yang X; Wang Y; Sun L; Qi X; Song F; Zhu, X. (2020) Impact of Maize–Mushroom Intercropping on the Soil Bacterial Community Composition in Northeast China. **Agronomy**, 10:1526

Yuan C; Na S; Li F; Hu H. (2021) Impact of sulfate and iron oxide on bacterial community dynamics in paddy soil under alternate watering conditions. **Journal of Hazardous Materials**, 408:124417