

Avaliação da Colonização e Esporulação de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Milho Aplicado Formononetina

Leandro Ramão Paim¹, Antonio Carlos Tadeu Vitorino², Fatima Maria de Souza Moreira³, Jussara Gonçalves Fonseca⁴, Jesse Valentin dos Santos⁵, Marlene Estevão Marchetti⁶, Érica Oliveira de Araújo⁷ e Danieli Pieretti Nunes⁸

^{1,2,4,6,7,8} Universidade Federal da Grande Dourados, Rod. Dourados/Itahum, km 12, Cidade Universitária, C.P. 533, CEP 79804-970, Dourados-MS, Brasil. E-mail: ¹leandro.r.paim@hotmail.com, ²antoniovitorino@ufgd.edu.br, ⁴jsagof@hotmail.com, ⁶marlenemarchetti@ufgd.edu.br, ⁷ericabb25@hotmail.com ⁸danipieretti@gmail.com. ^{3,5} Universidade Federal de Lavras, CP: 3037, CEP: 37200-000, Lavras-MG, Brasil. E-mail: ³fmoreira@dcs.ufla.br e ⁵js.valentim@hotmail.com

RESUMO - A formononetina pode aumentar a colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e a sua esporulação. O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de um estimulante a micorrização (formononetina) associado à adubação fosfatada na taxa de colonização em milho híbrido DKB YG 390 por FMA e sua esporulação. O experimento foi realizado num Latossolo Vermelho Distroférrico, em condições de campo, em Dourados-MS. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, em parcelas subdivididas, com cinco repetições, sendo quatro doses de fósforo nas parcelas (0; 17,5; 35 e 70 kg P₂O₅ ha⁻¹) fornecido com superfosfato triplo, e quatro doses de formononetina nas sub-parcelas (0, 25; 50 e 100 g ha⁻¹) fornecidas com produto comercial PHC 506, aplicado na semente. No estágio fenológico R3 realizou a determinação da taxa de colonização das raízes por FMAs. Após a colheita, foram coletadas amostras de solo, para avaliação da densidade de esporos de FMAs presentes no solo. Conclui-se que a formononetina não promoveu aumento na taxa de colonização por FMA no estágio R3 de milho e promoveu aumento na esporulação desses fungos, sendo esse resultado dependente da dose de fósforo.

Palavras-chave: *Zea mays* L., micorriza, estimulante da micorrização, isoflavonóide.

Introdução

Micorriza é a associação simbiótica e mutualística entre plantas e fungos micorrízicos, destacando-se as micorrizas arbusculares (MAs), formados pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). O fósforo tem funções importantes na planta, sendo constituinte de compostos de energia, fosfolipídios e outros compostos (MALAVOLTA et al., 2006). Vários fatores podem alterar a resposta da planta a micorrização, dentre eles o teor de fósforo no solo. O fósforo interfere na simbiose entre o fungo e a planta. Em geral, para o milho ocorre redução na colonização quando aplicado fósforo (CARRENHO et al., 2010).

A formononetina foi descoberta em 1991, isolada de plantas de trevo (*Trifolium repens*) estressadas por deficiência de fósforo. Esse isoflavonóide é ativo em propágulos de fungos micorrízicos arbusculares. Acredita-se que o efeito estimulante da formononetina pode

ser devido a maior germinação e crescimento micelial de FMA (NAIR et al., 1991).

Siqueira et al. (1999) verificaram que a aplicação de formononetina aumentou em quase 50% a colonização das raízes. Por estimular a micorrização a aplicação de formononetina pode proporcionar aumento na produção de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular de milho (CAMPOS et al., 2010) e produção de grãos (ROMERO, 1999).

Pode ocorrer aumento na esporulação de fungos micorrízicos arbusculares pela formononetina. Pereira et al. (2011) encontraram aumento de 30% na esporulação da espécie *Glomus clarum*, quando foi aplicado formononetina em solo contaminado por arsênio. Davies et al. (2005) observaram aumento de mais de três vezes no número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados com batata e aplicado formononetina.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de um estimulante a micorrização (formononetina) associado à adubação fosfatada na taxa de colonização em milho por FMA e sua esporulação.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2010/11, em uma área sob Latossolo Vermelho Distroférico, de textura muito argilosa, na Fazenda Experimental da UFGD, município de Dourados - MS, situada nas coordenadas geográficas S 22° 13' 56" e O 54° 59' 25", a 400 m de altitude.

A caracterização química do solo é apresentada pelos seguintes resultados: pH (CaCl₂): 5,0; P: 13 mg dm⁻³; K: 0,18 cm_lc dm⁻³; Al: 0,12 cm_lc dm⁻³; Ca: 6,1 cm_lc dm⁻³; Mg: 2,2 cm_lc dm⁻³; H+Al: 6,2 cm_lc dm⁻³; SB: 8,48 cm_lc dm⁻³; CTC: 14,8 cm_lc dm⁻³ e saturação por bases: 57%. Da análise de textura obteve-se resultados de 243,9 g kg⁻¹ de areia; 140,6 g kg⁻¹ de silte e 613,4 g kg⁻¹ de argila. O número de esporos presente no solo antes do cultivo foi 173 esporos em 50 cm⁻³ de solo. A caracterização química e física foi realizada segundo metodologia proposta por Claessen et al. (1997) e o número de esporos de FMAs de acordo com Gerdemann & Nicholson (1963). Com base nos teores de nutrientes presentes na análise de solo fez-se a adubação do solo seguindo as recomendações de Coelho et al. (2010) para a cultura do milho.

O milho foi semeado manualmente, e em área submetida a plantio direto, utilizando-se o híbrido DKB YG 390, no dia 17/12/2010. A adubação NPK também foi realizada manualmente, aplicando-se 60 kg K₂O ha⁻¹ (tendo como fonte o cloreto de potássio), 20 kg N ha⁻¹ no plantio (tendo como fonte o sulfato de amônio) e 80 kg N ha⁻¹ em cobertura (tendo como fonte a uréia), aplicado no estádio V6. Para o fósforo utilizou-se as doses de acordo

com cada tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com cinco repetições, com os tratamentos arranjados em esquema de parcelas subdivididas, sendo quatro doses de fósforo nas parcelas (0; 17,5; 35 e 70 kg P₂O₅ ha⁻¹), tendo como fonte o superfosfato triplo, e nas sub-parcelas quatro doses de formononetina (0, 25, 50 e 100 g formononetina ha⁻¹), tendo como fonte o produto comercial PHC 506. Cada unidade experimental tinha seis linhas de 7 m de comprimento, com espaçamento entre-linhas de 0,8 m, sendo considerada como área útil apenas as quatro linhas centrais, eliminando-se 0,5 m de cada extremidade.

O PHC-506 é produzido pela Plant Health Care (PHC), INC-Pittsburg, EUA. O produto é formulado como um pó amarelo claro, sal de potássio de 4'- metoxi, 7-hidroxi isoflavona, peso molecular 306, solúvel em água (1 g em 3 mL de água), o qual foi aplicado nas sementes, pouco antes da semeadura. A dose recomendada pela empresa é 50 g ha⁻¹ de formononetina. As sementes foram tratadas manualmente, colocando-as em saco plástico aplicando-se o produto e agitando-se vigorosamente para distribuição homogênea.

Para avaliação da taxa de colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares, coletou-se ao acaso, raízes de cinco plantas por unidade experimental no estágio R3. As raízes foram lavadas com água e armazenadas em frascos plásticos contendo solução com 5% de formaldeído, 90% de álcool etílico e 5% de ácido acético. Posteriormente, 1 g de raízes foi clarificado usando-se solução de KOH 5% p/v por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em água deixadas por 4 minutos em HCl 1%. As raízes foram coradas com azul de tripan em lactoglicerol 0,05% (água: glicerol:ácido láctico, 1:1:1), por 10 minutos. Para estimar a porcentagem de raiz colonizada utilizou-se o método de interseção, descrito por Giovanetti & Mosse (1980).

Após a colheita, foram coletadas, ao acaso, cinco amostras simples de solo, que foram homogeneizadas e formaram uma amostra composta por cada unidade experimental, na profundidade de 0 - 20 cm, para avaliação da densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes em 50 cm³ de solo ao final do experimento, de acordo com a metodologia descrita por Gerdemann & Nicholson (1963).

Os dados coletados foram submetidos à análise de regressão, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A significância das equações foi avaliada pelo teste F, a 10% de probabilidade. A significância dos coeficientes das equações foram avaliados pelo teste t, a 10% de probabilidade. Com a finalidade de se obter homocedasticidade, os dados referentes à contagem de esporos foram transformados pela equação $(x + 0,5)^{0,5}$, enquanto os

dados referentes à taxa de colonização micorrízica foram transformados pelo arco seno $(x/100)^{0.5}$.

Resultados e Discussão

Na tabela 1 observa-se que o número de esporos no solo foi afetado pelas doses de P_2O_5 e formononetina ($p < 0,01$), pelo teste F. Ocorreu interação para número de esporos no solo ($P < 0,05$), pelo teste F. A taxa de colonização das raízes de milho por fungos micorrízicos arbusculares não foi afetada pelos tratamentos. A falta de resposta da aplicação de formononetina, na taxa de colonização, pode ser devido às gramíneas, como é o caso do milho, serem consideradas plantas com elevada capacidade para estabelecimento da micorriza, pois seu sistema radicular é bastante denso e a planta tem elevada capacidade fotossintética (CORDEIRO et al., 2005). O estágio fenológico também pode afetar a taxa de colonização (CARRENHO et al., 2010). Outro fator é o genótipo da planta, Oliveira et al. (2009) observaram que os diferentes genótipos de milho têm diferenças na absorção de fósforo e verificaram que o genótipo da planta tem maior influência na comunidade micorrízica que o nível de fósforo no solo.

Na figura 1 observa-se que para as doses 17,5 e 70 kg P_2O_5 ha⁻¹ ocorreu aumento no número de esporos com aplicação de formononetina, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático para ambas as equações ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente), pelo teste F. Os coeficientes das equações foram significativos na dose 17,5 kg ha⁻¹ ($p < 0,01$) e 70 kg ha⁻¹ ($p < 0,05$), pelo teste t. Para as doses 0 e 35 kg P_2O_5 ha⁻¹ não houve efeito da aplicação de formononetina na esporulação. Na dose 17,5 kg ha⁻¹ ocorreu aumento na esporulação até a dose 42,8 g ha⁻¹ de formononetina. Na dose 70 kg ha⁻¹ ocorreu aumento na esporulação até a dose 57 g ha⁻¹ de formononetina.

Apesar da dose 35 kg P_2O_5 ha⁻¹ não ter ocorrido efeito significativo da formononetina pela análise de regressão, pode-se dizer que existe, para esporulação de FMAs, a necessidade de aplicação de fósforo, pois na ausência deste nutriente não houve efeito da formononetina. Os fungos micorrízicos arbusculares são biotróficos obrigatórios (MAIA et al., 2010), além disso, a eficiência simbiótica está relacionada o potencial de inóculo no solo, sendo o número de esporos no solo um dos fatores que influenciam essa característica (CARRENHO et al., 2010). Com isso, o aumento na esporulação pode indicar uma colonização mais eficiente das raízes. Davies et al. (2005) e Novais & Siqueira (2009) também verificaram que a aplicação de

formononetina promoveu aumentos no número de esporos de fungos micorrízicos.

Conclui-se que a formononetina não promoveu aumento na taxa de colonização no estágio R3 e promoveu aumento na esporulação desses fungos, sendo esse resultado dependente da dose de fósforo.

Conclusão

A formononetina não promoveu aumento na taxa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares no estágio R3 de milho híbrido DKB YG 390 e promoveu aumento na esporulação desses fungos, sendo esse resultado dependente da dose de fósforo.

Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq pelo apoio financeiro no desenvolvimento da pesquisa, através do projeto multi-institucional “Biofertilizante formononetina (isoflavonóide) como estimulante de micorrização em soja e milho para aumento de produtividade associada à eficiência do uso de fertilizantes minerais”.

Literatura Citada

CAMPOS, D.T.S.; ANDRADE, J.A.C.; CASSIOLATO, A.M.R. Crescimento e micorrização de genótipos de milho em casa de vegetação. *Bragantia*, v.69, p.555-562, 2010.

CARRENHO, R.; COSTA, S.M.G.; BALOTA, E.L.; COLOZZI FILHO, A. Fungos micorrízicos arbusculares em agroecossistemas brasileiros In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M., (Ed.). *Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil*. Lavras, Editora UFLA, 2010. p. 215-250.

CLAESSEN, M.E.C.; BARRETO, W.O.; PAULA, J.L.; DUARTE, M.N. *Manual de métodos de análise de solo*. 2. ed. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997.

COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E.; PITTA, G.V.E.; ALVES, V.M.C. Fertilidade do solo. In: *Sistema de produção: Cultivo do milho*. 6 ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 2010. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/economia.htm>. Acesso em: 10 Jan. 2012.

CORDEIRO, M.A.S.; CARNEIRO, M.A.C.; PAULINO, H.B.; SAGGIN JUNIOR, O.J. Colonização e densidade de esporos de fungos micorrízicos em dois solos do Cerrado sob diferentes sistemas de manejo. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.35, p.147-153, 2005.

DAVIES, F.T.; CALDERÓN, C.M.; HUAMAN, Z.; GÓMEZ, R. Influence of a flavonoid (formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru. *Scientia Horticulturae*, v.103, p.318-329, 2005.

FERREIRA, D.F. Sistema de análises de variância para dados balanceados. Lavras, UFLA, 2000.

GERDEMANN, J.W.; NICHOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. British Mycological Society Transactions, v.446, p.235-344, 1963.

GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques to measure vesicular arbuscular mycorrhizal infection roots. New Phytologist, v.84, p.489-500, 1980.

MAIA, L.C.; SILVA, F.S.B.; GOTO, B.T. Estrutura, ultraestrutura e germinação de glomoesporos. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil. Lavras: Editora UFLA, 2010. p.75-118.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo, Ceres, 2006. 638 p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

NAIR, M.G.; SAFIR, G.N.; SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. Applied and Environmental Microbiology, v.57, p.434-439, 1991.

NOVAIS, C.B.; SIQUEIRA, J.O. Aplicação de formononetina na colonização e esporulação de fungos micorrízicos em braquiária. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.44, p.496-502, 2009.

OLIVEIRA, F.A.; CAVALCANTE, L.F.; SILVA, I.F.; PEREIRA, W.E.; OLIVEIRA FILHO, J.F.C. Crescimento do milho adubado com nitrogênio e fósforo em um Latossolo Amarelo. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, v.4, p.238-244, 2009.

PEREIRA, L.S.; PRADO, I.G.O.; LOPES LEAL, P.L.; SIQUEIRA, J.O. Efeito da formononetina na esporulação de fungos micorrízicos arbusculares em solo contaminado com arsênio. Cadernos de Agroecologia, v.6, p.1-5, 2011.

ROMERO, A.G.F. Avaliação agrônômica de formulações de isoflavonóide estimulante da micorrização no milho (*Zea mays* L.). Lavras, 1999. 40p. (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas - Universidade Federal de Lavras)

SIQUEIRA, J.O.; PEREIRA, M.A.M.; SIMÃO, J.B.P.; MOREIRA, F.M.S. Efeitos da formononetina (7-Hidroxi, 4'' metoxi Isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados. Revista Brasileira Ciência do Solo, V.23, p.571-577, 1999.

Tabela 1. Resumo da análise de variância taxa de colonização e número de esporos de FMA no solo para a cultura do milho.

Fonte de variação	Taxa de colonização	Número de esporos de FMA no solo
-------------------	---------------------	----------------------------------

Dose de P ₂ O ₅ (P)	0,352 ^{ns}	9,860 ^{**}
Dose de formononetina (F)	1,255 ^{ns}	10,367 ^{**}
P x F	0,509 ^{ns}	2,323 [*]
CV 1 (%)	10,20	6,77
CV 2 (%)	6,82	6,92

** : Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. * : Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. ^{ns} : Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

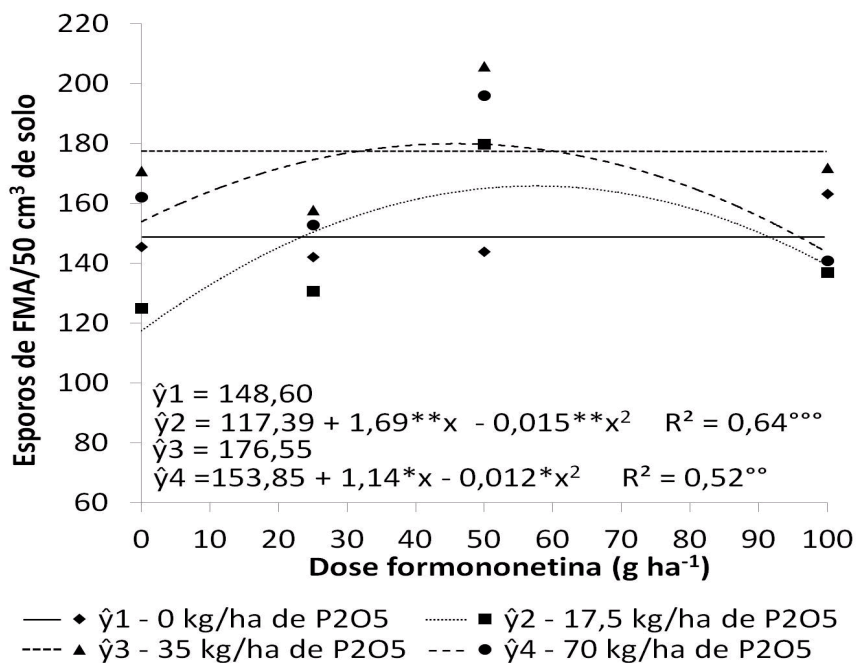


Figura 1. Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no solo, após a colheita do milho, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. *: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. ^{°°}: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. ^{°°}: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F).