

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE
MICORRIZAÇÃO EM SOJA E MILHO ASSOCIADO À
FERTILIZANTE FOSFATADO EM LATOSSOLO**

LEANDRO RAMÃO PAIM

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2012**

**FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE
MICORRIZAÇÃO EM SOJA E MILHO ASSOCIADO À
FERTILIZANTE FOSFATADO EM LATOSSOLO**

LEANDRO RAMÃO PAIM
Engenheiro Agrônomo

Orientador: PROF. DR. ANTONIO CARLOS TADEU VITORINO

Dissertação apresentada à Universidade
Federal da Grande Dourados, como parte
das exigências do programa de Pós-
Graduação em Agronomia – Produção
Vegetal, para obtenção do título de Mestre

Dourados
Mato Grosso Do Sul
2012

**FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE MICORRIZAÇÃO EM SOJA
E MILHO ASSOCIADO À FERTILIZANTE FOSFATADO EM LATOSSOLO**

Por

Leandro Ramão Paim

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovado em: 17/02/2012

Prof. Dr. Antonio carlos Tadeu Vitorino
Orientador - UFGD/FCA

Prof^a. Dr^a. Marlene Estevão Marchetti
UFGD/FCA

Prof^a. Dr^a. Fatima Maria de Souza Moreira
UFLA/DCS

DEDICATÓRIA

Dedico ao meu pai Adoilton Paim da Silva e minha mãe Iracy das Dores Ramão da Silva pelos ensinamentos, companheirismo, amizade sem os quais não estaria aqui neste momento. Dedico às minhas irmãs Lidiane Ramão Paim e Leandra Ramão Paim pelo companheirismo e amizade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por ter me dado o dom da vida, a sabedoria e a força para realizar este trabalho.

Aos meus pais pelo apoio, ensinamentos e companheirismo necessários para alcançar esse objetivo.

Às minhas irmãs Lidiane Ramão Paim e Leandra Ramão Paim pelo companheirismo e amizade.

Ao Professor Antonio Carlos Tadeu Vitorino pela orientação, por seus ensinamentos pessoais e a grande amizade.

Ao Professor José Oscar Novelino, por seus ensinamentos pessoais e a grande amizade.

À professora Fatima Maria de Souza Moreira, pela colaboração, por seus ensinamentos pessoais e a grande amizade.

Aos amigos (Jussara Gonçalves Fonseca, Caio Fernando Queiroz da Silva, Silmar Morinigo Ramos, Heverton Ponces Arantes, Eber Augusto Ferreira do Prado, Daniel Luan Pereira Espindola, Érica Oliveira de Araujo e Jesse Valentim Dos Santos) pelo apoio, companheirismo e colaboração no desenvolvimento das atividades.

Aos funcionários dos Laboratórios da UFGD (João Augusto Machado da Silva, Laura Priscila Toledo Bernal, Bruno Cezar Álvaro Pontim) pela amizade e auxílio nas atividades, sem os quais seria difícil a realização das análises laboratoriais do trabalho.

A todos os funcionários da fazenda experimental da UFGD que diretamente contribuíram para a realização das atividades.

A CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Pela concessão de bolsa de Mestrado.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Pelo apoio financeiro no desenvolvimento da pesquisa, através do projeto “Biofertilizante formononetina (isoflavonóide) como estimulante de micorrização em soja e milho para aumento de produtividade associada a eficiência do uso de fertilizantes minerais”, aprovado no CNPq através do processo 559120/2009-5.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Leandro Ramão Paim, filho de Adoilton Paim da Silva e Iracy das Dores Ramão da Silva, nasceu em Dourados - MS, aos 15 dias do mês de Maio de 1986. Em março de 2004 ingressou na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - (UFMS) no curso de Agronomia, diplomando-se em março de 2009. Em março de 2010, iniciou o curso de Pós-graduação em Agronomia – Produção Vegetal, na Universidade Federal da Grande Dourados - (UFGD).

SUMÁRIO

	PÁGINA
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
CAPÍTULO 1	
FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE MICORRIZAÇÃO EM SOJA ASSOCIADO À FERTILIZANTE FOSFATADO EM LATOSSOLO.....	14
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
INTRODUÇÃO.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
CAPÍTULO 2	
FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE MICORRIZAÇÃO EM MILHO ASSOCIADO À FERTILIZANTE FOSFATADO EM LATOSSOLO.....	48
RESUMO.....	48
ABSTRACT.....	49
INTRODUÇÃO.....	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
CONCLUSÕES GERAIS.....	77

LISTA DE QUADROS

	PÁGINA
QUADRO 1. Caracterização química do solo.....	19
QUADRO 2. Caracterização física do solo.....	19
QUADRO 3. Resumo da análise de variância dos valores de número e massa seca de nódulos em raízes de soja.....	24
QUADRO 4. Resumo da análise de variância dos valores de teor de nitrogênio, fósforo e potássio na folha de soja.....	27
QUADRO 5. Resumo da análise de variância dos valores de teor de cálcio, magnésio e enxofre na folha de soja.....	31
QUADRO 6. Resumo da análise de variância da taxa de colonização para a cultura da soja.....	34
QUADRO 7. Resumo da análise de variância dos valores de altura de plantas de soja.....	36
QUADRO 8. Resumo da análise de variância de número de vagens, massa de grãos e produtividade da soja.....	39
QUADRO 9. Resumo da análise de variância do número de esporos no solo para a cultura da soja.....	42
QUADRO 10. Caracterização química do solo.....	53
QUADRO 11. Caracterização física do solo.....	53
QUADRO 12. Resumo da análise de variância dos valores de teor de nitrogênio, fósforo e potássio na folha de milho.....	57
QUADRO 13. Resumo da análise de variância dos valores de teor de cálcio, magnésio e enxofre na folha de milho.....	61
QUADRO 14. Resumo da análise de variância da taxa de colonização nas raízes do milho.....	65
QUADRO 15. Resumo da análise de variância dos valores de altura de plantas de milho.....	65

QUADRO 16. Resumo da análise de variância de número espigas por planta, massa de 100 grãos e produtividade de milho.....	67
QUADRO 17. Resumo da análise de variância do número de esporos no solo para a cultura do milho.....	69

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA 1. Precipitação pluviométrica e temperatura média durante a condução do experimento, de acordo com a estação meteorológica da Embrapa Agropecuária Oeste.....	20
FIGURA 2. Número de nódulos formados por bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes de soja, em função da dose de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	25
FIGURA 3. Massa seca de nódulos formados por bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes de soja, em função da dose de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	26
FIGURA 4. Teor de nitrogênio na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	28
FIGURA 5. Teor de fósforo na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	29
FIGURA 6. Teor de potássio na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de P_2O_5 no solo.....	30
FIGURA 7. Teor de cálcio na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P_2O_5	32
FIGURA 8. Teor de magnésio na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P_2O_5	33
FIGURA 9. Teor de enxofre na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P_2O_5	34
FIGURA 10. Taxa de colonização de raízes de soja por fungos micorrízicos arbusculares em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P_2O_5	35
FIGURA 11. Altura de plantas de soja, em função da aplicação de P_2O_5 no solo.....	37
FIGURA 12. Altura de plantas de soja, em função da aplicação de formononetina.....	38
FIGURA 13. Massa de 100 grãos de soja, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	39

FIGURA 14. Estimativa de produtividade de soja, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	40
FIGURA 15. Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no solo, após o cultivo da soja, em função da aplicação de formononetina na semente de soja, para cada dose de P_2O_5	43
FIGURA 16. Precipitação pluviométrica e temperatura média durante a condução de experimento, de acordo com a estação meteorológica da Embrapa Agropecuária Oeste.....	54
FIGURA 17. Teor de nitrogênio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	58
FIGURA 18. Teor de fósforo na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	59
FIGURA 19. Teor de potássio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	61
FIGURA 20. Teor de cálcio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de P_2O_5 no solo.....	62
FIGURA 21. Teor de magnésio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P_2O_5	63
FIGURA 22. Teor de magnésio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P_2O_5	64
FIGURA 23. Altura de plantas de milho em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	66
FIGURA 24. Número de espigas de milho por planta em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	67
FIGURA 25. Massa de 100 grãos de milho, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P_2O_5	68
FIGURA 26. 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 P_2O_5	70

RESUMO

PAIM, L.R. Universidade Federal da Grande Dourados, fevereiro de 2012. **Formononetina como estimulante de micorrização em soja e milho associado à fertilizante fosfatado em Latossolo.** Orientador: Antonio Carlos Tadeu Vitorino. Co-Orientadores: Munir Mauad; Walber Luiz Gavassoni.

RESUMO: As micorrizas proporcionam aumento de até 80% na absorção de fósforo, o que pode contribuir para a redução da adubação fosfatada, em solos que requerem elevadas quantidades deste nutriente. A formononetina estimula o crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular (FMAs) e acelera a micorrização. Com isso, objetivou-se com essa pesquisa verificar o efeito da formononetina na produção, absorção de nutrientes, taxa de colonização e esporulação de FMAs em soja e milho, e nodulação em soja. O experimento foi realizado em 2010/2011, num Latossolo Vermelho Distroférrico, na fazenda experimental da UFGD, município de Dourados - MS. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, arrançados em esquema de parcelas subdivididas, com cinco repetições, sendo quatro doses de fósforo nas parcelas (0; 17,5; 35 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅) fornecido com o superfosfato triplo, e quatro doses de formononetina nas sub-parcelas (0, 25, 50 e 100 g ha⁻¹) fornecida com o produto comercial PHC 506, aplicado na semente. Avaliou-se na soja e no milho a taxa de colonização das raízes por FMAs; teor de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre; número e massa seca de nódulos de bactérias fixadoras nas raízes de soja; no final do ciclo da soja e do milho avaliou-se a altura das plantas, número de vagens na soja, número de espigas no milho, massa de 100 grãos e produtividade. Após a colheita avaliou-se o número de esporos de FMAs no solo. A aplicação de formononetina aumenta a esporulação de FMAs em soja e milho, e taxa de colonização por FMAs em soja, aumenta o teor do enxofre em soja; aumenta o teor do nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, massa de grãos e altura em milho; aumenta o número de nódulos, massa seca de nódulos e produtividade da soja. Com isso, a aplicação de formononetina pode proporcionar a redução na adubação fosfatada em soja e milho.

Palavras-chave: Isoflavonóide; Micorriza; Fungo micorrízico arbuscular.

ABSTRACT

PAIM, L.R. Universidade Federal da Grande Dourados, February, 2012. **Formononetin as stimulating of mycorrhization in soybean and corn associated to phosphated fertilizer in Oxisol.** Advisor: Antonio Carlos Tadeu Vitorino. Co-Advisors: Munir Mauad; Walber Luiz Gavassoni.

ABSTRACT: The mycorrhizae provide up to 80% increase in the absorption of phosphorus, which can contribute to the reduction of phosphated fertilization in soils that require high amounts of this nutrient. The formononetin stimulates asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and accelerates the mycorrhization. Therefore, the objective of this research is to verify the effect of formononetin in production, nutrient absorption, rate of colonization and sporulation of AMF in soybean and corn, and nodulation in soybean. The experiment was conducted in 2010/2011, in the Dystroferric Red Oxisol, at the experimental farm of UFGD, in Dourados - MS. The experimental lineation used was randomized blocks, arranged in a split plot with five replications, with four dosages of phosphorus in the plots (0; 17,5; 35 and 70 kg ha⁻¹ of P₂O₅) provided with triple superphosphate and four dosages of formononetin in the subplots (0, 25, 50, 100 g ha⁻¹) provided with the commercial product PHC 506, applied to the seed. It was evaluated, in soybean and corn, the rate of root colonization by AMF; content of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, and sulfur; and also the number and dry weight of bacteria nodules fixative in the roots of soybean. At the end of the soybean and corn's cycles, it was evaluated the plant height, the number of pods in soybean, the number of corn cobs in maize plants, weight of 100 grains and productivity. After harvest, we evaluated the number of AMF spores in soil. The application of formononetin increases sporulation of AMF in soybean and corn, it also increases the rate of colonization by AMF in soybean and the content of sulfur in soybean; it increases the content of nitrogen, phosphorus, potassium, and sulfur, weight of grains and height in corn; it increases the number of nodules, and the dry weight of nodules and productivity of soybeans. Thus, we can conclude that the application of formononetin can provide a reduction in phosphorus fertilization in soybean and corn.

Keywords: Isoflavonoid; Mycorrhiza; Arbuscular mycorrhizal fungi.

INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos verifica-se uma crescente busca pela prática da chamada agricultura sustentável, que se traduz na produção sem degradar o meio ambiente, promovendo rentabilidade econômica. Neste contexto, existem diversos estudos com diferentes tipos de interações bióticas, incluindo microrganismos do solo que podem auxiliar a busca por esse objetivo e, dentre eles tem-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). Acredita-se que esses fungos tenham origem a cerca de 400 milhões de anos e são capazes de associarem-se as raízes de 95% das espécies vegetais. Essa associação é simbiótica e mutualística e é denominada micorriza, existindo diversos tipos, dentre elas as micorrizas arbusculares (MAs).

As micorrizas são encontradas nos mais variados tipos de solos e ambientes, sendo sua contribuição para as plantas relatada em diversos trabalhos (DAVIES et al., 2005; LAMBAIS et al., 2003 SIQUEIRA et al., 1992). Por meio dessa associação, o fungo recebe da planta fotoassimilados e transferem nutrientes e água à planta hospedeira, promovendo importantes modificações fisiológicas, metabólicas e nutricionais.

Os fungos micorrízicos arbusculares são biotróficos obrigatórios, ou seja, dependem do hospedeiro vivo para completar o seu ciclo de vida. Pertencem ao filo Glomeromycota, classe Glomeromycetes. Suas hifas são asseptadas, o diâmetro dos seus esporos varia de acordo com a espécie, mas encontra-se na faixa de 22 a 1050 μm . A colonização ocorre no córtex da raiz. Nos fungos micorrízicos arbusculares há formação de uma estrutura chamada arbúsculo, que é formada pela ramificação das hifas na região entre a parede celular e a membrana plasmática da célula vegetal. Essa estrutura tem a função de troca de nutrientes entre a planta e o fungo. Algumas espécies podem formar vesículas, estrutura responsável pelo armazenamento de substâncias (SOUZA et al., 2010).

Os glomoesporos são as principais estruturas de sobrevivência dos fungos micorrízicos arbusculares, sendo que ainda não está esclarecida se a reprodução sexuada ocorre, assumindo-se que tem reprodução assexuada. Antes de estabelecer a simbiose os FMAs têm uma fase chamada assimbiótica, onde ocorre a germinação, formação do tubo germinativo e pequena produção de hifas. Apesar de serem biotróficos obrigatórios, a germinação pode ocorrer na ausência do hospedeiro, devido às reservas

nutricionais do glomoespore sendo que algumas espécies podem emitir vários tubos germinativos até o encontro com o hospedeiro. Caso o fungo não infecte a raiz, a hifa entra em senescência (MAIA et al., 2010).

O Brasil possui a maior área de terras agricultáveis do mundo, sendo normalmente de baixa fertilidade e, portanto requerem a aplicação de grandes quantidades de corretivos e fertilizantes, principalmente os fosfatados. A adubação fosfatada é essencial à agricultura, principalmente nos cerrados brasileiros, onde grande parte dos solos apresenta extrema deficiência em fósforo. Com isso, o Brasil é um grande consumidor de fertilizantes fosfatados, sendo que em 2010 o consumo foi de 3,4 milhões de toneladas e a demanda continua crescendo. Segundo Lopes et al. (2004) a maior parte destes adubos é importada, tornando o fósforo um recurso estratégico para o país. Aliado a isso, esses mesmos autores, estimam que as reservas mundiais de rochas fosfáticas para a produção de fertilizantes poderão acabar em aproximadamente 120 anos.

Devido à fixação do fósforo pelos coloides do solo, até 90% do adubo fosfatado solúvel pode ser adsorvido (MALAVOLTA et al., 2006), por isso, é necessário aumentar a eficiência da adubação fosfatada. A soja e o milho são importantes culturas no Brasil, consumindo boa parte dos adubos fosfatados, no entanto, essas culturas são responsivas a adubação fosfatada e a micorrização. Nesse sentido, as micorrizas arbusculares podem aumentar o aproveitamento do fósforo aplicado no solo e reduzir o uso da adubação fosfatada.

Segundo Malavolta et al. (2006), o fósforo tem funções importantes nas plantas, sendo constituintes de compostos de energia, fosfolipídios e outros ésteres. De acordo com Sinclair (1993) citado por Rosolém e Tavares (2006) a soja requer quantidades relativamente altas de fósforo, especialmente na época de formação das vagens. Segundo Carrenho et al. (2010) parte dessa elevada necessidade de fósforo se deve à demanda para o crescimento e fixação biológica de nitrogênio.

Segundo Rosolém (1982) citado por Rosolém e Tavares (2006) a maior absorção de fósforo na soja ocorre entre os estádios V4 e R6 com a absorção de 0,2 a 0,4 kg ha⁻¹ dia⁻¹, sendo que do total absorvido 60% ocorre após R1. Assim, a cultura da soja necessitaria de um suprimento constante deste nutriente durante praticamente todo o seu ciclo. Com isso, a baixa disponibilidade de fósforo, principalmente no Cerrado é uma das principais limitações na produção de grãos de soja.

No milho, para a produção de 9 t de grãos ha⁻¹ necessita-se de 34 kg de fósforo. Deste total, 77 a 86% do fósforo é exportado para os grãos (COELHO et al., 2010). Sendo assim, o fósforo é o terceiro nutriente mais exigido e, sua demanda é muito próxima do cálcio e magnésio e muito abaixo do nitrogênio e potássio. Apesar disso, é recomendada adubação fosfatada elevada, devido à baixa eficiência da adubação, causada pelo processo de adsorção do fósforo pelas partículas do solo.

O fósforo no solo tem grande influência nos fungos micorrízicos arbusculares, sendo o mecanismo que regula a relação entre a planta e o fungo e parece estar relacionados com nível crítico de fósforo (COSTA et al., 2001). De maneira geral, a baixa quantidade de fósforo no solo proporciona aumento na germinação de glomoesporos e maior crescimento assimbiótico dos fungos micorrízicos arbusculares (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Solos férteis tendem a reduzir a colonização interna pelas micorrizas (CARDOSO et al., 2010).

Em geral, para o milho e soja ocorre redução na taxa de colonização por FMAs quando aplicado fósforo (CARRENHO et al., 2010). Além da quantidade de fósforo no solo, a capacidade de absorção do mesmo pela planta é importante. Oliveira et al. (2009) observaram que 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.

Um dos principais efeitos da micorrização é o aumento na absorção de nutrientes, especialmente para aqueles de baixa mobilidade no solo, que chegam às raízes principalmente por difusão. Nesse grupo tem-se o fósforo, zinco e cobre. As hifas têm elevada capacidade de absorção, pois apresentam extensão 823 vezes maior do que a das raízes (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). O'Keefe e Sylvia (1991), usando modelos de absorção e considerando diâmetro médio de 8 µm e 250 µm para hifas e raízes, respectivamente, estimaram que o aumento da área de superfície devido à micorrização pode atingir 1.800% e que o fluxo de fósforo pode ser aumentado em 477% para um aumento de apenas 3% na área de superfície.

O fósforo é o principal nutriente sobre o qual a micorriza tem efeito. De acordo com estimativas de Marschner e Dell (1994) pode ocorrer aumento de até 80% na sua absorção. Esse nutriente é absorvido quando em contato com as raízes, assim, quando a planta está colonizada por fungo micorrízico arbuscular as hifas externas torna-se uma extensão das raízes, formando a micorrizosfera (CARDOSO et al., 2010), aumentando sua absorção. Além disso, pode ocorrer aumento na absorção do fósforo

mineralizado, pois há evidências de que as micorrizas podem mobilizar fósforo do solo por meio de modificações químicas na rizosfera, incluindo até a mineralização do P-orgânico (BOLAN, 1991). Segundo Joner et al. (2000) a atividade microbiana saprofítica na micorrizosfera pode ser aumentada e a hifa tem capacidade de capturar o fósforo mineralizado mais rapidamente, evitando a fixação.

Cardoso et al. (2006) trabalharam com milho resistente aos elevados teores de alumínio, em vaso, e analisaram diferentes fracionamentos de fósforo antes e depois do tratamento com micorrizas. Nas plantas não micorrizadas não houve mudanças na fração de fósforo orgânico e inorgânico, mas para as plantas micorrizadas ocorreu o esgotamento da fração inorgânica e de 20% da fração de fósforo inorgânica parcialmente disponível (Pi-NaOH), ou seja, permitiu acesso da planta ao fósforo que não estaria disponível em curto tempo.

Em muitos estudos observa-se que plantas micorrizadas são mais eficientes em utilizar rocha fosfatada (COSTA et al., 2002). Ness e Vlek (2000) verificaram que o milho micorrizado absorveu fósforo da hidroxiapatita. Acredita-se que esse efeito se deve ao maior alcance das hifas externas absorvendo rapidamente cada íon solubilizado.

Estudos realizados em laboratório, com *Brachiaria decumbens* e *Stylosanthes* sp., Alves (1988) observou que houve absorção de fósforo fixado no solo quando são micorrizadas. A mobilização de fosfato do solo pelas micorrizas pode atingir 60% do fósforo absorvido (OSORIO e HABTE, 2009) e, esta capacidade se reveste de grande interesse para a produção agrícola nos trópicos, onde os solos apresentam elevada retenção desse nutriente que pode ser mobilizado por raízes micorrizadas.

Ainda não está definido qual o mecanismo proporciona aumento na absorção de fósforo em plantas micorrizadas. Algumas das hipóteses são: Maior volume de solo explorado e exploração de regiões de difícil acesso pelas raízes (CARDOSO et al., 2010). Melhoria nos parâmetros cinéticos de absorção de fósforo pelas hifas, como, por exemplo, maior velocidade na absorção e maior afinidade com o fósforo, aumentando a absorção em soluções pobres nesse nutriente (SILVEIRA e CARDOSO, 2004). As raízes e hifas solubilizam o fósforo por meio de alterações químicas (FENG et al., 2003).

A micorrização pode aumentar a absorção de nitrogênio, principalmente aquele na forma amoniacal, pois ele é menos móvel no solo (MOREIRA e SIQUEIRA,

2006). Segundo Marschner e Dell (1994) a maior absorção de nitrogênio amoniacal pode influenciar a absorção de fósforo por diminuir o pH da micorrizosfera.

O nitrogênio pode ter sua absorção aumentada pelas micorrizas, por promover absorção mais eficiente de nitrogênio mineralizado, devido a penetrarem mais facilmente na matéria orgânica em decomposição (HODGE, 2003). Além disso, a micorrização pode afetar a fixação biológica, ela é dependente de energia (ATP), com isso, um suprimento adequado de fósforo favorece esse processo (CARDOSO et al., 2010). O nódulo é considerado um forte dreno de fósforo, sendo seu teor três vezes maior que nos outros tecidos da planta (VADEZ et al., 1997). O suprimento adequado de fósforo aumenta o vigor dos nódulos e sua eficiência, favorecendo o desenvolvimento das micorrizas.

De acordo com estimativas de Marschner e Dell (1994), ocorre aumento de 60% na absorção do cobre, 25% do nitrogênio, 25% do zinco e 10% do potássio. Além disso, elas podem melhorar as condições de agregação do solo (RILLIG et al., 2001; ZHU e MILLER, 2003), proporcionar maior tolerância à toxicidade de metais pesado (SIQUEIRA et al., 1999), estimular à nodulação em leguminosas (CARVALHO e MOREIRA, 2010), maior tolerância a doenças (KLAUBERG FILHO, 2005), maior tolerância a déficit hídrico (PAULA e SIQUEIRA, 1987).

A melhoria na qualidade física do solo ocorre porque os fungos micorrízicos arbusculares representam de 5 a 20% de toda a biomassa microbiana dos solos e por serem os fungos mais abundantes nos solos agrícolas. Suas hifas chegam a 900 kg ha⁻¹ (ZHU e MILLER, 2003) e seu comprimento de dezenas de metros por grama de solo (NOGUEIRA e CARDOSO, 2000). Essa biomassa pode fornecer matéria orgânica para o solo e todos os benefícios originados da mesma. Os fungos micorrízicos arbusculares podem produzir substâncias, que auxiliam na agregação do solo, sendo a glomalina a principal representante (RILLIG et al., 2001). Ocorrendo assim, ocorre maior estabilidade de agregados (PURIN, 2005).

A micorriza proporciona maior tolerância ao estresse hídrico, esse efeito deve-se ao efeito cumulativo de mudanças hormonais, fisiológicas e celulares, como por exemplo, redução na transpiração, maior eficiência no uso da água, aumento no conteúdo de clorofila e aumento na taxa fotossintética (CAVALCANTE et al., 2001).

Em plantas micorrizadas ocorrem mudanças na translocação de fotoassimilados, devido às micorrizas serem drenos, conseqüentemente aumentando a translocação para as raízes. A colonização aumenta a demanda de carbono para as

raízes, que poderia causar prejuízos caso não houvesse o fornecimento de nutrientes e água pelas micorrizas, com isso a planta pode produzir mais carbono para suprir o seu crescimento e o crescimento da micorriza. Entre 10 a 20% do carbono fixado é direcionado ao crescimento e manutenção micelial (RAMOS e MARTINS, 2010). Inicialmente, existe um elevado gasto de carbono para o crescimento e manutenção das hifas. A micorriza pode causar a redução no crescimento de plantas, quando a quantidade de carbono consumido pela micorriza é maior que seu benefício. Isso geralmente ocorre em solos ricos em fósforo e essa redução varia entre 12 a 17% (SENA et al., 2004; RAMOS e MARTINS, 2010).

A inoculação direta com fungos micorrízicos arbusculares no solo em condições de campo ainda é inviável, principalmente em grandes áreas, devido à elevada quantidade de inoculante necessária e o custo de produção e aplicação desse insumo. As raízes das plantas produzem várias substâncias que são liberadas no solo, como, carboidratos, aminoácidos, enzimas, hormônios, ácidos orgânicos, vitaminas, proteínas, íons orgânicos, metabolitos secundários (flavonóides, terpenóides). Acredita-se que os flavonóides são fatores estimulantes da micorrização, pois regulam diversas atividades dos microrganismos do solo, dentre elas, a ativação de genes relacionados à germinação de glomoesporos e crescimento micelial de fungo micorrízico arbuscular. Dentre os flavonóides estudados temos a formononetina, que pode estimular a micorrização (SILVA JÚNIOR e SIQUEIRA, 1997).

Nair et al. (1991) isolaram e identificaram de raízes de trevo (*Trifolium repens*) substâncias produzidas em maiores quantidades em plantas estressadas pela deficiência de fósforo, denominada formononetina e, observaram que esta substância, identificadas como isoflavonóide, é ativa sobre propágulos de fungo micorrízico arbuscular. Estudos *in vitro* demonstraram que a formononetina é o principal composto bioativo que atua estimulando o crescimento assimiótico de esporos de fungo micorrízico arbuscular e acelera a micorrização, favorecendo o crescimento da planta hospedeira.

Além do efeito na micorrização, a formononetina pode ter efeito direto na simbiose entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Segundo Carvalho e Moreira (2010) a infecção de bactérias fixadoras de nitrogênio em plantas é guiada por sinais moleculares, trocados entre plantas e bactérias e os flavonóides liberados pelas raízes de plantas desempenham papel importante na fase inicial da nodulação.

O efeito estimulante da formononetina na formação de micorriza pode ser devido à formação de maior número de apressórios ou de pontos de entradas. Algumas evidências indicam que ela suprime a atividade da enzima peroxidase que atua de modo restritivo à entrada do fungo na raiz (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Acredita-se que a formononetina possa aumentar a esporulação e taxa de colonização de FMAs. A sua aplicação em seis cultivares de batatas em solos do planalto peruano aumentou em mais de três vezes o número de esporos e promoveu aumentos significativos no desenvolvimento dos tubérculos de três das seis cultivares estudadas (DAVIES et al., 2005). Novais e Siqueira (2009) verificaram aumento na colonização quando aplicaram formononetina em *Brachiaria decumbens*.

O uso da formononetina tem promovido ganhos de produtividade em diversas culturas, como a soja (SIQUEIRA et al., 1992), feijão (LAMBAIS et al., 2003) e milho (SIQUEIRA et al., 1992). Romero (1999) avaliou a formononetina em condições e campo e concluiu que seu uso é viável economicamente tendo um mercado potencial no Brasil. Segundo Miranda e Miranda (1997) a contribuição da micorriza varia de acordo com a espécie de fungo micorrízico arbuscular, a fertilidade do solo e dependência micorrízica da planta.

A dependência micorrízica da soja é considerada elevada. Cerca de 80% do crescimento pode depender da associação da planta com a micorrizas. Mesmo em solos férteis em fósforo observa-se a contribuição da micorrização em até 20%. No campo, tem-se observado ganho de produtividade em plantas micorrizadas de 200 kg ha⁻¹ de grãos de soja (MIRANDA e MIRANDA, 1997).

Nogueira e Cardoso (2000) estudaram a soja, em casa de vegetação, e verificaram que plantas micorrizadas tiveram maior crescimento, mas as respostas variaram, dependendo da espécie de fungo micorrízico arbuscular, por exemplo, o gênero *Glomus* causou resposta satisfatória, diferente do *Gisgaspora*. Esse fato indica que a resposta benéfica está ligada a compatibilidade entre a espécie de fungo e planta. Cardoso et al. (2003) verificaram redução da parte aérea da soja inoculada com *Glomus etunicatum* e *Gisgaspora margarita* e aumento para a espécie *Glomus macrocarpum*.

Miranda e Miranda (1997) verificaram aumento em torno de 77% na massa seca de plantas de soja, aumento nos teores de fósforo e nitrogênio, comparando-se plantas micorrizadas e não micorrizadas. Verificaram ainda que plantas micorrizadas adubadas com nitrogênio apresentaram menor ganho de massa seca que plantas micorrizadas inoculadas com bactérias. Para as leguminosas o balanço nutricional

adequado é importante e, em condições de baixa disponibilidade de fósforo ocorre menor nodulação, no entanto quando na presença de fungos micorrízicos arbusculares esse fato não é verificado. Oliveira (1998) verificou aumento na massa seca de nódulos, número de nódulos e na atividade da nitrogenase.

Em estudo em campo com aplicação de um produto a base de formononetina, verificou-se aumento na produtividade 52% para soja e 24% para o milho (SIQUEIRA et al., 1992). Também Romero (1999), avaliando produtividade da cultura do milho, observou aumentos de 14 a 28% na produção desta cultura. A formononetina estimulou o crescimento, acúmulo de nutrientes, e colonização micorrízica em soja (SILVA JÚNIOR e SIQUEIRA, 1998 CARRENHO et al., 2010).

Estudando a formação de micorriza em soja e milho com aplicação de formononetina sintética, Silva Júnior e Siqueira (1997) verificaram que ocorreu aumento na formação de micorrízica, além do aumento dos valores máximos de diversos parâmetros da colonização (pontos de entrada, porcentagem de colonização, arbúsculos, e outros). No milho, Siqueira et al. (1999) verificaram que a aplicação de formononetina aumentou em quase 50% a colonização das raízes.

Na cultura do milho ocorre maior crescimento quando micorrizada e acredita-se que uma das explicações para esse fato é o aumento na assimilação de dióxido de carbono e, conseqüentemente, aumento da fotossíntese (GRAHAM e EISSENSTAT, 1994).

O sistema radicular do milho pode ser modificado na presença de micorrizas, Bressan e Vasconcellos (2002) verificaram correlação positiva e significativa entre massa seca de raízes e taxa de colonização em milho. Plantas de milho sem micorrização, mas adubadas com fósforo tiveram elevação na massa seca de raiz e aumento no número de pelo radicular e maior absorção de fósforo. Já as plantas micorrizadas tiveram menor número de pelos radiculares, mas as hifas micorrízicas, provavelmente, supriram essa redução e, também proporcionando aumento na absorção de fósforo. Costa et al. (2002) avaliaram o milho micorrizados em solo ácido e verificaram aumento da matéria seca das raízes quando a micorrização era associada à fonte solúvel de fósforo.

Com isso, objetivou-se com essa pesquisa verificar a eficácia de um produto estimulante da micorrização nas culturas da soja e do milho. E os objetivos específicos foram: verificar o efeito de um produto estimulante da micorrização na produção de grãos de soja e milho; verificar o efeito da aplicação do estimulante de micorriza na

absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre pela cultura da soja e do milho; verificar o efeito do estimulante de micorriza na taxa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas raízes de soja e milho e número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo após colheita de soja e milho; verificar o efeito da aplicação do bioestimulante de micorrização na nodulação das raízes da soja, oriundos da simbiose entre soja e bactérias fixadoras de nitrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.L.N. **Micorrizas vesicular-arbusculares no crescimento e utilização do fósforo de solo pela braquiária e estilosantes**. 1988. 42f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – ESAL, Lavras - MG.
- BOLAN, N.S. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant and Soil**, v.134, p.189-207, 1991.
- BRESSAN, W.; VASCONCELLOS, C.A. Alterações morfológicas no sistema radicular do milho induzidas por fungos micorrízicos e fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.509-517, 2002.
- CARDOSO, E.J.B.N.; NAVARRO, R.B.; NOGUEIRA, M.A. Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob dose crescentes deste nutriente. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.415-423, 2003.
- CARDOSO, I.M.; BODDINGTON, C.; JANSSEN, B.H.; OENEMA, O.; KUYPER, T.W. Differential Access to phosphorus pools of an Oxisol by mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. **Commun Soil Science Plant Analysis**, v.37, p.11-12, 2006.
- CARVALHO, T.S.; MOREIRA, F.M.S. Simbioses leguminosas, fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. 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.383-414.
- CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; COSTA, C.M.C.; SANTOS, V.F. Mycorrhizal dependency of passion fruit (*Passiflora edulis* f.flavicarpa). **Fruit**, v.56, p.317-324, 2001.
- 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. **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Lavras: Editora UFLA, 2010. p.215-250.
- 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.
- COSTA, C.M.C.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; NOGUEIRA, R.J.M.C. Influencia de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.893-901, 2001.

COSTA, T.A.; SCHUNK, E.; PINTRO, J.C.; COSTA, S.M.G. Influência da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares da acidez do solo e de fontes de fósforo no crescimento do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.24, p.1583-1590, 2002.

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.

FENG, G.; SONG, Y.C.; LI, X.L.; CHRISTIE, P. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. **Applied Soil Ecology**, v.22, p.139-148, 2003.

GRAHAM, J.H.; EISSENSTAT, D.M. Host genotype and formation and function of VA mycorrhizae. **Plant and Soil**, v.159, p.159-179, 1994.

HODGE, A. Plant nitrogen capture from organic matter as affected by spatial dispersion, interspecific competition and mycorrhizal colonization. **New Phytologist**, v.157, p.303-314, 2003.

JONER, E.J.; JAKOBSEN, I. Growth e extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. **Soil Biology & Biochemistry**, v.27, p.1153-1159, 1995.

JONER, E.J.; Van AERLE, I.M.; VOSATKA, M. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae. **Plant and Soil**, v.226, p.199-210, 2000.

KLAUBERG FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; SOARES, C.R.F.S.; SILVA, S. Ecologia, função e potencial de aplicações de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: TORRADO, P.V.; ALLEONI, L.R.F.; COOPER, M.; DA SILVA, A.P.; CARDOSO, E.J.B.N. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p.85-144.

LAMBAIS, M.R.; RÍOS R.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.160, p.421-428, 2003.

LOPES, A.S.; SILVA, C.A.P.; BASTOS, A.R.R. Reservas de fosfatos e produção de fertilizantes fosfatados no Brasil e no mundo. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S.R.S. (Ed). **Fósforo na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: POTAFOS, 2004. p.13-34

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.

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v.59, p.89-102, 1994.

MIRANDA, J.C.C.; MIRANDA, L.N. Micorriza arbuscular. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: Embrapa- CPAC, 1997. 524p.

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.

NESS, R.L.L.; VLEK, P.L.G. Mechanism of calcium and phosphate release from hydroxyl-apatite by mycorrhizal hyphae. **Soil Science Society of America Journal**, v.64, p.949-955, 2000.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento da soja em função de doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.329-338, 2000.

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.

O'KEEFE, D.M.; SYLVIA, D.M. Mechanisms of the vesicular-arbuscular mycorrhizal plant-growth response. IN: ARORA, D.K. et al. (ed). **Handbook of Applied Micology**. New York: M. Dekker, 1991, p.35-53.

OLIVEIRA, R.S. **Alterações na dinâmica da competição entre estirpes de rizóbio pelos sítios de nodulação nas raízes de soja e suas consequências no crescimento das plantas causadas pelos Fungos micorrízicos arbusculares**. 1998. 75f. Dissertação (Mestrado) – UNB, Brasília – DF.

OSORIO, N.W.; HABTE, M. Strategies for utilizing arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing microorganisms for enhanced phosphate uptake and growth of plants in the soils of the tropics. In: KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; MUSARRAT, J. (Eds.) In: **Microbial Strategies for Crop Improvement**. Berlin: Springer-Verlag, 2009. p.325-351.

PAULA, M.A.; SIQUEIRA, J.O. Efeito da umidade do solo sobre a simbiose endomicorrízica em soja. II. Crescimento, nutrição e relação água-planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.11, p.289-293, 1987.

PURIN, S. **Fungos micorrízicos arbusculares: atividade, diversidade e aspectos funcionais em sistemas de produção de maçãs**. 2005. 182 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages - SC.

RAMOS, A.C.; MARTINS, M.A. Fisiologia de micorrizas arbusculares. 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.134-152.

RILLIG, M.G.; WRIGHT, S.F.; NICHOLS, K.A.; SCHMIDT, W.F.; TORN, M.S. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil**, v.233, p.167-177, 2001.

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

ROSOLÉM, C.A.; TAVARES, C.A. Sintomas de deficiência tardia de fósforo em soja. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.30, p.385-389, 2006.

SENA, J.O.A; LABATE, C.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Physiological characterization of growth depression in arbuscular mycorrhizal citrus seedlings under high P levels. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.827-832. 2004.

SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants. **Scientia Agricola**, v.61, p.203-209, 2004.

SILVA JÚNIOR, J.P.; SIQUEIRA, J.O. Colonização micorrízica e crescimento da soja com diferentes fungos e aplicação do isoflavonóide formononetina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.953-959, 1998.

SILVA JÚNIOR, J.P.; SIQUEIRA, J.O. Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.35-41, 1997.

SIQUEIRA, J.O.; BROWN, D.G.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Field application of the VA-mycorrhiza stimulating isoflavonoid formononetin (Rhizotropin™) on corn and soybean in Brazil. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MANAGEMENT OF MYCORRHIZAS IN AGRICULTURE, HORTICULTURE AND FORESTRY, 1992, Perth. **Proceedings...** Perth: University of Western Australia, 1992. 132p.

SIQUEIRA, J.O.; POUYÚ, E.; MOREIRA, F.M.S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores em solos com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.569-580, 1999.

SOUZA, F.A.; STÜRMER, S.L.; CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. 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.15-74

VADEZ, V.; BECK, D.P.; LASSO, J.H.; DREVON, J.J. Utilization of the acetylene reduction assay to screen for tolerance of symbiotic N₂ fixation to limiting P nutrition in common bean. **Physiologia Plantarum**, v.99, p.227-232, 1997.

ZHU, Y.G.; MILLER, R.M. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil – plant systems. **Trends Plant Science**, v.8, p.407-409, 2003.

CAPÍTULO 1

FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE MICORRIZAÇÃO EM SOJA ASSOCIADO À FERTILIZANTE FOSFATADO EM LATOSSOLO

RESUMO: As micorrizas proporcionam aumento de até 80% na absorção de fósforo, o que pode contribuir para a redução da adubação fosfatada, em solos que requerem elevadas quantidades desse nutriente. A formononetina estimula o crescimento assimbiótico do fungo micorrízico arbuscular (FMAs) e acelera a micorrização. Com isso, objetivou-se com essa pesquisa verificar o efeito da formononetina na produção, absorção de nutrientes, taxa de colonização, esporulação dos FMAs e nodulação na cultura da soja. O experimento foi realizado em 2010/2011, num Latossolo Vermelho Distroférico, na fazenda experimental da UFGD, município de Dourados - MS. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, arranjos em esquema de parcelas subdivididas, com cinco repetições, sendo quatro doses de fósforo nas parcelas (0; 17,5; 35 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅) fornecido com o superfosfato triplo, e quatro doses de formononetina nas sub-parcelas (0, 25, 50 e 100 g ha⁻¹) fornecida com o produto comercial PHC 506, aplicado na semente. Avaliou-se a taxa de colonização das raízes por FMAs; teor de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre; número e massa seca de nódulos de bactérias fixadoras nas raízes de soja; no final do ciclo da cultura avaliou-se a altura das plantas, número de vagens, massa de 100 grãos e produtividade. Após a colheita avaliou-se o número de esporos de FMAs no solo. A aplicação de formononetina aumenta a esporulação e a taxa de colonização por FMAs, o teor do enxofre, o número e massa seca de nódulos nas raízes e a produtividade. Com isso, pode-se concluir que existe possibilidade de redução na adubação fosfatada na cultura da soja quando utilizada a formononetina.

Palavras-chave: Isoflanóide; Micorriza; Fungo micorrízico arbuscular.

FORMONONETIN AS STIMULATING OF MYCORRHIZATION IN SOYBEAN ASSOCIATED TO PHOSPHATED FERTILIZER IN OXISOL

ABSTRACT: The mycorrhizae provide up to 80% increase in the absorption of phosphorus, which can contribute to the reduction of phosphated fertilization in soils that require high amounts of this nutrient. The formononetin stimulates asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and accelerates the mycorrhization. Therefore, the objective of this research is to verify the effect of formononetin in production, nutrient absorption, rate of colonization and sporulation of AMF, and nodulation in soybean. The experiment was conducted in 2010/2011, in a Dystroferic Red Oxisol, at the experimental farm of UFGD, in Dourados - MS. The experimental lineation used was randomized blocks, arranged in a split plot, with five replications, with four dosages of phosphorus in the plots (0; 17,5 ; 35 and 70 kg ha⁻¹ of P₂O₅) provided with triple superphosphate and four dosages of formononetin in the sub-plots (0, 25, 50 and 100 g ha⁻¹) provided with the commercial product PHC 506, applied to the seed. It was evaluated the rate of root colonization by AMF; content of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, and sulfur; and also the number and dry weight of nodules bacteria fixative in the soybean roots. At the end of the cycle, it was evaluated the plant's height, the number of pods, weight of 100 grains, and productivity. After harvest, we evaluated the number of AMF spores in soil. The application of formononetin increases sporulation of AMF, and the rate of colonization by the same, the content of sulfur, the number and dry weight of nodules in the roots, and productivity. Thus, we can conclude that there is the possibility of reduction in phosphorus fertilization in soybean when formononetin is used.

Keywords: Isoflavonoid; Mycorrhiza; Arbuscular mycorrhizal fungi.

INTRODUÇÃO

Micorriza é a associação simbiótica e mutualística entre plantas e fungos micorrízicos e, existem diversos tipos, destacando-se as micorrizas arbusculares (MAs), formados pelas fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e plantas. As micorrizas arbusculares são benéficas às plantas, pois podem ocasionar melhorias na agregação do solo, na absorção de nutriente, na tolerância a doenças e estresses ambientais, na tolerância à toxicidade por nutrientes e metais pesados no solo, no estímulo à fixação biológica de nitrogênio nas plantas, substâncias estimuladoras ao crescimento e alterações bioquímicas e fisiológicas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). E, também, maior atividade e biomassa da microbiota do solo (ANDRADE e SILVEIRA, 2004).

O fósforo tem funções importantes na planta, é constituinte de compostos de energia (ATP), fosfolipídios e outros ésteres (MALAVOLTA et al., 2006). Vários fatores podem alterar a resposta da planta a micorrização, dentre eles o teor de fósforo no solo. Geralmente, a baixa quantidade de fósforo no solo provoca aumento na germinação e crescimento assimbiótico dos fungos micorrízicos arbusculares (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Segundo Carrenho et al. (2010) a interação entre nível de fósforo e micorriza é observada na soja e, geralmente, o fósforo reduz a colonização.

O efeito da micorriza no teor e acúmulo de nutrientes é variado. Costa et al. (2002) verificaram aumento nos teores de potássio de plantas de milho micorrizadas. Santos et al. (2002) não encontraram efeito da micorrização no acúmulo de potássio, enxofre, cálcio e magnésio em *Brachiaria brizantha*. Andrade et al. (2003) observaram aumento nos teores de cálcio em soja micorrizada. Cardoso et al. (2003) observaram menor teor de nitrogênio nas plantas de soja micorrizadas com *Glomus macrocarpum* e maior nas plantas com *Gigaspora margarita*, respectivamente, plantas com a maior e a menor produção de biomassa, o que evidencia o efeito diluição desse nutriente. Para o fósforo, geralmente ocorre aumento no teor, mas os autores não verificaram esse efeito, já para o potássio observaram aumento no seu teor.

A micorrização pode proporcionar maior produção de biomassa e crescimento de plantas. Silva et al. (2006) verificaram que a produção de massa seca aumentou com a inoculação das plantas de soja e correlacionou-se significativa e positivamente com a colonização micorrízica e, segundo os autores efeito esse

proporcionado em parte, pelo aumento na absorção de nutrientes. Cardoso et al. (2003) verificaram redução da parte aérea da soja inoculada com *Glomus etunicatum* e *Gisgaspora margarita* e aumento para a espécie *Glomus macrocarpum*. Silva et al. (2006) observaram que a inoculação prévia promoveu incremento na altura das plantas.

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 (NAIR et al., 1991). Acredita-se que os flavonóides estimulam o crescimento do fungo; induza a formação e a diferenciação morfológica, levando a maior formação de apressórios e pontos de entradas primários. Algumas evidências indicam que ela suprime a atividade da enzima peroxidase, que atua de modo restritivo à entrada do fungo na raiz (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Devido ao estímulo à micorrização, a formononetina pode aumentar a nodulação e eficiência da fixação biológica de nitrogênio, pois segundo Vadez et al. (1997) o nódulo é considerado um forte dreno de fósforo, sendo seu teor três vezes maior que nos outros tecidos da planta. Com isso, o suprimento adequado de fósforo aumenta o vigor dos nódulos e sua eficiência. Além disso, alguns autores mostraram que a formononetina, também, pode atuar diretamente na fase inicial da nodulação (CARVALHO e MOREIRA, 2010). Com isso, a micorrização pode proporcionar aumento na massa seca de nódulos e número de nódulos. Silva et al. (2006) encontraram incremento na massa seca de nódulos em soja inoculada com fungos micorrízicos arbusculares.

A formononetina pode estimular o crescimento, acúmulo de nutrientes, e colonização micorrízica em soja (CARRENHO et al., 2010). Lambais et al. (2003), na cultura do feijão, verificaram que a formononetina estimula a colonização das raízes. Siqueira et al. (1992) em estudo em campo com aplicação de um produto a base de formononetina, verificaram aumento de 52% na produtividade da soja.

Alguns autores têm relatado aumento na esporulação de fungos micorrízicos arbusculares causado pela formononetina. Pereira et al. (2011) encontraram aumento de 30% na esporulação da espécie *Glomus clarum* quando foi aplicado em solo contaminado por arsênio. Davies et al. (2005) observaram aumento de mais de três vezes o número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares em solos cultivados com batata que receberam formononetina.

Com isso, objetivou-se com a pesquisa verificar a eficácia de um produto estimulante da micorrização na cultura da soja. E os objetivos específicos foram:

verificar o efeito de um produto estimulante da micorrização na produção de grãos; verificar o efeito da aplicação do estimulante de micorriza na absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre; verificar o efeito do estimulante de micorriza na taxa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas raízes e número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo; verificar o efeito da aplicação do bioestimulante da micorrização na nodulação das raízes da soja, oriundos da simbiose entre soja e bactérias fixadoras de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2010/2011, 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 WO 54° 59' 25", 401 m de altitude.

O solo foi amostrado e sua caracterização química (Quadro 1) e física (Quadro 2) realizada segundo metodologia proposta por Claessen et al. (1997). Com base nos teores de nutrientes presentes na análise de solo fez-se a adubação do solo seguindo as recomendações de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) para a cultura da soja.

QUADRO 1. Caracterização química do solo

pH CaCl ₂	P	K	Al	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
	mg dm ⁻³	-----cm _e dm ⁻³ -----							%
5,0	13,0	0,18	0,12	6,10	2,20	6,20	8,48	14,8	57,0

P e K: Melich I; Ca, Mg e Al: KCl 1 mol L⁻¹; SB = Ca + Mg + K; T=CTC= Sb + H+Al; Saturação em bases (V) = 100 * (SB/T).

QUADRO 2. Caracterização física do solo

Textura (g kg ⁻¹)			Dp (g cm ⁻³)	Ds (g cm ⁻³)		
areia	silte	argila		0 - 5 (cm)	5 - 10 (cm)	10 - 20 (cm)
243,9	140,6	613,4	2,9	1,37	1,56	1,6

Textura: Método da pipeta; Densidade de partícula (Dp): Método do balão volumétrico; Densidade do solo (Ds): método do anel volumétrico.

A densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes na área antes da instalação do experimento, foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Gerdemann e Nicholson (1963). O valor médio da densidade de esporos encontrada foi de 178 esporos em 50 cm⁻³ de solo.

A extração e contagem de esporos descrita por Gerdemann e Nicholson (1963), foi realizada da seguinte forma: Colocou-se 50 cm⁻³ de solo em um becker; transferiu-se para um becker grande e suspendeu-se com no mínimo 500 mL de água de

torneira; agitou-se vigorosamente com um bastão de vidro para suspender os esporos e esperou-se por 30 segundos; passou-se a suspensão através de duas peneiras empilhadas, com aberturas de 710mm e 0,053mm; repetiu-se os dois procedimentos anteriores por três vezes, ou até a água do Becker ficar limpa. Em seguida colocou-se o material retido na peneira de 710mm em uma placa de petri grande e observou-se na lupa a presença de esporos grandes (esporos de Gigaspora e Scutellospora) e esporocarpos. Após isso, transferiu-se o material retido na peneira de 0,053 mm para um tubo de centrífuga com água; centrifugou-se a 3000 rpm por três minutos; retirou-se o sobrenadante cuidadosamente, deixando-se apenas o solo no tubo de centrífuga. Adicionou-se sacarose (50%) no tubo de centrífuga contendo o solo e centrifugou-se a 2000 rpm por um minuto; despejou-se o sobrenadante novamente na peneira de 0,053 mm e lavou-se com água de torneira para remover o excesso de sacarose; transferiu-se os esporos da peneira de 0,053 mm para uma placa canelada e na lupa fez-se a contagem.

Os valores de precipitação pluviométrica e temperatura média estão presentes a seguir (Figura 1).

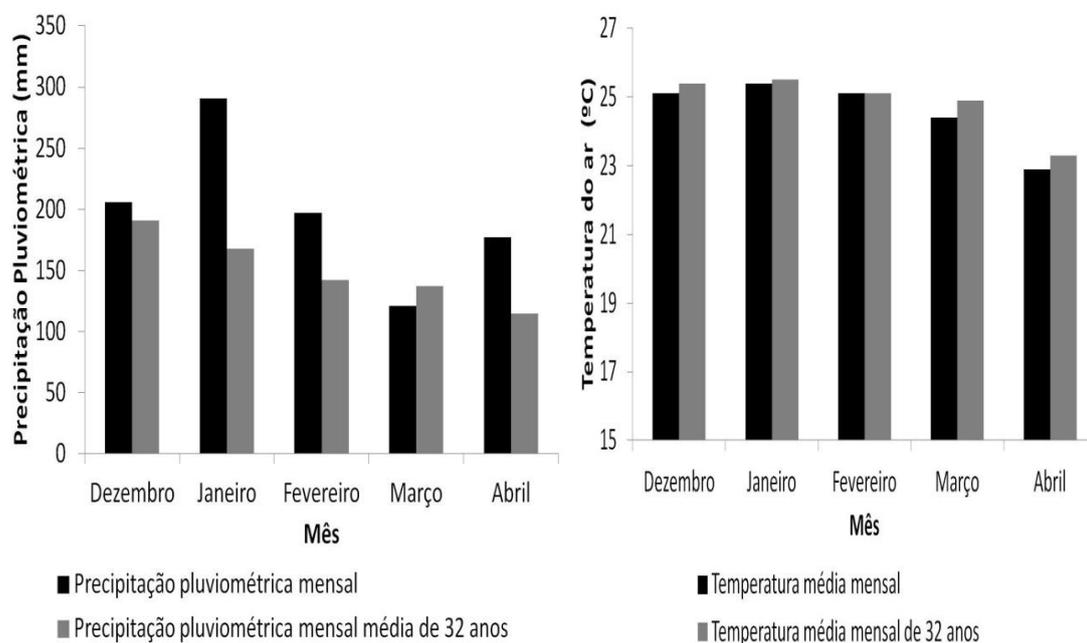


FIGURA 1. Precipitação pluviométrica e temperatura média durante a condução do experimento, de acordo com a estação meteorológica da Embrapa Agropecuária Oeste.

A soja foi semeada manualmente, e em plantio direto, utilizando-se a cultivar CD 235 RR, no dia 21/12/2011, inoculada com *Bradyrhizobium Japonicum* SEMIA 5080 e SEMIA 5079, como fonte o produto comercial NITRAGIN CELL TECH HG. A adubação foi realizada manualmente, aplicando-se 70 kg ha⁻¹ de K₂O (tendo como fonte o cloreto de potássio). 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 ha⁻¹ de P₂O₅), tendo como fonte o superfosfato triplo, e nas sub-parcelas quatro doses de formononetina (0, 25, 50, 100 g ha⁻¹), tendo como fonte o produto comercial PHC 506, sendo que esse produto foi aplicado nas sementes de soja. Cada unidade experimental tinha seis linhas de 7 m de comprimento, com espaçamento entre-linhas de 0,45 m, sendo considerada como área útil apenas as quatro linhas centrais, excluindo-se 1 m de cada extremidade, onde foram coletadas as amostras para as análises.

O PHC-506 é produzido pela Plant Health Care (PHC), INC-Pittsburg, EUA. É um pó esbranquiçado, 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. Primeiramente, fez-se o tratamento com inoculante a base de bactérias fixadoras de nitrogênio e, em seguida, fez-se o tratamento com a formononetina. As sementes foram tratadas manualmente, colocando-as em saco plástico aplicando-se o produto e agitando-se vigorosamente para distribuição homogênea.

No estágio fenológico R2 foram realizadas amostragens para avaliação do estado nutricional das plantas de soja baseada em análise foliar. Coletaram-se, ao acaso, o terceiro e o quarto trifólios, com hastes, de 10 plantas por unidade experimental. As amostras foram lavadas e colocadas em sacos de papel e secadas em estufa com circulação forçada de ar a 70°C, até peso constante. Após terem sido moídas em moinho tipo Willey as amostras sofreram digestão nitroperclórica e o extrato da digestão usado para a determinação de P e S (colorimetria), K (fotometria de chama), Ca e Mg (espectrofotometria de absorção atômica), segundo metodologia descrita por Malavolta et al. (1997), enquanto os teores de N foram determinados pelo método de Kjeldahl, após digestão sulfúrica.

No estágio R2, realizou-se a determinação do número e massa seca de nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio por planta de soja, coletando-se ao acaso, a raiz e solo rizosférico de cinco plantas por unidade experimental. Os nódulos foram contados, lavados e secos em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C.

Para avaliação da taxa de colonização das raízes por fungos micorrízicos arbusculares, coletaram-se ao acaso, raízes de cinco plantas por unidade experimental no estágio R4. 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 finas foi clarificado usando-se solução de KOH 5% p/v por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em água corrente e agitadas 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 intercessão, descrito por Giovanetti e Mosse (1980) e observação em microscópio estereoscópico (ampliação de 10 a 40 vezes).

Ao final do ciclo da soja (estádio R8) foram avaliados os efeitos dos tratamentos sobre o desenvolvimento e produtividade da cultura, realizando-se as seguintes avaliações: altura das plantas, por meio da medição de 10 plantas por unidade experimental, medindo-se as plantas do nível de solo até a inserção da última folha; número de vagens por plantas, contando-se as vagens em 10 plantas por unidade experimental; massa de 100 grãos e produção de grãos por unidade experimental, colhendo todas as plantas da área útil da unidade experimental. Posteriormente, determinou-se a umidade e os devidos descontos de umidade (utilizou-se 13% como umidade padrão).

Após a colheita, foram coletadas, ao acaso, cinco amostras simples de solo, por unidade experimental, que foram homogeneizadas e retiradas uma amostra composta por 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 e Nicholson (1963).

Os dados coletados foram submetidos à análise de regressão, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A significância da equação 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, vagens e nódulos

foram transformados pela equação $(x + 0,5)^{0,5}$, enquanto os dados referentes à porcentagem de colonização micorrízica foram transformados pelo arco seno $(x/100)^{0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o número de nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes de soja houve significância para as doses de P_2O_5 ($p < 0,05$), pelo teste F, e para doses de formononetina e interação entre doses de P_2O_5 e doses de formononetina ($p < 0,01$), pelo teste F. Para massa seca de nódulos ocorreu significância para doses de formononetina e interação entre doses de P_2O_5 e doses de formononetina ($p < 0,01$), pelo teste F (Quadro 3).

QUADRO 3. Resumo da análise de variância dos valores de número e massa seca de nódulos em raízes de soja

Fonte de variação	Número de nódulos/planta	Massa seca de nódulos/planta
Dose de P_2O_5 (P)	4,39*	1,051 ^{ns}
Dose de formononetina (F)	6,62**	12,19**
P x F	18,71**	7,50**
CV 1 (%)	8,26	18,30
CV 2 (%)	6,43	15,17

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

Para o número de nódulos formados por bactérias fixadoras de nitrogênio na soja observou-se redução quando se aplicou formononetina, na ausência de P_2O_5 . O modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear ($p < 0,01$), pelo teste F. O coeficiente da equação foi significativo ($p < 0,01$), pelo teste t. Para as doses 17,5; 35 e 70 $kg\ ha^{-1}$ de P_2O_5 ocorreu aumento do número de nódulos com aplicação de formononetina. Nas doses 17,5 e 35 $kg\ ha^{-1}$ o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático ($p < 0,01$), pelo teste F. Na dose 17,5 $kg\ ha^{-1}$ os coeficientes foram significativos ($p < 0,01$ e $p < 0,05$) e na dose 35 $kg\ ha^{-1}$ ($p < 0,01$), pelo teste t. Na dose 70 $kg\ ha^{-1}$ o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear ($p < 0,01$), pelo teste F, e os coeficientes foram significativos ($p < 0,01$), pelo teste (Figura 2). Na dose 17,5 $kg\ ha^{-1}$, observou-se aumento no número de nódulos até a dose 37,83 $g\ ha^{-1}$ de formononetina, já para a dose 35 $kg\ ha^{-1}$ observou-se aumento até a dose 79,50 $g\ ha^{-1}$ de formononetina.

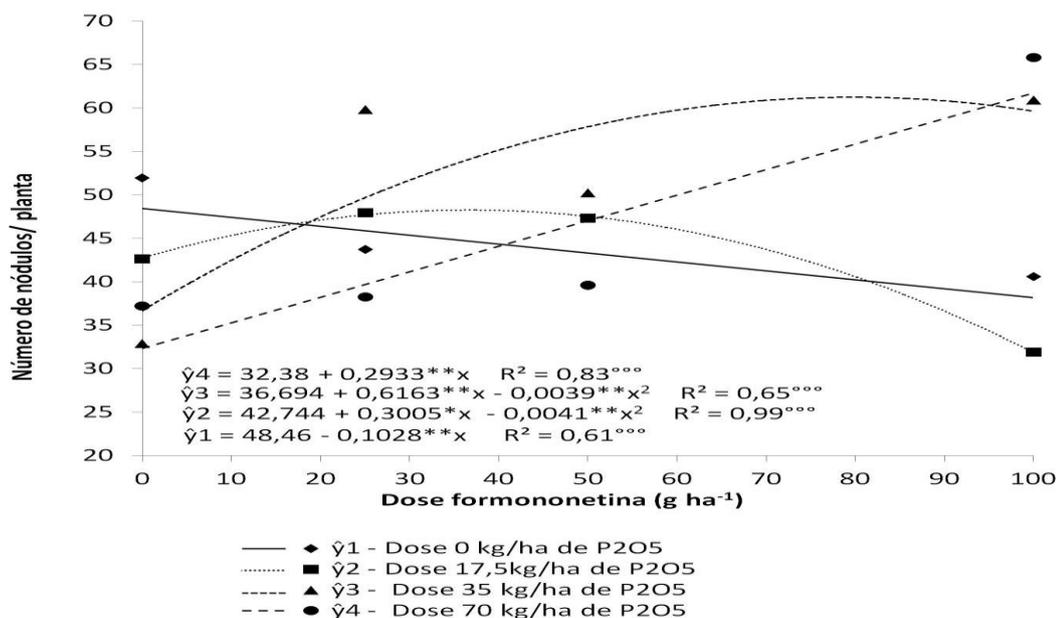


FIGURA 2. Número de nódulos formados por bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes de soja, em função da dose de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. ***: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F)

Com esses resultados, observa-se que apenas a aplicação da formononetina como estimulante de micorrização, sem adição de fósforo, não foi suficiente para elevar o número de nódulos. Provavelmente, o suprimento de fósforo não foi adequado para manter a nodulação, pois o nódulo é um forte dreno de fósforo, sendo o teor no mesmo, três vezes maior que nos outros tecidos da planta (VADEZ et al., 1997). Outra possibilidade é a competição entre a micorriza e as bactérias fixadoras de nitrogênio por fotoassimilados. Como a formononetina aumentou a taxa de colonização, pode ter aumentado a competição, prejudicando a nodulação, na ausência de adubação fosfatada.

Observa-se que o efeito da formononetina no número de nódulos aumentou com a dose de fósforo. Segundo Carrenho et al. (2010) a soja requerer alta quantidade de fósforo para satisfazer a demanda para o crescimento e fixação biológica de nitrogênio. Além disso, segundo Carvalho e Moreira (2010) alguns autores citam que a formononetina pode atuar diretamente na fase inicial da nodulação, como uma substância estimuladora. Os resultados obtidos estão de acordo com Oliveira (1998) que verificaram aumento no número de nódulos em soja micorrizada.

Observou-se redução da massa seca de nódulos formados por bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes de soja com aumento na dose de formononetina, na ausência de P₂O₅. O modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear (p<0,01), pelo

teste F. O coeficiente da equação foi significativo ($p < 0,01$), pelo teste t. Para as doses 17,5 e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅ o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente), pelo teste F. Para a dose 17,5 kg ha⁻¹ o coeficiente da equação foi significativo ($p < 0,05$), pelo teste t. Para a dose 35 kg ha⁻¹ o coeficiente foi significativo ($p < 0,01$), pelo teste t. Para a dose 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não ocorreu efeito na massa seca de nódulos (Figura 3). Para a dose 17,5 kg ha⁻¹, observou-se aumento na massa seca de nódulos até a dose 33,33 g ha⁻¹ de formononetina, para a dose 35 kg ha⁻¹, observou-se aumento até a dose 50 g ha⁻¹ de formononetina.

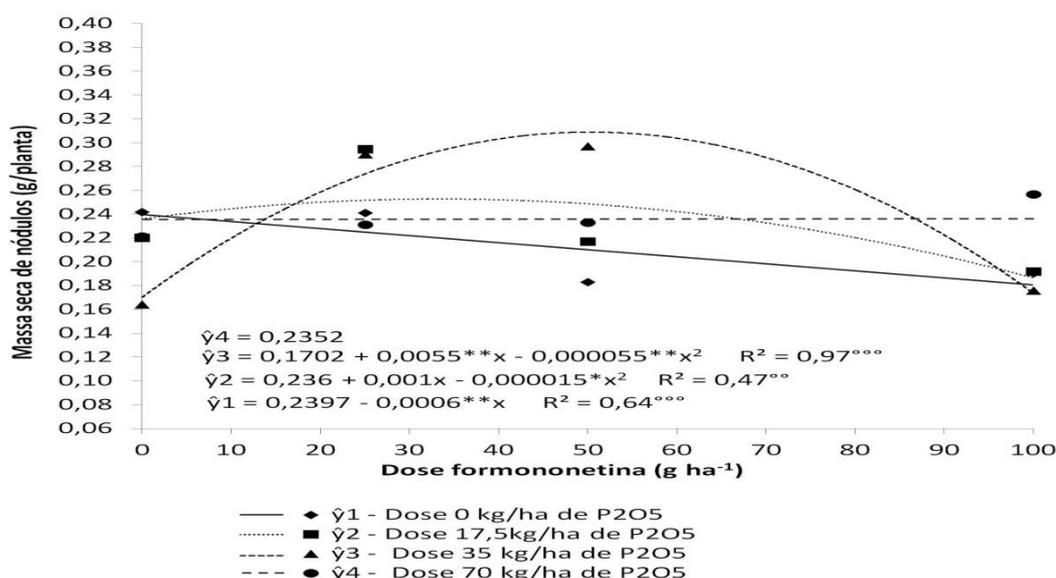


FIGURA 3. Massa seca de nódulos formados por bactérias fixadoras de nitrogênio em raízes de soja, em função da dose de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. *: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. ***: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. **: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F)

Observa-se, portanto que a formononetina na ausência de fósforo no solo reduz a massa de nódulos, provavelmente devido ao suprimento de fósforo não ser adequado para manter o adequado desenvolvimento dos nódulos, pois segundo Vadez et al. (1997) o nódulo é um forte drenador de fósforo. Outra possibilidade é a competição entre a micorriza e as bactérias fixadoras, por fotoassimilados. Como a formononetina aumentou a taxa de colonização, pode ter aumentado a competição, prejudicando seu desenvolvimento, na ausência de adubação fosfatada.

O efeito benéfico na massa seca de nódulos pela formononetina ocorreu nas doses 17,5 kg ha⁻¹ e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅, com destaque para a última dose, indicando ser

necessário aplicação de fósforo, para um adequado crescimento dos nódulos, mesmo na presença do estimulante de micorrização. Na dose 70 kg ha⁻¹, diferentemente do número de nódulos, não ocorreu efeito da formononetina, indicando que apesar do aumento do número de nódulos, não ocorreu ganho de massa na combinação de elevada dose de fósforo e formononetina.

A massa de nódulos é a principal característica correlacionada com a fixação biológica de nitrogênio (CARVALHO e MOREIRA, 2010). Silva et al. (2006) verificaram aumento na massa seca de nódulos em plantas micorrizadas. O suprimento adequado de fósforo aumenta o vigor dos nódulos e sua eficiência, em contrapartida a planta bem nutrida em nitrogênio tem melhor desenvolvimento (CARVALHO e MOREIRA, 2010). Como a formononetina aumentou a taxa de colonização, que tem alta correlação com a contribuição da micorriza para a planta (SENA et al., 2004), o melhor suprimento de fósforo pode ter contribuído para o aumento no desenvolvimento dos nódulos.

O teor de nitrogênio na folha de soja foi afetado pelas doses de P₂O₅, doses de formononetina e pela interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,01), pelo teste F. O teor de fósforo foi afetado significativamente pela aplicação de P₂O₅ e formononetina (p<0,01), pelo teste F. Ocorreu interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,05), pelo teste F. Para o potássio, apenas aplicação de P₂O₅ afetou significativamente o teor na folha (p<0,01), pelo teste F (Quadro 4).

QUADRO 4. Resumo da análise de variância dos valores de teor de nitrogênio, fósforo e potássio na folha de soja

Fonte de variação	N	P	K
Dose de P ₂ O ₅ (P)	51,399**	26,728**	11,402**
Dose de formononetina (F)	6,821**	6,023**	0,567 ^{ns}
P x F	3,677**	2,795*	1,675 ^{ns}
CV 1 (%)	3,03	3,76	5,17
CV 2 (%)	2,04	2,45	4,41

** : 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.

Nas doses 0 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ a aplicação de formononetina não afetou significativamente o teor de nitrogênio na folha. Nas doses 17,5 e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅ ocorreu redução no teor, ambos com ajuste quadrático (p<0,01), pelo teste F. Os coeficientes foram significativos (p<0,01), pelo teste t (Figura 4).

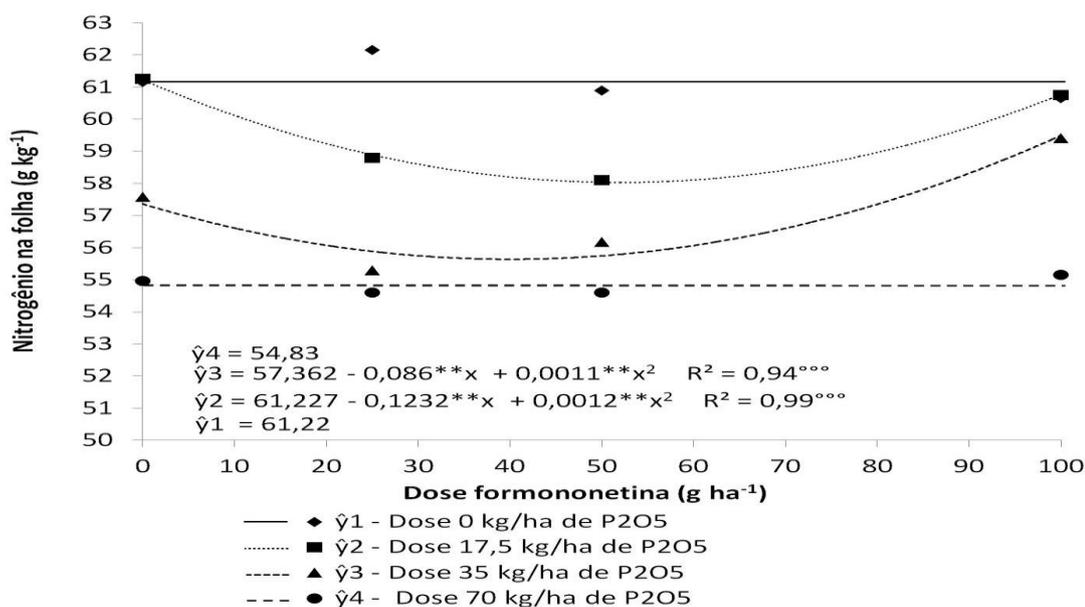


FIGURA 4. Teor de nitrogênio na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F)

Provavelmente, o efeito da diluição do nitrogênio na folha foi o responsável por essa redução, pois ocorreu aumento na altura das plantas quando se aplicou formononetina, a maior altura de plantas pode indicar que elas acumularam mais biomassa, fato esse responsável pelo efeito da diluição. Cardoso et al. (2003) observaram menor teor de nitrogênio nas plantas de soja, micorrizadas com *Glomus macrocarpum* e maior nas plantas com *Gigaspora margarita*, respectivamente, plantas com a maior e a menor produção de biomassa, segundo os autores devido ao efeito da diluição. Moreira e Siqueira (2006), também citam que normalmente ocorre redução da concentração de nitrogênio em plantas micorrizadas.

De acordo com Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) teores de nitrogênio acima de 46,9 g kg⁻¹ são considerados altos (Valores para o estado do MS e considerando folhas com pecíolo no estágio R2). Com isso, os teores de nitrogênio observados em todas as doses de formononetina são considerados altos. Nesse sentido, apesar da redução no teor, a formononetina manteve a absorção de nitrogênio dentro de uma faixa que não afetou o adequado desenvolvimento da planta.

De maneira geral, ocorreu redução no teor de fósforo na folha quando se aplicou formononetina. Na ausência de P₂O₅ o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear (p<0,1), pelo teste F. O coeficiente da equação foi significativo (p<0,1), pelo

teste t. Na dose 17,5 kg ha⁻¹ de P₂O₅ o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático (p<0,01), pelo teste F. Os coeficientes da equação foram significativos (p<0,01), pelo teste t. Para as doses 35 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve resposta (Figura 5).

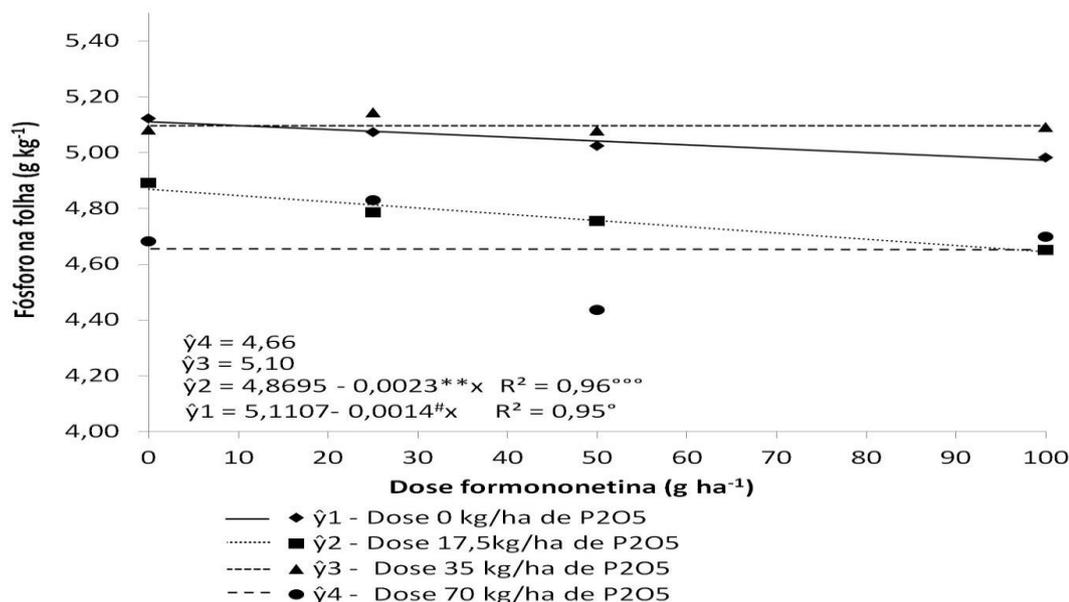


FIGURA 5. Teor de fósforo na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. # Significativo a 10% de probabilidade pelo teste t. °: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. °: Significativo a 10% de probabilidade pelo teste F.)

Provavelmente, o efeito da diluição do fósforo na folha foi o responsável por essa redução, pois ocorreu aumento na altura das plantas quando se aplicou formononetina, a maior altura de plantas pode indicar que elas acumularam mais biomassa, fato esse responsável pelo efeito da diluição. Na maioria dos trabalhos encontram-se relatos de aumento no teor de fósforo na folha quando as plantas têm maior micorrização, mas também existem relatos de redução. Pereira et al. (1996) avaliaram plantas arbóreas leguminosas e, verificaram que as inoculadas com *Glomus etunicatum* apresentaram menor teor de fósforo, apesar do maior crescimento. Cardoso et al. (2003) não encontraram efeito no teor de fósforo de soja micorrizada.

De acordo com Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) teores de fósforo acima de 3,4 g kg⁻¹ são considerados altos (Valores para o estado do MS e considerando folhas com pecíolo no estágio R2). Com isso, os teores de fósforo observados em todas as doses de formononetina são considerados altos. Nesse sentido,

apesar da redução no teor, a formononetina manteve a absorção de fósforo dentro de uma faixa que não afetou o adequado desenvolvimento da planta.

Com a aplicação de fósforo no solo ocorreu redução no teor de potássio na folha. O modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático ($p < 0,01$), pelo teste F. O coeficiente da equação foi significativo ($p < 0,01$), pelo teste t (Figura 6). Provavelmente, o efeito da diluição do potássio na folha foi o responsável por essa redução, pois ocorreu aumento na altura das plantas quando se aplicou fósforo, a maior altura de plantas pode indicar que elas acumularam mais biomassa, fato esse responsável pelo efeito da diluição, a elevação no teor a partir da dose $42,50 \text{ g ha}^{-1}$ de formononetina pode ser devido à redução no crescimento que o fósforo proporcionou nas plantas a partir da dose $52,86 \text{ g ha}^{-1}$. Maia et al. (2005) verificaram efeito da diluição do potássio em meloeiros irrigados com água de diferentes salinidades.

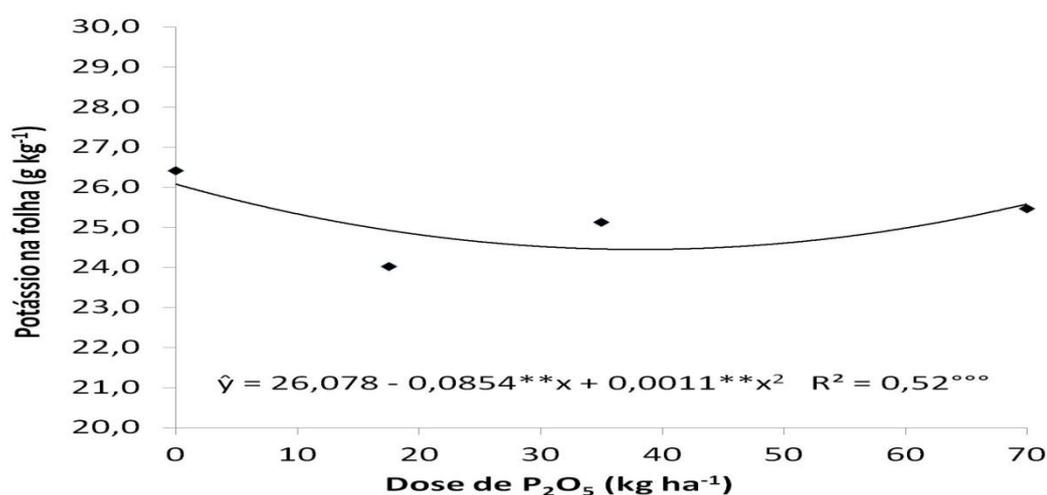


FIGURA 6. Teor de potássio na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de P₂O₅ no solo. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F).

De acordo com Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) teores de potássio entre $17,3$ e $25,4 \text{ g kg}^{-1}$ são considerados bons (Valores para o estado do MS e considerando folhas com pecíolo no estágio R2). Com isso, os teores de potássio observados em todas as doses de P₂O₅ são considerados de bom a alto.

O efeito da diluição dos nutrientes na folha ocorre quando a taxa de crescimento relativo da matéria seca da planta é maior que a taxa de absorção do nutriente. Outro fenômeno que pode diminuir o teor de nutrientes na folha é a retranslocação do nutriente das folhas para os drenos, esse fato ocorre principalmente

para os nutrientes moveis na planta e, quando a planta está em fase de enchimento de grãos (MAIA et al., 2005).

O teor de cálcio e enxofre na folha da soja foram influenciados significativamente pelas doses de P_2O_5 , doses de formononetina e para interação entre doses de P_2O_5 e doses de formononetina ($p < 0,01$), pelo teste F. Para o magnésio, ocorreu significância para doses de P_2O_5 e doses de formononetina ($p < 0,01$), pelo teste F, e para a interação entre dose de P_2O_5 e doses de formononetina ($p < 0,05$), pelo teste F (Quadro 5).

QUADRO 5. Resumo da análise de variância dos valores de teor de cálcio, magnésio e enxofre na folha de soja

Fonte de variação	Ca	Mg	S
Dose de P_2O_5 (P)	295,360**	10,274**	67,438**
Dose de formononetina (F)	7,569**	4,236**	7,132**
P x F	6,650**	2,698*	4,523**
CV 1 (%)	1,26	3,59	6,05
CV 2 (%)	1,78	2,81	9,96

** : Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. * : Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Para o desdobramento doses de formononetina dentro de cada dose de P_2O_5 não houve efeito da aplicação de formononetina (Figura 7). Para o cálcio normalmente ocorre diminuição no teor em plantas micorrizadas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), mas as respostas são variadas. Santos et al. (2002) não encontram efeito da micorrização no acúmulo cálcio em *Brachiaria brizantha*, já Carneiro et al. (1996) observaram aumento no teor de cálcio em espécies arbóreas micorrizadas e Andrade et al. (2003) observaram aumento nos teores de cálcio em soja micorrizada.

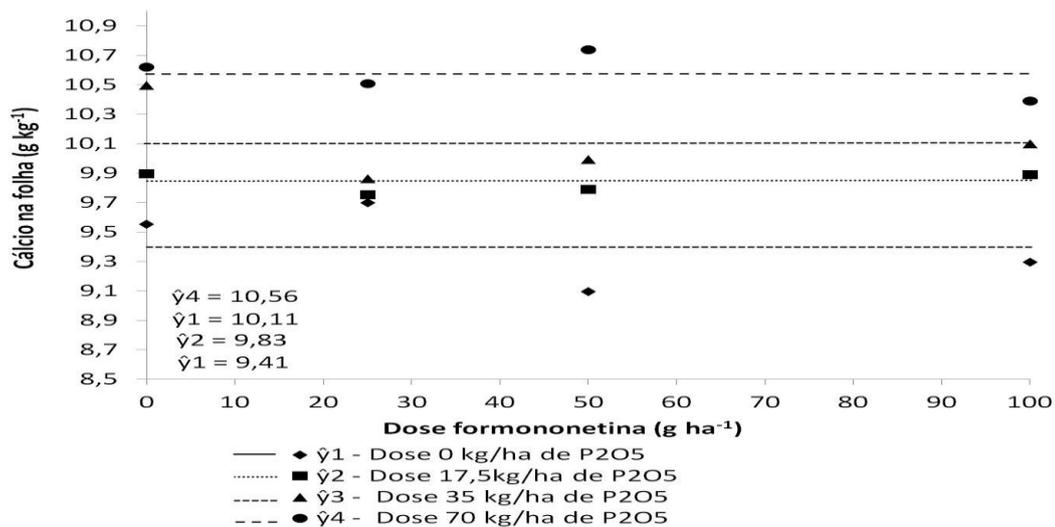


FIGURA 7. Teor de cálcio na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P₂O₅.

De acordo com Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) teores de cálcio entre 6,8 e 11,8 g kg⁻¹ são considerados suficientes (Valores para o estado do MS e considerando folhas com pecíolo no estágio R2). Com isso, os teores de cálcio observados em todas as doses de formononetina são considerados suficientes.

Na ausência de P₂O₅ ocorreu redução no teor de magnésio com aplicação de formononetina, o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear ($p < 0,05$), pelo teste F, e os coeficientes da equação foram significativos ($p < 0,05$), pelo teste t (Figura 8). Esses resultados sugerem a hipótese de que a aplicação do fósforo atenuou a redução no teor de magnésio na folha causado pela micorriza, pois segundo Moreira e Siqueira (2006) normalmente a micorriza reduz o teor de magnésio na planta.

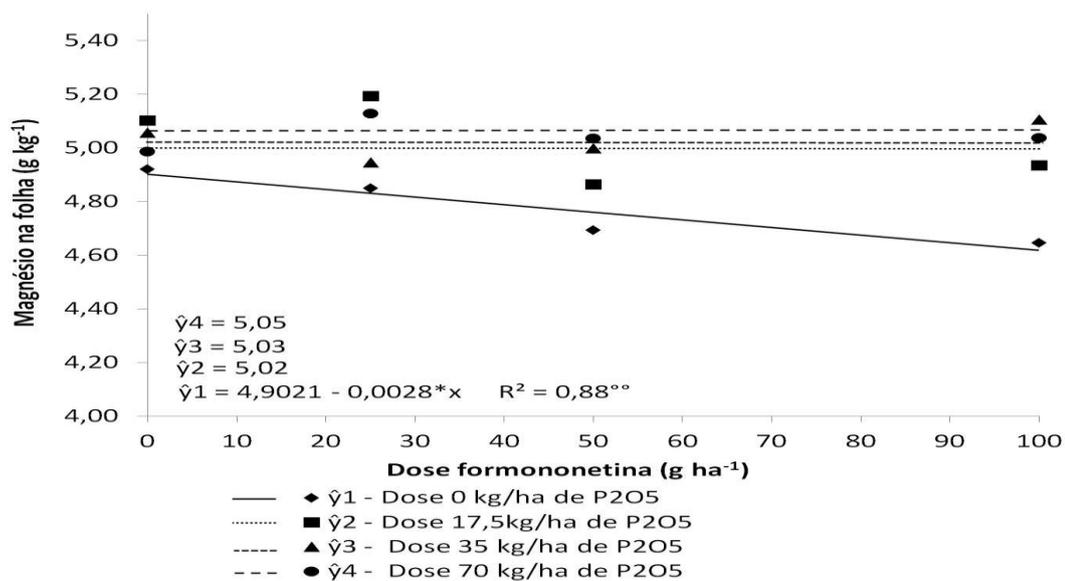


FIGURA 8. Teor de magnésio na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P₂O₅. (*: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. °°: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F)

De acordo com Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) teores de magnésio acima de 4,7 g kg⁻¹ são considerados altos (Valores para o estado do MS e considerando folhas com pecíolo no estágio R2). Com isso, os teores de magnésio observados em todas as doses de formononetina são considerados altos. Nesse sentido, apesar da redução no teor, a formononetina manteve a absorção de magnésio dentro de uma faixa que não afetou o adequado desenvolvimento da planta.

Para a dose 0; 17,5 e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve resposta para a aplicação de formononetina. Para a dose 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ houve aumento no teor de enxofre com aplicação de formononetina. O modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear (p<0,01), pelo teste F. O coeficiente da equação foi significativo (p<0,01), pelo teste t (Figura 9). Para o enxofre, normalmente ocorre aumento no teor em plantas micorrizadas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Carneiro et al. (1996) também observaram aumento nos teores de enxofre em espécies arbóreas micorrizadas. Parte da explicação do aumento no teor de enxofre com aplicação da formononetina deve-se ao provável sinergismo com aumento de absorção de fósforo, segundo Malavolta et al. (2006) o teor de fósforo nas proteínas provavelmente é o responsável pelo sinergismo entre esses nutrientes nas plantas.

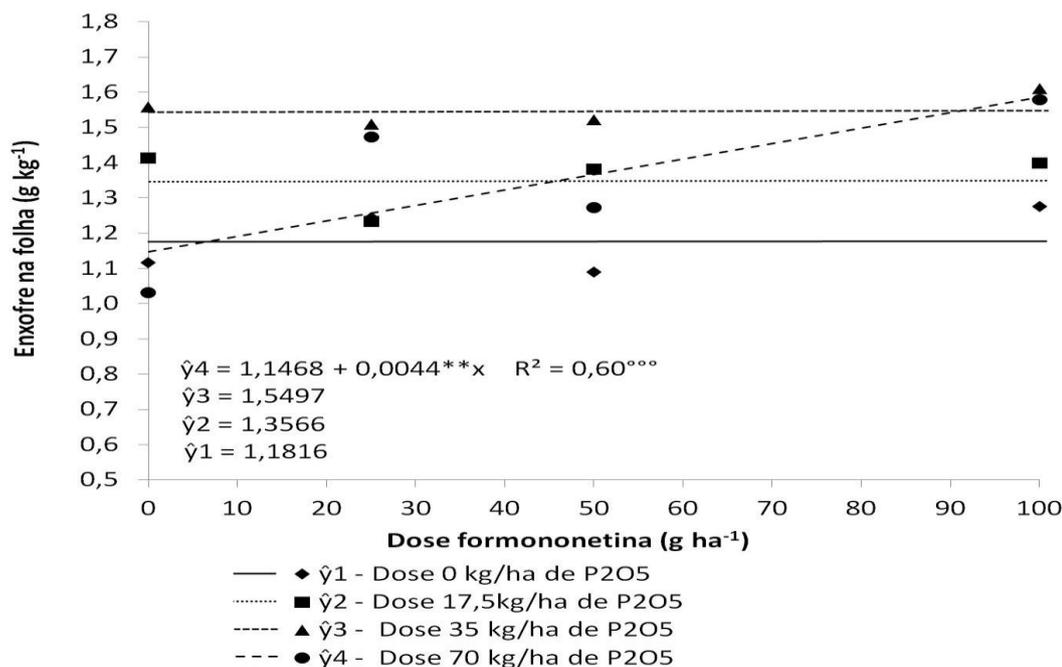


FIGURA 9. Teor de enxofre na folha de soja no estágio R2, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F).

De acordo com Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2010) teores de enxofre abaixo de 2,1 g kg⁻¹ são considerados baixos (Valores para o estado do MS e considerando folhas com pecíolo no estágio R2). Com isso, os teores de enxofre observados em todas as doses de formononetina são considerados baixo.

A taxa de colonização das raízes de soja por fungos micorrízicos arbusculares foi influenciada pelas doses de P₂O₅, pelas doses de formononetina e pela interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,01), pelo teste F (Quadro 6).

QUADRO 6. Resumo da análise de variância da taxa de colonização para a cultura da soja

Fonte de variação	Taxa de colonização
Dose de P ₂ O ₅ (P)	30,294 **
Dose de formononetina (F)	22,239 **
P x F	7,571 **
CV 1 (%)	4,22
CV 2 (%)	4,20

** : Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F.

Avaliando-se os valores da taxa de colonização em função da aplicação de formononetina, observa-se que na ausência de P_2O_5 o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear ($p < 0,01$), pelo teste F, e o coeficiente da equação foi significativo ($p < 0,01$), pelo teste t. Para a dose $17,5 \text{ kg ha}^{-1}$ de P_2O_5 o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático ($p < 0,01$), pelo teste F, o coeficiente da equação foi significativo ($p < 0,01$), pelo teste t. Para as doses 35 kg ha^{-1} e 70 kg ha^{-1} de P_2O_5 não houve efeito (Figura 10). Na dose $17,5 \text{ kg ha}^{-1}$, observou-se aumento na taxa de colonização até a dose $58,18 \text{ g ha}^{-1}$ de formononetina.

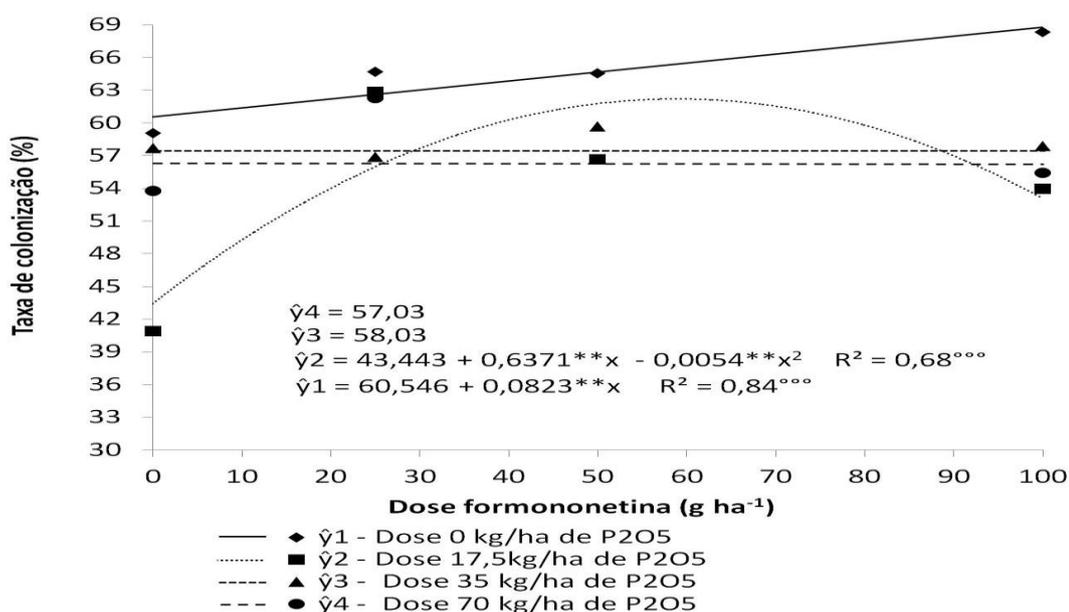


FIGURA 10. Taxa de colonização de raízes de soja por fungos micorrízicos arbusculares em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P_2O_5 . (**: Significativo a 1% pelo teste t. ooo : Significativo a 1% pelo teste F)

A aplicação de formononetina promoveu aumento na taxa de colonização das raízes da soja nas doses 0 e $17,5 \text{ kg ha}^{-1}$. Com isso, observou-se o efeito negativo do fósforo na taxa de colonização, pois nas doses mais elevadas de P_2O_5 não houve efeito da formononetina. De maneira geral, quanto maior a colonização maior a contribuição da micorriza para planta. Com isso, pode-se dizer que a formononetina tem potencial para aumentar a contribuição da micorriza para as plantas.

Teor baixo de fósforo no solo pode aumentar a colonização devido aos exudados de plantas cultivadas nesses solos estimularem maior crescimento assimbiótico de fungo micorrízico (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006) e maior

germinação de glomoesporos. Acredita-se que essas substâncias estimulantes possam atuar como sinalizadoras, fazendo com que a hifa do fungo se direcione a raiz (MAIA et al., 2010). Assim sendo, maior germinação de glomoesporo e maior estímulo do crescimento do micélio do fungo micorrízico podem aumentar a chance de colonização da raiz pelo fungo. Nogueira e Cardoso (2000) trabalharam com vasos e substrato composto pela mistura de um Latossolo Vermelho Distrófico e um Neossolo Quartzarênico e, verificaram redução na colonização radicular da soja com aumento da dose de fósforo.

O efeito dos flavonóides, dentre eles a formononetina, na taxa de colonização ainda não foi totalmente esclarecido, mas acredita-se que o efeito estimulante pode ser devido à formação de maior número de apressórios ou de pontos de entradas e, existem algumas evidências de que este composto pode suprimir a atividade da enzima peroxidase que atua de modo restritivo à entrada do fungo na raiz (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Em soja, Silva Júnior e Siqueira (1997) verificaram que com a aplicação de formononetina sintética ocorreu aumento de 32% na colonização radicular. Lambais et al. (2003) verificaram aumento na colonização em feijão tratado com formononetina.

Para a altura de plantas ocorreu significância para as doses de P_2O_5 ($p < 0,01$) e doses de formononetina ($p < 0,05$), pelo teste F. Para interação entre doses de P_2O_5 e doses de formononetina não ocorreu significância (Quadro 7).

QUADRO 7. Resumo da análise de variância dos valores de altura de plantas de soja

Fonte de variação	Altura de plantas
Dose de P_2O_5 (P)	122,88**
Dose de formononetina (F)	15,03*
P x F	6,52 ^{ns}
CV 1 (%)	4,89
CV 2 (%)	3,69

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

A altura das plantas aumentou com aplicação de fósforo no solo. O modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático ($p < 0,01$), pelo teste F. Os coeficientes da equação foram significativos ($p < 0,01$), pelo teste t (Figura 11). A dose de P_2O_5 que proporcionou a maior altura de plantas foi $53,14 \text{ kg ha}^{-1}$. O fósforo tem funções

importantes na planta, sendo constituinte de compostos de energia (ATP), fosfolipídios e outros ésteres (MALAVOLTA et al., 2006) e, esses compostos são essenciais ao crescimento adequado da planta. Segundo Vilela e Anghinoni (1984) o baixo teor de fósforo no solo provoca diminuição no comprimento e engrossamento das raízes de soja, prejudicando a absorção de nutriente. O fósforo também é essencial ao adequado desenvolvimento dos nódulos e a fixação biológica de nitrogênio (CARRENHO et al., 2010), com isso, baixo suprimento de fósforo pode prejudicar o fornecimento de nitrogênio, nutriente importante para o crescimento vegetal.

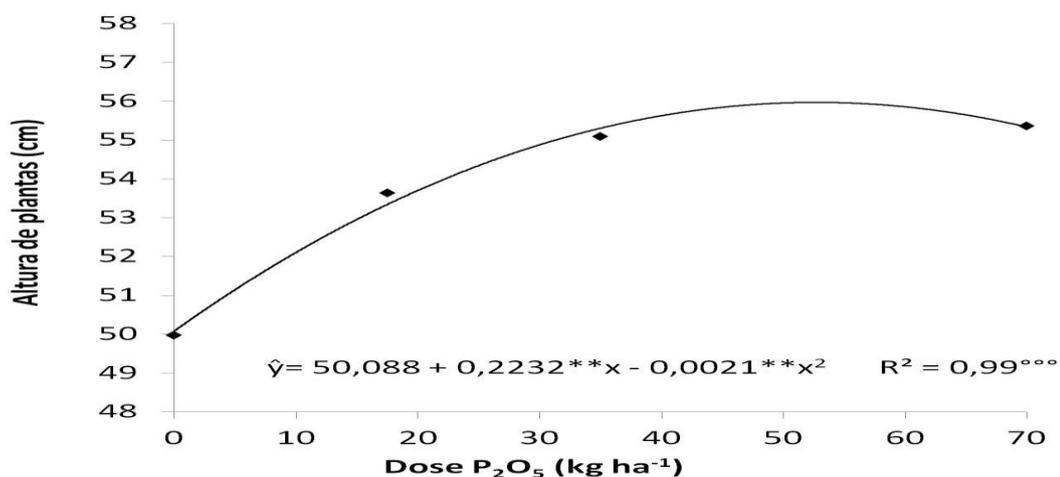


FIGURA 11. Altura de plantas de soja, em função da aplicação de P_2O_5 no solo. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F)

A altura das plantas aumentou com a aplicação de formononetina, até a dose $52,86\ g\ ha^{-1}$. O modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático ($p < 0,01$), pelo teste F. Os coeficientes da equação foram significativos ($p < 0,01$), pelo teste t (Figura 12).

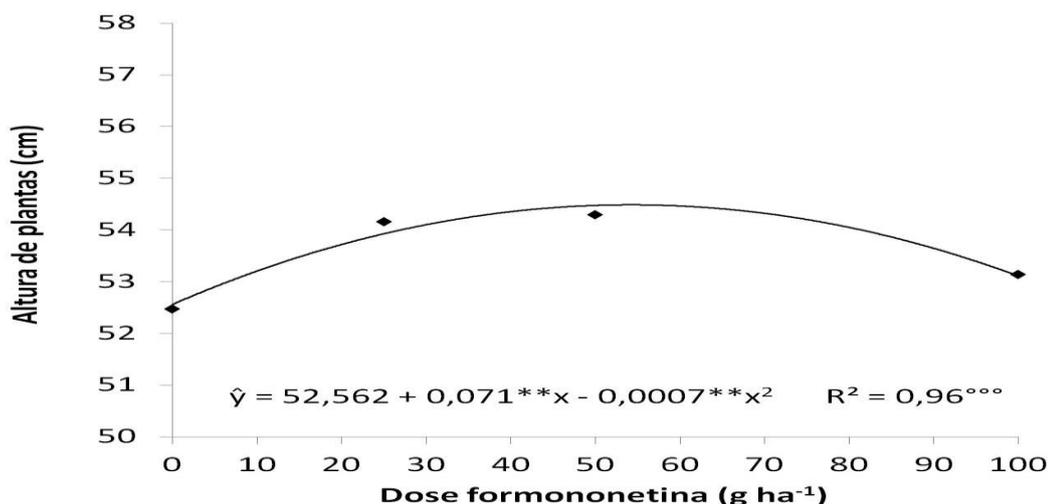


FIGURA 12. Altura de plantas de soja, em função da aplicação de formononetina. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F)

Esse resultado está de acordo com Moreira e Siqueira (2006) e Carrenho et al. (2010), pois segundo eles a formononetina acelera a micorrização, favorecendo o crescimento da planta hospedeira. No presente trabalho foi observado aumento na taxa de colonização da raiz de soja por fungos micorrízicos arbusculares, que segundo Sena et al. (2004) tem alta correlação com a contribuição da micorriza para a planta. Cardoso et al. (2003) e Silva et al. (2006), também, observaram que a inoculação com fungos micorrízicos arbusculares promoveu incremento na altura das plantas de soja.

As micorrizas proporcionam aumento no desenvolvimento de plantas, devido a melhorias na agregação do solo, maior absorção de nutrientes; maior tolerância a doenças, estresses ambientais, toxicidade por nutrientes, metais pesados no solo; estímulo á fixação biológica de nitrogênio nas plantas; produção de substâncias estimuladoras do crescimento e alterações bioquímicas e fisiológicas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

O número de vagens por planta de soja não foi afetado pelos tratamentos. A massa de 100 grãos foi afetada pelas doses de P₂O₅, pelas doses de formononetina e pela interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,01), pelo teste F. A produtividade foi afetada pelas doses de formononetina (p<0,05), pelo teste F, e pela interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,01), pelo teste F (Quadro 8).

QUADRO 8. Resumo da análise de variância do número de vagens, massa de 100 grãos e produtividade da soja

Fonte de variação	Número de vagens/planta	Massa de 100 grãos	Produtividade
Dose de P ₂ O ₅ (P)	0,530 ^{ns}	27,05 **	2,543 ^{ns}
Dose de formononetina (F)	0,440 ^{ns}	6,439 **	3,670 *
P x F	0,568 ^{ns}	5,109**	3,667**
CV 1 (%)	6,19	1,88	11,73
CV 2 (%)	6,08	1,82	9,05

** : 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.

A massa de 100 grãos aumentou com aplicação de formononetina nas doses 0 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Na dose 70 kg ha⁻¹ o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o linear (p<0,05), pelo teste F. O coeficiente da equação foi significativo (p<0,05), pelo teste t. Na ausência de P₂O₅, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático (p<0,01), pelo teste F. Os coeficientes da equação foram significativos (p<0,05 e p<0,01 respectivamente), pelo teste t (Figura 13). Na ausência de P₂O₅ ocorreu aumento na massa de 100 grãos até a dose 56,5 g ha⁻¹ de formononetina. A formononetina estimulou a micorrização na soja, com isso os benefícios da micorrização podem ter melhorado absorção de nutrientes, que pode ter aumentado à massa de 100 grãos.

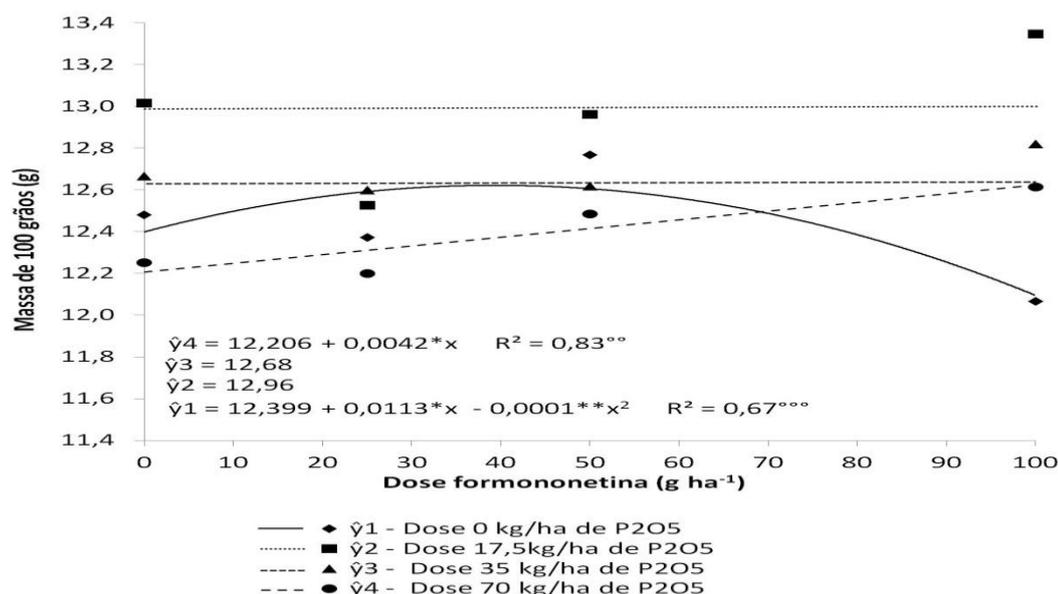


FIGURA 13. Massa de 100 grãos de soja, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (*: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. **: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. °°°: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F).

Nas doses 0; 17,5; e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅ ocorreu aumento na produtividade de grãos de soja com aplicação de formononetina. Nas doses 0 e 35 kg ha⁻¹ o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o linear (p<0,01), pelo teste F. O coeficiente de ambas as equações foram significativos (p<0,01), pelo teste t. Na dose 17,5 kg ha⁻¹ o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático (p<0,05), pelo teste F. Os coeficientes da equação foram significativos (p<0,01 e p<0,05 respectivamente), pelo teste t. Na dose 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve efeito da aplicação de formononetina (Figura 14). Na dose 17,5 kg ha⁻¹ ocorreu aumento na produtividade até a dose 57,5 g ha⁻¹ de formononetina.

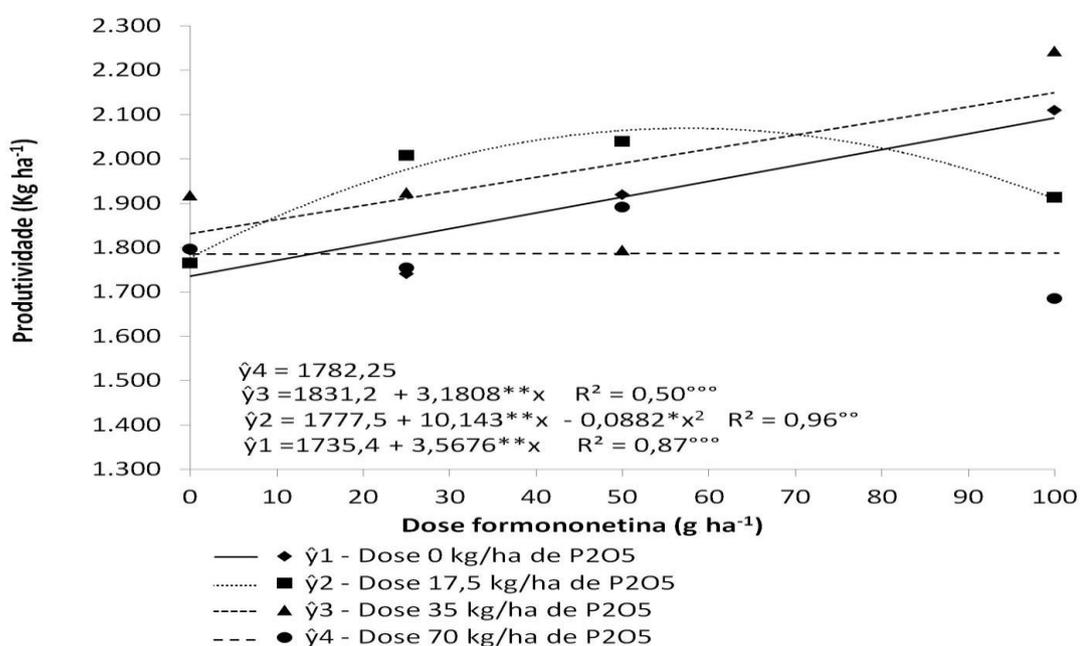


FIGURA 14. Estimativa de produtividade de soja, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. *: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F. °°: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F).

Esses resultados mostram que, a aplicação de altas doses de fósforo limitam o efeito do estimulante a micorrização na produtividade da soja, como verificado na dose 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅. O fósforo no solo regula a relação entre planta e fungo, (COSTA et al., 2001), de maneira geral a baixa quantidade deste nutriente no solo proporciona aumento na germinação dos glomoesporos e crescimento assimbiótico dos fungos micorrízicos arbusculares (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), aumentando a

probabilidade de colonização das raízes pelos fungos micorrízicos arbusculares. Além disso, segundo Maia et al. (2010) a produção de substâncias estimuladoras a micorrização por plantas bem nutridas em fósforo é menor que aquelas em solos pobres em fósforo.

No campo tem-se observado ganho de 200 kg ha^{-1} em plantas micorrizadas (MIRANDA e MIRANDA, 1997). Em estudo em campo com aplicação de um produto a base de formononetina, verificou-se aumento na produtividade 52% para soja (SIQUEIRA et al., 1992). Para outras culturas também já se verificou aumento na produtividade, como por exemplo, no feijão (LAMBASIS et al., 2003). Além de aumentar a produtividade, a aplicação desse estimulante no campo gera bons retornos financeiros, Romero (1999) avaliando a formononetina no campo concluiu que o custo/benéfico é viável.

No presente trabalho, o aumento na produção foi de $171,52 \text{ kg ha}^{-1}$, ou seja, 9,42% de aumento na produção de grãos, valores esses próximos aos citados por Miranda e Miranda (1997). A formononetina pode aumentar a produção, pois estimula a micorrização, fato comprovado pelo aumento na taxa de colonização, com isso os benefícios da micorrização são maiores. A micorrização provoca aumento na produção por melhorar o desenvolvimento das plantas, esse fato está ligado principalmente à melhoria na qualidade física do solo, maior absorção de nutriente, estímulo a fixação biológica de nitrogênio nas plantas, substâncias estimuladoras ao crescimento e alterações bioquímicas e fisiológicas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A combinação que proporcionou maior produtividade foi à dose 35 kg ha^{-1} de P_2O_5 associado a 100 g ha^{-1} de formononetina com produtividade estimada de $2149,8 \text{ kg ha}^{-1}$, com aumento de 17,37% na produtividade. Na ausência de P_2O_5 a dose de formononetina que proporcionou maior produtividade foi 100 g ha^{-1} chegando a produzir $2092,1 \text{ kg ha}^{-1}$, sendo esse aumento de 20,55%. Levando em consideração que o solo em que as plantas cresceram tinha 13 mg dm^{-3} de fósforo, ou seja valor considerado bom para a soja de acordo com Embrapa (2010). Considerando que a dose 70 kg ha^{-1} de fósforo teve produtividade estimada de $1782,25 \text{ kg ha}^{-1}$ de grãos e a produtividade das doses de fósforo menores encontram acima dela, pode ser um indício de que a adubação fosfatada pode ser reduzida quando aplicada a formononetina.

Para o número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo após o cultivo da soja ocorreu significância para doses de formononetina e para interação

entre doses de P_2O_5 e doses de formononetina ($p<0,01$), pelo teste F. Não houve efeito significativo para doses de P_2O_5 (Quadro 9).

QUADRO 9. Resumo da análise de variância do número de esporos no solo para a cultura da soja

Fonte de variação	Número de esporos no solo após cultivo
Dose de P_2O_5 (P)	0,228 ^{ns}
Dose de formononetina (F)	25,751 **
P x F	12,404 **
CV 1 (%)	9,97
CV 2 (%)	7,74

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

Na ausência de P_2O_5 ocorreu aumento na esporulação com aplicação de formononetina, o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear ($p<0,01$), pelo teste F. O coeficiente da equação foi significativos ($p<0,01$), pelo teste t. Para as doses intermediárias (17,5 e 35 $kg\ ha^{-1}$ de P_2O_5) ocorreu aumento na esporulação, o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático ($p<0,01$), pelo teste F. Os coeficientes das equações foram significativos ($p<0,01$), pelo teste t. Na dose 70 $kg\ ha^{-1}$ de P_2O_5 não houve efeito da aplicação de formononetina (Figura 15). Para a dose 17,5 $kg\ ha^{-1}$ observou-se aumento no número de esporos até a dose 59 $g\ ha^{-1}$ formononetina e, na dose 35 $kg\ ha^{-1}$ observou-se aumento até a dose 66 $g\ ha^{-1}$ de formononetina.

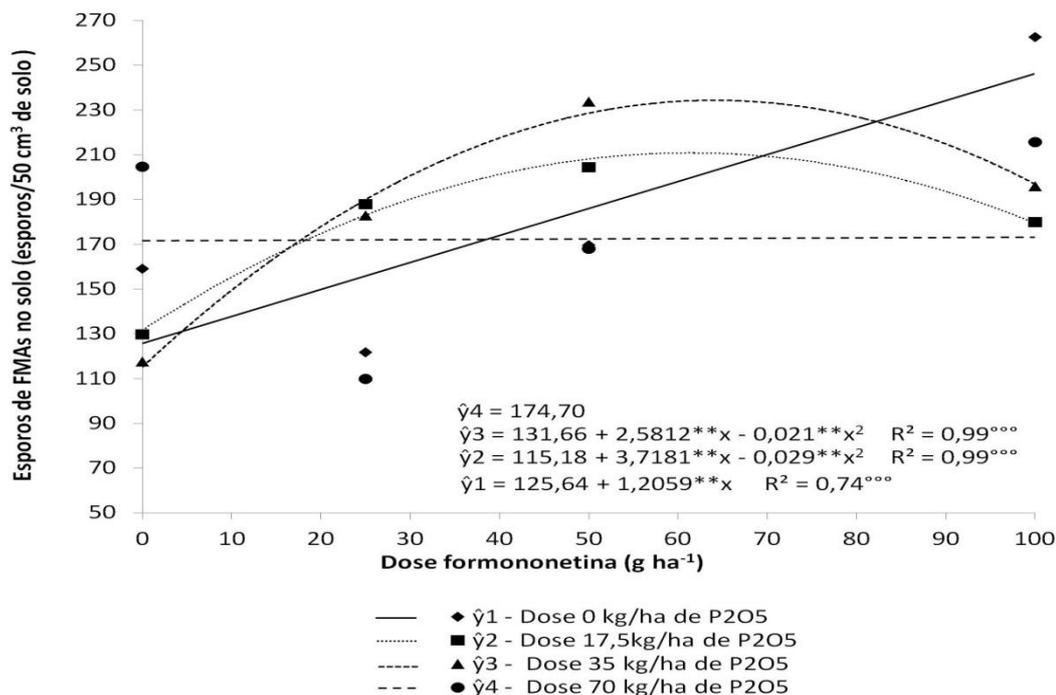


FIGURA 15. Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no solo, após o cultivo da soja, em função da aplicação de formononetina na semente de soja para cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% pelo teste t. ^{ooo}: Significativo a 1% pelo teste F).

Os fungos micorrízico arbuscular, são biotróficos obrigatórios, com isso, o aumento na esporulação pode indicar uma colonização melhor nas raízes das plantas. Como a formononetina é um estimulante a micorrização, acredita-se que ela possa aumentar a esporulação. É grande a importância do aumento na esporulação, pois segundo Maia et al. (2010) os glomoesporos são as principais estruturas de sobrevivência dos fungos micorrízicos arbusculares. Nesse contexto, a eficiência simbiótica está relacionada com o potencial de inóculo no solo, sendo o número de esporos no solo um dos atributos que influenciam (CARRENHO et al., 2010). Vários autores verificaram aumento de glomoesporos no solo com aplicação da formononetina (DAVIES et al., 2005; NOVAIS e SIQUEIRA, 2009; PEREIRA et al., 2011)

CONCLUSÕES

- A aplicação de formononetina promove melhorias na esporulação e taxa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares em raízes de soja;
- A aplicação de formononetina aumenta o teor de enxofre nas folhas de soja no estágio R2;
- Aplicação de formononetina aumenta o número e massa seca de nódulos nas raízes de soja no estágio R2;
- Aplicação de formononetina aumenta a produtividade de grãos de soja, indicando a possibilidade de redução na adubação fosfatada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S.A.L.; ABREU, M.F.; SILVEIRA, A.P.D. Interação de chumbo, da saturação por bases do solo e de micorriza arbuscular no crescimento e nutrição mineral da soja. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v.27, p.945-954, 2003

ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.O.D. Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.1191-1198, 2004.

CARDOSO, E.J.B.N.; NAVARRO, R.B.; NOGUEIRA, M.A. Absorção e translocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crescentes deste nutriente. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.27, p.415-423, 2003

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; DAVIDE, A.C.; JANE, L.; CURI, N.; VALE, F.R. Fungo micorrízico e superfosfato no crescimento de espécies arbóreas tropicais. **Scientia Florestalis**, v.50, p.21-36. 1996.

CARVALHO, T.S.; MOREIRA, F.M.S. Simbioses leguminosas, fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. 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.383-414.

CARENHO, 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. **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.

COSTA, C.M.C.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; NOGUEIRA, R.J.M.C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.893-901, 2001.

COSTA, T.A.; SCHUNK, E.; PINTRO, J.C.; COSTA, S.M.G. Influência da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares da acidez do solo e de fontes de fósforo no crescimento do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.24, p.1583-1590, 2002.

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.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja - região central do Brasil 2011**. Londrina: EMBRAPA, 2010. 247p.

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.

LAMBAIS, M.R.; RÍOS R.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.160, p.421-428, 2003.

MAIA, C.E.; MORAIS, E.R.C.; PORTO FILHO, F.Q.; GUEYI, H.R.; MEDEIROS, J.F. Teores foliares de nutrientes em meloeiro irrigado com águas de diferentes salinidades. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.9, p.292-295, 2005.

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.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

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

MIRANDA, J.C.C.; MIRANDA, L.N. Micorriza arbuscular. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa- CPAC, 1997. 524p.

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

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento da soja em função de doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.329-338, 2000.

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, R.S. **Alterações na dinâmica da competição entre estirpes de rizóbio pelos sítios de nodulação nas raízes de soja e suas consequências no crescimento das plantas causada pelos fungos micorrízicos arbusculares**. 1998. 75f. Dissertação (Mestrado) – UNB, Brasília – DF.

PEREIRA, E.G.; SIQUEIRA, J.O.; VALE, F.R.; MOREIRA, F.M.S.; Efeito do fornecimento e formas de N mineral no crescimento e colonização micorrízica de espécies arbóreas nativas. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.8, p.59-65, 1996.

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.)**. 1999. 40f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANTOS, I.P.A.; PINTO, J.C.; SIQUEIRA, J.O.; MORAIS, A.R.; SANTOS, C.L. Influência do fósforo, micorriza e nitrogênio no conteúdo de minerais de *Brachiaria brizantha* e *Arachis pintoi*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.605-616, 2002.

SENA, J.O.A.; LABATE, C.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Physiological characterization of growth depression in arbuscular mycorrhizal citrus seedlings under high P levels. **Revista Brasileiro de Ciência do Solo**, v.28, p.827-832. 2004.

SILVA JÚNIOR, J.P.; SIQUEIRA, J.O. Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.35-41, 1997.

SILVA, A.C.; SANTOS, J.B.; KASUYA, M.C.M.; SILVA, A.A.; MANABE, A. Micorrização e épocas de dessecação de *Brachiaria brizantha* no desenvolvimento da soja. **Planta Daninha**, v.24, p.271-277, 2006

SIQUEIRA, J.O.; BROWN, D.G.; SAFIR, G.R.; NAIR, M.G. Field application of the VA-mycorrhiza stimulating isoflavonoid formononetin (RhizotropinTM) on corn and soybean in Brazil. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MANAGEMENT OF MYCORRHIZAS IN AGRICULTURE, HORTICULTURE AND FORESTRY, 1992, Perth. **Proceedings...** Perth: University of Western Australia, 1992. 132p.

VADEZ, V.; BECK, D.P.; LASSO, J.H.; DREVON, J.J. Utilization of the acetylene reduction assay to screen for tolerance of symbiotic N₂ fixation to limiting P nutrition in common bean. **Physiologia Plantarum**, v.99, p.227-232, 1997.

VILELA, L.; ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética de absorção de fósforo em cultivares de soja afetadas pela interação alumínio fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.91-96, 1984.

CAPÍTULO 2

FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE MICORRIZAÇÃO EM MILHO ASSOCIADO À FERTILIZANTE FOSFATADO EM LATOSSOLO

RESUMO: As micorrizas proporcionam aumento de até 80% na absorção de fósforo, o que pode contribuir para a redução da adubação fosfatada, em solos que requerem elevadas quantidades desse nutriente. A formononetina estimula o crescimento assimbiótico fungo micorrízico arbuscular (FMAs) e acelera a micorrização. Com isso, objetivou-se com essa pesquisa verificar o efeito da formononetina na produção, absorção de nutrientes, taxa de colonização e esporulação de FMAs na cultura do milho. O experimento foi realizado em 2010/2011, num Latossolo Vermelho Distroférico, na fazenda experimental da UFGD, município de Dourados - MS. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, arranjos em esquema de parcelas subdivididas, com cinco repetições, sendo quatro doses de fósforo nas parcelas (0; 17,5; 35 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅) fornecido com o superfosfato triplo, e quatro doses de formononetina nas sub-parcelas (0, 25, 50 e 100 g ha⁻¹) fornecida com o produto comercial PHC 506, aplicado na semente. Avaliou-se a taxa de colonização das raízes por FMAs, teor de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre; no final do ciclo da cultura avaliou-se a altura das plantas, número de espigas por planta, massa de 100 grãos e produção. Após a colheita avaliou-se o número de esporos de FMAs no solo. A aplicação de formononetina aumenta a esporulação, o teor de nitrogênio, fósforo e enxofre, a massa de grãos, altura de plantas e número de espigas por plantas. Com isso, pode-se concluir que existe a possibilidade de redução na adubação fosfatada na cultura do milho quando utilizada a formononetina.

Palavras-chave: Isoflanóide; Micorriza; Fungo micorrízico arbuscular.

FORMONONETIN AS STIMULATING OF MYCORRHIZATION IN CORN ASSOCIATED TO PHOSPHATED FERTILIZER IN OXISOL

ABSTRACT: The mycorrhizae provide up to 80% increase in the absorption of phosphorus, which can contribute to the reduction of phosphate fertilization in soils that require high amounts of this nutrient. The formononetin stimulates asymbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and accelerates the mycorrhization. Therefore, the objective of this research is to verify the effect of formononetin in production, nutrient absorption, rate of colonization, and sporulation of AMF in corn. The experiment was conducted in 2010/2011, in the Dystroferric Red Oxisol, at the experimental farm of UFGD, in Dourados - MS. The experimental lineation used was randomized blocks, arranged in a split plot with five replications, with four dosages of phosphorus in the plots (0; 17,5 ; 35 and 70 kg ha⁻¹ of P₂O₅) provided with triple superphosphate and four dosages of formononetin in the sub-plots (0, 25, 50 and 100 g ha⁻¹) provided with the commercial product PHC 506, applied to the seed. It was evaluated the rate of root colonization by AMF; content of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, magnesium, and sulfur. At the end of the cycle, it was evaluated the plant's height, number of corncobs in maize plants, weight of 100 grains and productivity. After harvest, we evaluated the number of AMF spores in soil. The application of formononetin increases the sporulation of AMF, the content of nitrogen, phosphorus and sulfur; it also increases the plant height, the number of corncobs in maize plants, and the weight of 100 grains. Thus, we can conclude that there is the possibility of reduction in phosphorus fertilization in corn when formononetin is used.

Keywords: Isoflavonoid; Mycorrhiza; Arbuscular mycorrhizal fungi.

INTRODUÇÃO

Micorriza é a associação simbiótica e mutualística entre plantas e fungos e, existem diversos tipos, dentre elas destacando-se as micorrizas arbusculares (MAs), formados pelos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e plantas. As micorrizas são benéficas às plantas, pois podem provocar melhorias na qualidade física do solo, na absorção de nutriente, na tolerância a doenças e estresses ambientais, na tolerância à toxicidade por nutrientes e metais pesados no solo, estímulo à fixação biológica de nitrogênio nas plantas, substâncias estimuladoras ao crescimento e alterações bioquímicas e fisiológicas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). E, também, maior atividade e biomassa da microbiota do solo (ANDRADE e SILVEIRA, 2004).

O fósforo tem funções importantes na planta, sendo constituinte de compostos de energia (ATP), fosfolipídios e outros ésteres (MALAVOLTA et al., 2006). Vários fatores podem alterar a resposta da planta à micorrização, dentre eles o teor de fósforo no solo. Geralmente, a baixa quantidade de fósforo no solo proporciona aumento na germinação e crescimento assimbiótico dos fungos micorrízicos arbusculares (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Em geral, para o milho ocorre redução na colonização quando aplicado fósforo e, a esporulação aumenta até uma determinada quantidade de fósforo (CARRENHO et al., 2010). Além do teor de fósforo no solo, a capacidade de absorção da planta e os diferentes genótipos dentro de uma mesma espécie podem alterar a relação entre micorrização e fósforo. 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.

O efeito da micorriza no teor e acúmulo de nutrientes é variado. Costa et al. (2002) verificaram aumento nos teores de potássio de plantas micorrizadas, esse efeito pode ser devido à maior absorção de fósforo induzindo melhor nutrição potássica. Santos et al. (2002) não encontram efeito da micorrização com no acúmulo de potássio, enxofre, cálcio e magnésio em *Brachiaria brizantha*. Costa et al. (2002) verificaram aumento no teor de fósforo quando a associou-se micorriza e fonte solúvel de fósforo, e aumento no teor de nitrogênio e potássio quando associado micorriza e fonte pouco solúvel de fósforo.

Geralmente, ocorre maior teor de fósforo em plantas micorrizadas, sendo que a maior absorção pode ser devido ao aproveitamento mais eficiente das outras formas de fósforo. Cardoso et al. (2006) trabalharam com milho resistente aos elevados teores de alumínio, em vaso, analisando diferentes fracionamentos de fósforo antes e depois do tratamento com micorrizas. Nas plantas não micorrizadas observaram que não houve mudanças na fração de fósforo orgânico e inorgânico, mas para as plantas micorrizadas ocorreu o esgotamento da fração inorgânica e de 20% da fração de fósforo inorgânica parcialmente disponível (Pi-NaOH), ou seja, a micorrização permitiu acesso da planta ao fósforo que não estaria disponível em curto tempo. Ness e Vlek (2000) verificaram que o milho micorrizado absorveu fósforo da rocha fosfatada hidroxapatita.

O sistema radicular do milho pode ser modificado na presença de micorrizas, nesse sentido, Bressan e Vasconcellos (2002) verificaram correlação positiva e significativa entre massa seca de raízes e taxa de colonização em milho. Plantas de milho sem micorrização, mas adubadas com fósforo tiveram elevação na massa seca de raiz e aumento no número de pelo radicular e maior absorção de fósforo. Já as plantas micorrizadas apresentaram menor número de pelos radiculares, mas as hifas micorrízicas, provavelmente, suprimiram essa redução, também proporcionando aumento na absorção de fósforo.

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 (NAIR et al., 1991). Acredita-se que os flavonóides estimulam o crescimento; induza a formação e a diferenciação morfológica, levando a maior formação de apressórios e pontos de entradas primários. Algumas evidências indicam que ela suprime a atividade da enzima peroxidase, que atua de modo restritivo à entrada do fungo na raiz (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

A inoculação de FMA acarreta incrementos na produção de matéria seca da parte aérea e do sistema radicular de milho (CAMPOS et al., 2010). Costa et al. (2002) avaliaram o milho micorrizados em solo ácido e, verificaram aumento da matéria seca das raízes quando a micorrização era associada à fonte solúvel de fósforo. Siqueira et al. (1999) verificaram que a aplicação de formononetina aumentou em quase 50% a colonização das raízes. Também Romero (1999), avaliando produtividade da cultura do milho, observou aumentos de 14 a 28% na produção desta cultura.

Alguns autores têm relatado 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 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.

Com isso, objetivou-se com a pesquisa verificar a eficácia de um produto estimulante da micorrização na cultura do milho. E os objetivos específicos são: verificar a eficácia de um produto estimulante da micorrização na produção de grãos; verificar o efeito da aplicação do estimulante de micorriza na absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre; verificar o efeito do estimulante de micorriza na taxa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares nas raízes e número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2010/2011, 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 WO 54° 59' 25", 401 m de altitude.

O solo foi amostrado e sua caracterização química (Quadro 10) e física (Quadro 11) realizada segundo metodologia proposta por Claessen et al. (1997). 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.

QUADRO 10. Caracterização química do solo

pH CaCl ₂	P	K	Al	Ca	Mg	H+Al	SB	T	V
	mg dm ⁻³	-----cml _c dm ⁻³ -----						%	
5,0	13,0	0,18	0,12	6,10	2,20	6,20	8,48	14,8	57,0

P e K: Melich I; Ca, Mg e Al: KCl 1 mol L⁻¹; SB = Ca + Mg + K; T=CTC= Sb + H+Al; Saturação em bases (V) = 100 * (SB/T).

QUADRO 11. Caracterização física do solo

Textura (g kg ⁻¹)			Dp (g cm ⁻³)	Ds (g cm ⁻³)		
areia	silte	argila		0 - 5 (cm)	5 - 10 (cm)	10 - 20 (cm)
243,9	140,6	613,4	2,9	1,37	1,56	1,6

Textura: Método da pipeta; Densidade de partícula (Dp): Método do balão volumétrico; Densidade do solo (Ds): método do anel volumétrico.

A densidade de esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes na área antes da instalação do experimento, foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Gerdemann e Nicholson (1963). O valor médio da densidade de esporos encontrada foi de 173 esporos em 50 cm⁻³ de solo.

A extração e contagem de esporos descrita por Gerdemann e Nicholson (1963), foi realizada da seguinte forma: Colocou-se 50 cm⁻³ de solo em um becker; transferiu-se para um becker grande e suspendeu-se com no mínimo 500 mL de água de torneira; agitou-se vigorosamente com um bastão de vidro para suspender os esporos e

esperou-se por 30 segundos; passou-se a suspensão através de duas peneiras empilhadas, com aberturas de 710 μm e 0,053 μm ; repetiu-se os dois procedimentos anteriores por três vezes, ou até a água do Becker ficar limpa. Em seguida colocou-se o material retido na peneira de 710 μm em uma placa de petri grande e observou-se na lupa a presença de esporos grandes (esporos de *Gigaspora* e *Scutellospora*) e esporocarpos. Após isso, transferiu-se o material retido na peneira de 0,053 μm para um tubo de centrífuga com água; centrifugou-se a 3000 rpm por três minutos; retirou-se o sobrenadante cuidadosamente, deixando-se apenas o solo no tubo de centrífuga. Adicionou-se sacarose (50%) no tubo de centrífuga contendo o solo; centrifugou-se a 2000 rpm por um minuto; despejou-se o sobrenadante novamente na peneira de 0,053 μm e lavou-se com água de torneira para remover o excesso de sacarose; transferiu-se os esporos da peneira de 0,053 μm para uma placa canelada e na lupa fez-se a contagem.

Os valores de precipitação pluviométrica e temperatura média no período do experimento estão presentes a seguir (Figura 16).

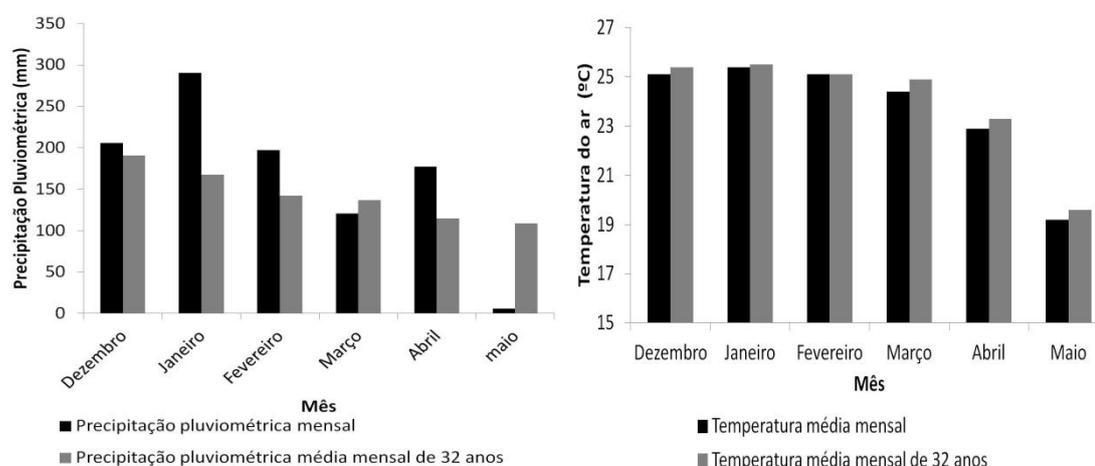


FIGURA 16. Precipitação pluviométrica e temperatura média durante a condução do experimento, de acordo com a estação meteorológica da Embrapa Agropecuária Oeste.

O milho foi semeado manualmente, e em plantio direto, utilizando-se o híbrido DKB YG390, no dia 17/12/201. A adubação foi realizada manualmente, aplicando-se 60 kg ha^{-1} de K_2O (tendo como fonte o cloreto de potássio), 20 kg ha^{-1} de nitrogênio no plantio (tendo como fonte o sulfato de amônio) e 80 kg ha^{-1} de nitrogênio em cobertura (tendo como fonte a ureia), 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 ha⁻¹ de P₂O₅), tendo como fonte o superfosfato triplo, e nas sub-parcelas quatro doses de formononetina (0, 25, 50, 100 g ha⁻¹), tendo como fonte o produto comercial PHC 506, aplicado nas sementes. Cada unidade experimental tinha seis linhas de 7 m de comprimento, com espaçamento entre-linhas de 0,80 m, sendo considerada como área útil apenas as quatro linhas centrais, excluindo-se 1 m de cada extremidade, onde foram coletadas as amostras para as análises.

O PHC-506 é produzido pela Plant Health Care (PHC), INC-Pittsburg, EUA. É um pó esbranquiçado, 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.

No estágio fenológico Vt foram realizadas amostragens para avaliação do estado nutricional das plantas de milho baseada em análise foliar. Coletaram-se, ao acaso, a folha oposta e abaixo da espiga, de 10 plantas por unidade experimental. As amostras foram lavadas e colocadas em sacos de papel e secadas em estufa com circulação forçada de ar a 70°C, até peso constante. Após terem sido moídas em moinho tipo Willey as amostras sofreram digestão nitroperclórica e o extrato da digestão usado para a determinação de P e S (colorimetria), K (fotometria de chama), Ca e Mg (espectrofotometria de absorção atômica), segundo metodologia descrita por Malavolta et al. (1997), enquanto os teores de N foram determinados pelo método de Kjeldahl, após digestão sulfúrica.

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 finas foi clarificado usando-se solução de KOH 5% p/v por 30 minutos. Em seguida foram lavadas em água corrente e agitadas 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 intercessão, descrito por Giovanetti e Mosse (1980) e observação em microscópio estereoscópico (ampliação de 10 a 40 vezes).

Ao final do ciclo do milho (estádio R6) foram avaliados os efeitos dos tratamentos sobre o desenvolvimento e produtividade da cultura, realizando-se as seguintes avaliações: altura das plantas, por meio da medição de 10 plantas por unidade experimental, medindo-se as plantas do nível de solo até a inserção da última folha; número de espigas por planta, contando-se as espigas de toda a unidade experimental; massa de 100 grãos e produção de grãos unidade experimental, colhendo todas as plantas da área útil da unidade experimental. Posteriormente, determinou-se a umidade e os devidos descontos da umidade (utilizou-se 13% como umidade padrão).

Após a colheita, foram coletadas, ao acaso, cinco amostras simples de solo, por unidade experimental, que foram homogeneizadas e retirada uma amostra composta por 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 e Nicholson (1963).

Os dados coletados foram submetidos à análise de regressão, utilizando-se o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000). A significância das equações foram avaliadas 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 porcentagem de colonização micorrízica foram transformados pelo arco seno $(x/100)^{0,5}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de nitrogênio e fósforo na folha de milho foram afetados pelas doses de P_2O_5 , doses de formononetina e pela interação entre doses de P_2O_5 e doses de formononetina ($p < 0,01$), pelo teste F. O teor de potássio foi afetado pelas doses de P_2O_5 ($p < 0,01$) e pela interação entre doses de P_2O_5 e doses de formononetina ($p < 0,05$), pelo teste F (Quadro 12).

QUADRO 12. Resumo da análise de variância dos valores de teor de nitrogênio, fósforo e potássio na folha de milho

Fonte de variação	N	P	K
Dose de P_2O_5 (P)	7,966 **	325,117 **	39,058 **
Dose de formononetina (F)	66,72 **	12,376 **	0,056 ^{ns}
P x F	6,993 **	5,766 **	2,126 *
CV 1 (%)	3,28	2,61	5,17
CV 2 (%)	3,14	2,89	4,41

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

Para as doses 0; 17,5 e 70 kg ha⁻¹ de P_2O_5 a aplicação de formononetina proporcionou aumento no teor de nitrogênio na folha. O modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear ($p < 0,01$), pelo teste F. Os coeficientes de todas as equações foram significativos ($p < 0,01$), pelo teste t (Figura 17). Na dose 35 kg ha⁻¹ de P_2O_5 não houve efeito da aplicação de formononetina. De acordo com Malavolta et al. (2006) teores de nitrogênio entre 28 e 35 g kg⁻¹ são considerados adequados. Com isso, os teores de nitrogênio observados em todas as doses de formononetina podem ser considerados de adequados a altos.

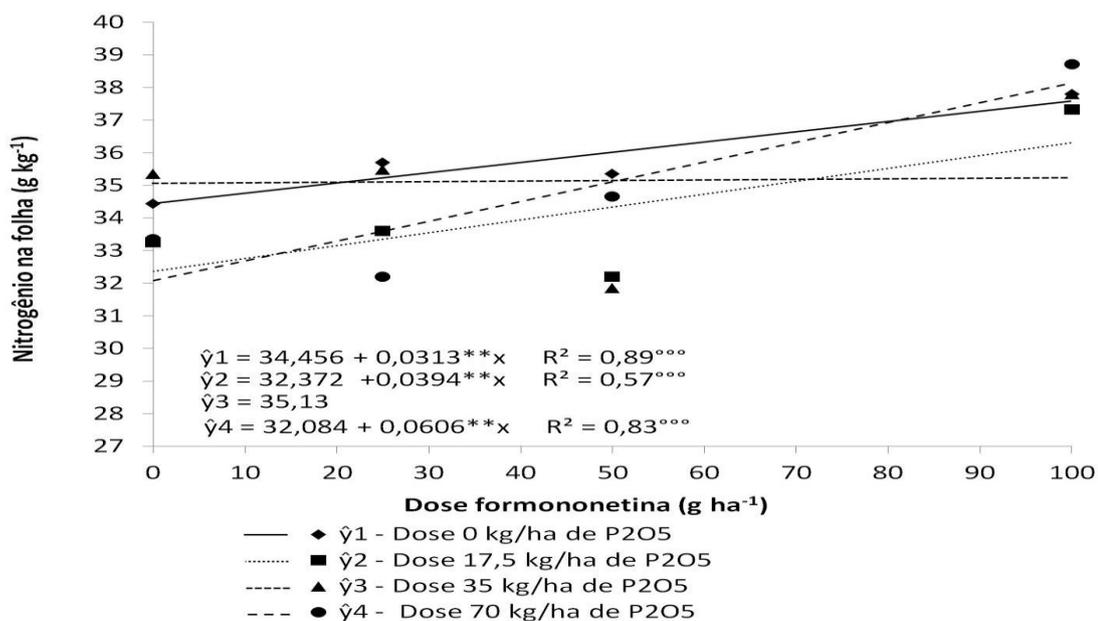


FIGURA 17. Teor de nitrogênio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. ^{ooo}: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F).

Tem-se observado aumento na absorção de nitrogênio em plantas micorrizadas, principalmente na forma amoniacal, devido a ela ser menos móvel no solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), além disso, um adequado fornecimento de fósforo pode aumentar a fixação biológica de nitrogênio (CARRENHO et al., 2010). No milho existem estudos comprovando a eficiência da fixação biológica de nitrogênio, por meio das bactérias diazotróficas endofíticas.

Como a formononetina é um estimulante da micorrização, sua aplicação pode ter aumentado a micorrização, contribuindo assim para a absorção de nitrogênio. Bressan et al. (2001) verificaram aumento no teor de nitrogênio em folhas de sorgo micorrizados. Santos et al. (2002) verificaram aumento no acúmulo de nitrogênio na parte aérea do amendoim quando se inoculou o fungo micorrízico arbuscular na presença de 25 mg kg⁻¹ de fósforo.

Nas doses 17,5 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ a aplicação de formononetina proporcionou aumento no teor de fósforo na folha, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o quadrático (p<0,01), pelo teste F. Os coeficientes das equações foram significativos (p<0,01), pelo teste t. Nas doses 0 e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve efeito da aplicação de formononetina (Figura 18). Na dose 17,5 kg ha⁻¹ ocorreu aumento no teor de fósforo na folha de milho até a dose 63 g ha⁻¹ de formononetina, e para a dose 70 kg ha⁻¹ ocorreu aumento no teor até a dose 67,50 g ha⁻¹. De acordo com Malavolta et al.

(2006) teores de fósforo entre 2,4 e 4,0 g kg⁻¹ são considerados adequados. Com isso, os teores de fósforo observados em todas as doses de formononetina podem ser considerados de adequados a altos.

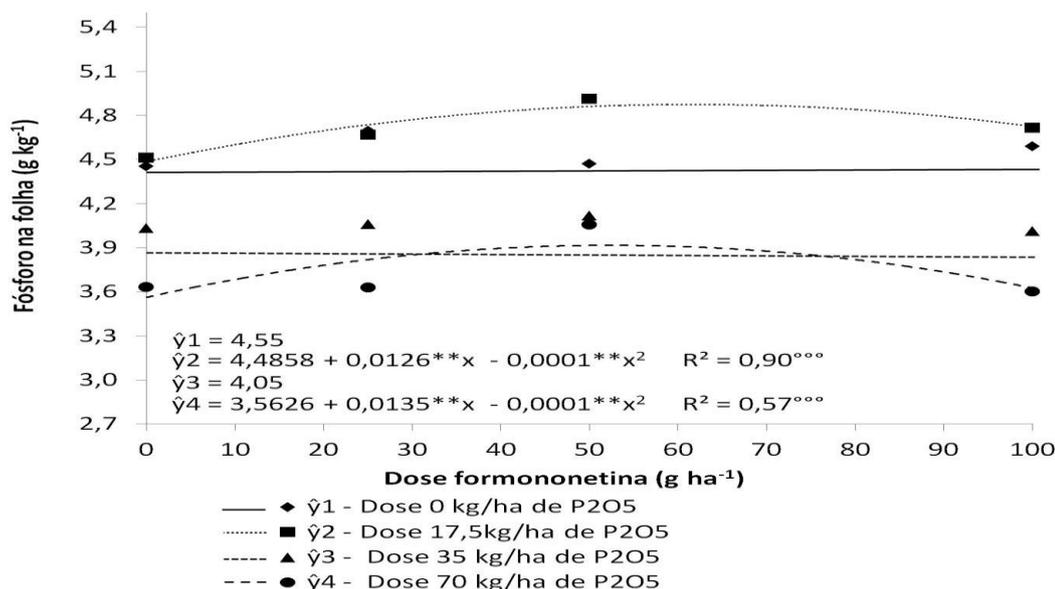


FIGURA 18. Teor de fósforo na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t.^{ooo}: Significativo a 1% de probabilidade pelo F)

O fósforo é o principal nutriente influenciado pela micorriza e, como a formononetina é um estimulante da micorrização, isso pode ter aumentado a contribuição das micorrizas na absorção de fósforo. O fosfato é absorvido quando em contato com as raízes, assim, quando a planta está colonizada por fungo micorrízico arbuscular as hifas externas torna-se um extensão das raízes, formando a micorrizosfera (CARDOSO et al., 2010). O'Keefe e Sylvia (1991), considerando diâmetro médio de 8 µm e 250 µm para hifas e raízes, respectivamente, estimaram que o aumento da área de superfície devido à micorrização pode atingir 1.800% e que o fluxo de fósforo pode ser aumentado em 477% para um aumento de apenas 3% na área de superfície. Bressan et al. (2001), também, verificaram para o sorgo micorrizado aumento no teor de fósforo na folha.

Não está esclarecido qual o mecanismo que proporciona aumento na absorção de fósforo pela planta micorrizada e, as hipóteses são: Maior volume de solo e exploração de regiões de difícil acesso pelas raízes (CARDOSO et al., 2010). Melhoria nos parâmetros cinéticos de absorção de fósforo pelas hifas, como, por exemplo, maior

velocidade na absorção, maior afinidade com o fósforo, aumentando a absorção em soluções pobres nesse nutriente (SILVEIRA e CARDOSO, 2004). As raízes e hifas solubilizam o fósforo por meio de alterações químicas (FENG et al., 2003).

Além disso, as micorrizas podem auxiliar a planta na absorção mais eficiente de outras formas de fósforo. Segundo Joner et al. (2000) a atividade microbiana saprofítica na micorrizosfera pode ser aumentada e a hifa tem capacidade de capturar o fósforo mineralizado mais rapidamente, evitando a fixação.

Cardoso et al. (2006) trabalharam em vasos, com milho resistente a elevados teores de alumínio, analisando diferentes fracionamentos de fósforo antes e depois do tratamento com micorrizas. Nas plantas não micorrizadas não houve mudanças na fração de fósforo orgânico e inorgânico, mas para as plantas micorrizadas ocorreu o esgotamento da fração inorgânica e de 20% de fósforo da fração inorgânica parcialmente disponível (Pi-NaOH), ou seja, permitiu acesso da planta ao fósforo que não estaria disponível em curto tempo.

Plantas micorrizadas também podem aproveitar mais eficientemente rocha fosfatada (COSTA et al., 2002). No milho Ness e Vlek (2000) verificaram que quando micorrizado absorveu fósforo da hidróxi-apatita. Estudos mostram também que plantas micorrizadas podem absorver fósforo fixado, Alves (1988) verificaram em *Brachiaria decumbens* e *Stylosanthes* sp. a capacidade de absorver fósforo fixado quando as plantas são micorrizadas.

Nas doses 0 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ a aplicação de formononetina proporcionou redução no teor de potássio na folha, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o linear (p<0,1 e p<0,05, respectivamente), pelo teste F. Os coeficientes das equações foram significativos (p<0,1 na dose 0 kg ha⁻¹ e p<0,05 na dose 70 kg ha⁻¹), pelo teste t. Nas doses 17,5 e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve efeito da aplicação de formononetina (Figura 19). De acordo com Malavolta et al. (2006) teores de potássio entre de 17 e 30 g kg⁻¹ são considerados adequados. Com isso, os teores de potássio observados em todas as doses de formononetina são considerados de adequados a altos.

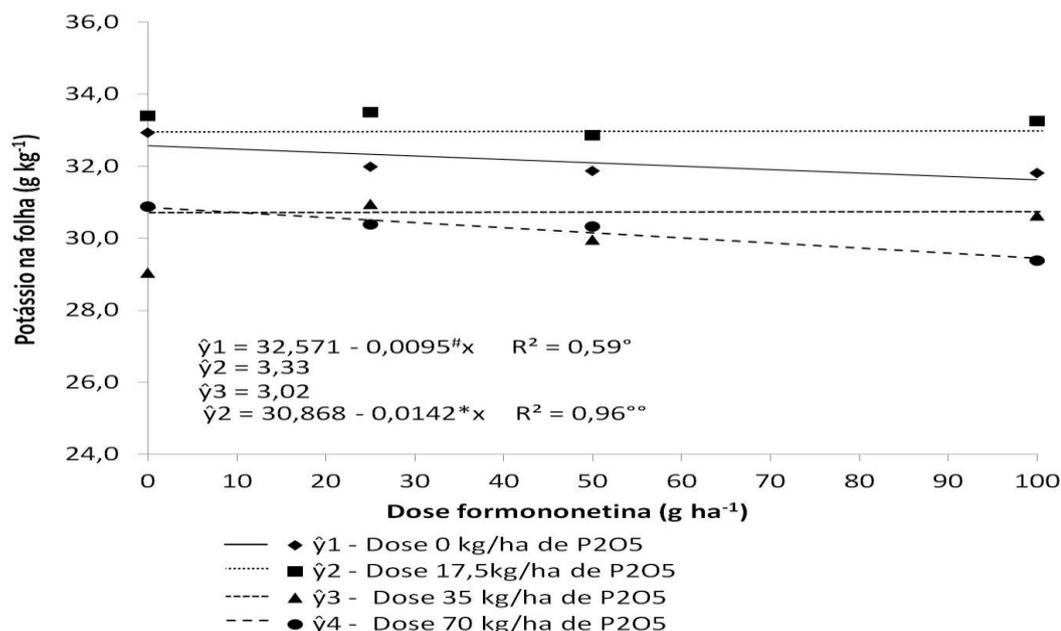


FIGURA 19. Teor de potássio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (*: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. #Significativo a 10% de probabilidade pelo teste t. °: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. °: Significativo a 10% de probabilidade pelo teste F).

Normalmente, ocorre diminuição no teor de potássio em plantas micorrizadas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Provavelmente, o efeito da diluição do potássio na folha foi o responsável por essa redução, pois ocorreu aumento na altura das plantas quando se aplicou formononetina. A maior altura de plantas pode indicar que elas acumularam mais biomassa, fato esse responsável pelo efeito da diluição.

Os teores de magnésio e enxofre na folha de milho foram afetados significativamente pelas doses de P₂O₅, doses de formononetina e pela interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,01), pelo teste F. Para o cálcio, ocorreu significância para doses de P₂O₅ (p<0,01), pelo teste F (Quadro 13).

QUADRO 13. Resumo da análise de variância dos valores de teor de cálcio, magnésio e enxofre na folha de milho

Fonte de variação	Ca	Mg	S
Dose de P ₂ O ₅ (P)	25,591 **	102,609 **	58,368 **
Dose de formononetina (F)	2,067 ^{ns}	11,143 **	36,806 **
P x F	1,930 ^{ns}	15,195 **	22,413 **
CV 1 (%)	4,78	7,01	3,87
CV 2 (%)	4,61	3,98	2,63

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

A aplicação de P_2O_5 no solo proporcionou redução no teor de cálcio na folha do milho. O modelo que melhor se ajustou aos dados foi o linear ($p < 0,01$), pelo teste F. O coeficiente da equação foi significativo ($p < 0,01$), pelo teste t (Figura 20). De acordo com Malavolta et al. (2006) teores de cálcio na folha de milho entre de 4 e 10 $g\ kg^{-1}$ são considerados adequados. Com isso, os teores de cálcio observados em todas as doses de formononetina são considerados adequados. Nesse sentido, apesar da redução no teor de cálcio causado pelo fósforo, não houve prejuízos ao fornecimento para o milho.

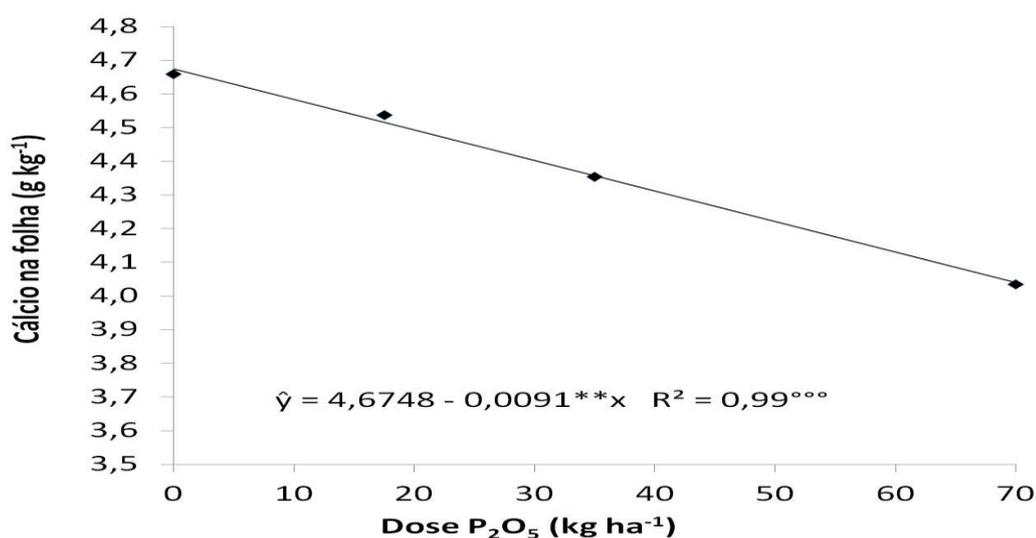


FIGURA 20. Teor de cálcio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de P_2O_5 no solo. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F)

Provavelmente, o efeito da diluição do cálcio na folha foi o responsável por essa redução, pois ocorreu aumento na altura das plantas quando se aplicou fósforo no solo e, a maior altura de plantas pode indicar que elas acumularam mais biomassa, fato esse responsável pelo efeito da diluição. Hernandez e Silveira (1998) testaram três doses de fósforo e cinco tipos de calcário aplicados no solo na cultura do milho e, verificaram redução de 50 % no teor de cálcio na folha comparando-se as doses 0 e 100 $mg\ dm^{-3}$, atribuindo esse fato a diluição do nutriente.

Em relação ao teor de magnésio para as doses 35 e 70 $kg\ ha^{-1}$ de P_2O_5 ocorreu redução no seu teor na folha com aplicação de formononetina. O modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear nas doses 35 e 70 $kg\ ha^{-1}$ ($p < 0,01$), pelo teste F.

Os coeficientes das equações foram significativos ($p < 0,01$), pelo teste t. Na dose 35 kg ha⁻¹ o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático ($p < 0,01$), pelo teste F. Os coeficientes da equação foram significativos ($p < 0,01$), pelo teste t. Para a dose 0 e 17,5 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve efeito significativo (Figura 21). De acordo com Malavolta et al. (2006) teores de magnésio entre de 2,1 e 4,0 g kg⁻¹ são considerados adequados. Com isso, os teores de magnésio observados em todas as doses de formononetina são considerados altos. Nesse sentido a redução no teor com as doses de formononetina não proporcionou prejuízos a na absorção de magnésio.

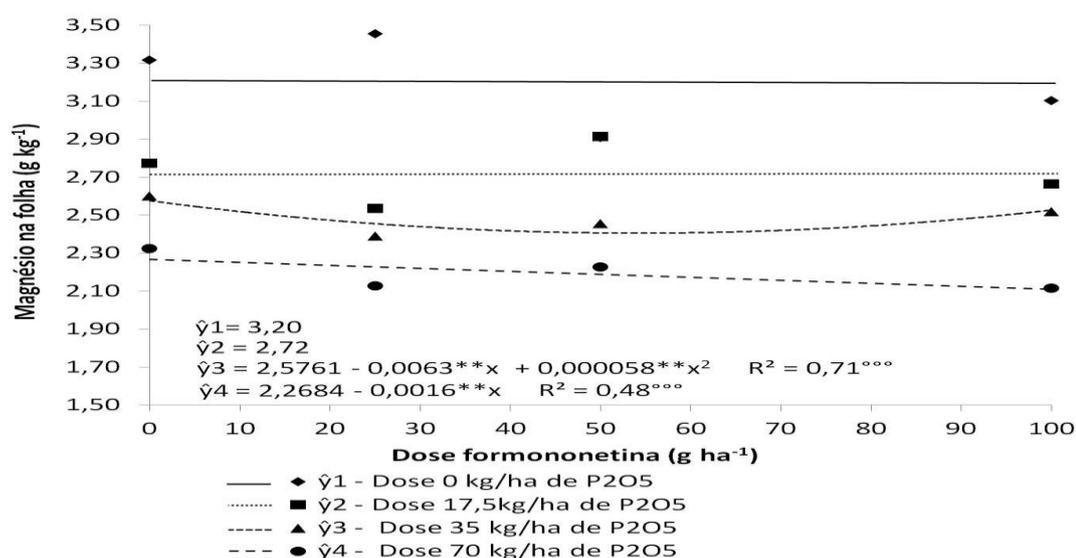


FIGURA 21. Teor de magnésio na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. ***: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F)

Normalmente, ocorre diminuição no teor de magnésio em plantas micorrizadas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Provavelmente, o efeito da diluição do magnésio na folha foi o responsável por essa redução, pois ocorreu aumento na altura das plantas quando se aplicou formononetina. A maior altura de plantas pode indicar que elas acumularam mais biomassa, fato esse responsável pelo efeito da diluição. Bressan et al. (2001) verificaram para o sorgo redução no teor de magnésio na folha, segundo os autores devido ao efeito da diluição.

Para as doses 0; 17,5 e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve resposta no teor de enxofre na folha, quando aplicado formononetina. Para a dose 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ houve aumento no teor de enxofre na folha com aplicação de formononetina. O modelo que

melhor se ajustou aos dados foi o quadrático ($p < 0,01$), pelo teste F. Os coeficientes foram significativos ($p < 0,01$), pelo teste t (Figura 22). Na dose 70 kg ha⁻¹ ocorreu aumento no teor de enxofre na folha de milho até a dose 38,75 g ha⁻¹ de formononetina. De acordo com Malavolta et al. (2006) teores de enxofre entre de 1,0 e 2,4 g kg⁻¹ é adequado, com isso, os teores apresentados no trabalho são considerados baixos.

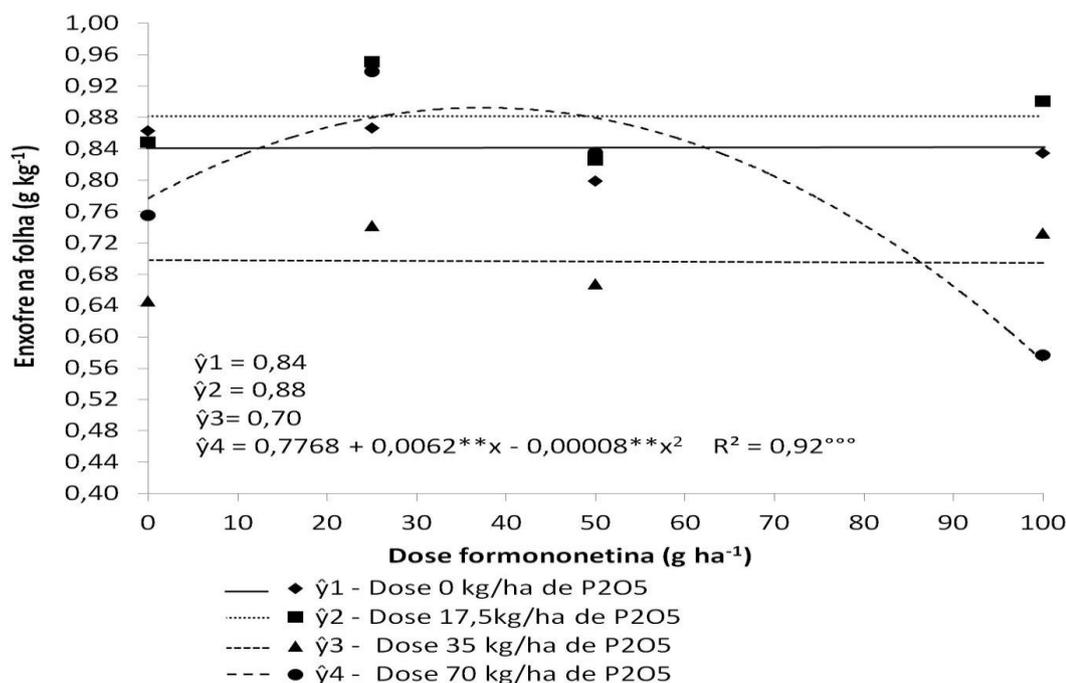


FIGURA 22. Teor de enxofre na folha de milho no estágio Vt, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F).

Normalmente ocorre aumento no teor de enxofre em plantas micorrizadas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006), mas as respostas podem variar. Santos et al. (2002) não encontram efeito da micorrização no acúmulo de enxofre. Carneiro et al. (1996) observaram aumento nos teores enxofre em espécies arbóreas micorrizadas. Silva Júnior e Siqueira (1997) observaram que a aplicação de formononetina para o milho proporcionou aumento no teor de enxofre. Parte da explicação do aumento na concentração de enxofre com aplicação da formononetina deve-se ao provável sinergismo com aumento de absorção de fósforo e, segundo Malavolta et al. (2006) o teor de fósforo nas proteínas, provavelmente, é o responsável pelo sinergismo.

A taxa de colonização das raízes de milho por fungos micorrízicos arbusculares não foi afetada pelos tratamentos (Quadro 14).

QUADRO 14. Resumo da análise de variância da taxa de colonização nas raízes do milho

Fonte de variação	Taxa de colonização
Dose de P ₂ O ₅ (P)	0,352 ^{ns}
Dose de formononetina (F)	1,255 ^{ns}
P x F	0,509 ^{ns}
CV 1 (%)	10,20
CV 2 (%)	6,82

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

A espécie de planta pode afetar a colonização. As gramíneas, como é o caso do milho, são 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). Além disso, o estágio fenológico pode afetar a taxa de colonização (CARRENHO et al., 2010). Assim, a elevada capacidade que o milho tem de estabelecer a simbiose com os fungos micorrízicos arbusculares e o estágio fenológico das plantas amostradas podem ter levado a falta de resposta da aplicação de formononetina na taxa de colonização.

Para a altura de plantas ocorreu significância para doses de P₂O₅, doses de formononetina e interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,01), pelo teste F (Quadro 15).

QUADRO 15. Resumo da análise de variância dos valores de altura de plantas de milho

Fonte de variação	Altura de plantas
Dose de P ₂ O ₅ (P)	30,007 **
Dose de formononetina (F)	5,512 **
P x F	3,911 **
CV 1 (%)	1,46
CV 2 (%)	1,26

** : Significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F.

Para as doses 0; 17,5 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve resposta na altura de plantas quando se aplicou formononetina. Para a dose 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅ houve aumento na altura de plantas com aplicação de formononetina. O modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o linear (p<0,1), pelo teste F, e o coeficiente da equação significativo (p<0,1), pelo teste t (Figura 23).

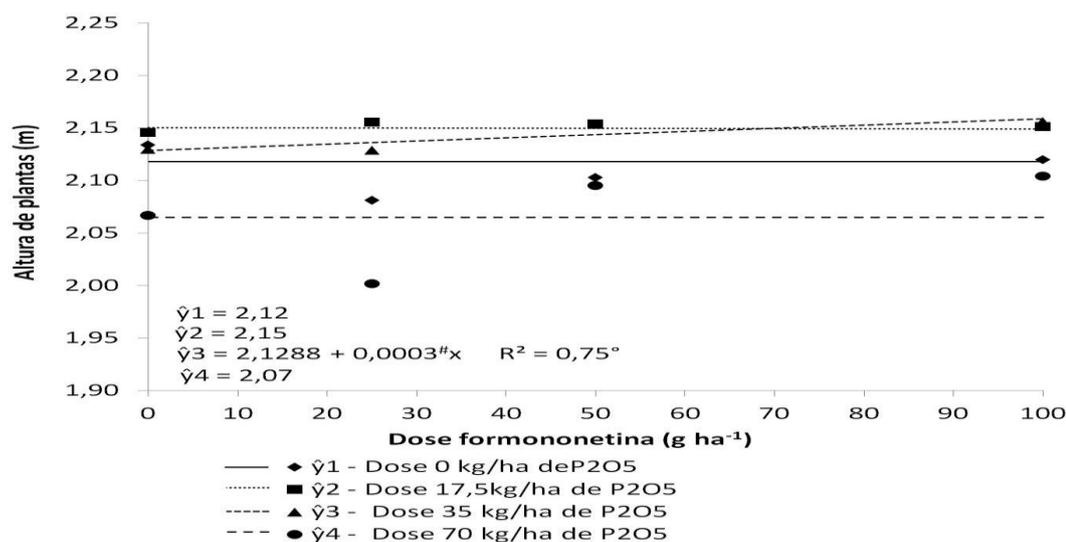


FIGURA 23. Altura de plantas de milho em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (#: Significativo a 10% de probabilidade pelo teste t. °: Significativo a 10% pelo teste F).

A formononetina acelera a micorrização favorecendo o crescimento da planta hospedeira. As micorrizas proporcionam aumento no desenvolvimento de plantas, devido a melhorias na agregação do solo, maior absorção de nutriente, maior tolerância a doenças e estresses ambientais, maior tolerância à toxicidade por nutrientes e metais pesados no solo, e alterações bioquímicas e fisiológicas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Outro fator que pode favorecer o maior crescimento de plantas de milho, quando micorrizada, é o aumento na assimilação de dióxido de carbono e, conseqüentemente, aumento da fotossíntese (GRAHAM e EISSENSTAT, 1994). Costa et al. (2002) avaliaram o milho micorrizado em solo ácido e verificaram aumento da matéria seca das raízes quando ocorreu a micorrização. O maior desenvolvimento das raízes pode proporcionar maior absorção de nutrientes e água pela planta e maior crescimento.

O número de espigas por planta de milho não foi afetado pelas doses de P₂O₅, mas foi afetado pelas doses de formononetina e pela interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina ($p < 0,01$), pelo teste F. A massa de 100 grãos foi afetada pelas doses de P₂O₅, doses de formononetina e pela interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina ($p < 0,01$), pelo teste F. A produtividade não foi afetada pelos tratamentos (Quadro 16).

QUADRO 16. Resumo da análise de variância de número espigas por planta, massa de 100 grãos e produtividade de milho

Fonte de variação	Número de espigas/planta	Massa de 100 grãos	Produtividade
Dose de P ₂ O ₅ (P)	0,912 ^{ns}	15,801 **	2,154 ^{ns}
Dose de formononetina (F)	21,821 **	9,795 **	0,366 ^{ns}
P x F	7,549 **	4,647 **	1,655 ^{ns}
CV 1 (%)	1,62	1,68	7,66
CV 2 (%)	1,50	1,92	6,53

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

O número de espigas por planta de milho aumentou com aplicação de formononetina via semente, nas doses 0 e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Em ambas as doses o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático (p<0,01), pelo teste F. Os coeficientes foram significativos em ambas às equações (p<0,01), pelo teste t. Nas doses 17,5 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve efeito da formononetina no número de espigas de milho (Figura 24). Na dose 0 kg ha⁻¹ ocorreu aumento no número de espigas de milho por planta até a dose 40 g ha⁻¹ de formononetina. Na dose 35 kg ha⁻¹ ocorreu aumento no número de espigas de milho por planta até a dose 43,18 g ha⁻¹ de formononetina.

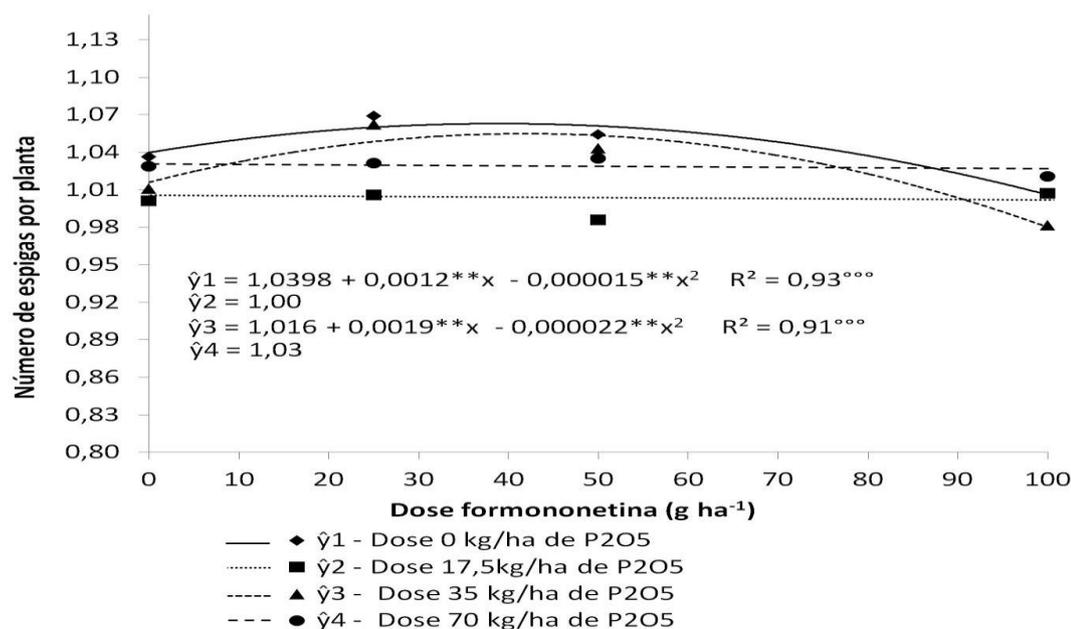


FIGURA 24. Número de espigas de milho por planta em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (**: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. °°°: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F).

O número de espigas por planta é considerado uma característica genética da planta e pouco afetada por fatores externos (SOUZA et al., 2001). Mas, alguns trabalhos mostram que ela pode ser afetada pela nutrição da planta. Sangoi e Almeida (1994) verificaram aumento no número de espigas por planta, com a aplicação de até 50 kg ha⁻¹ de nitrogênio. A formononetina é um estimulante a micorrização e, dentre os diversos benefícios das micorrizas, tem-se o aumento na absorção de nutrientes, como por exemplo, o fósforo e o nitrogênio, e uma adequada nutrição pode ter aumentado o número de espigas por planta.

A massa de 100 grãos aumentou com aplicação de formononetina via semente de soja, nas doses 0 e 35 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Para ambas as doses o modelo que melhor ajustou-se aos dados foi o quadrático (p<0,01), pelo teste F. Na dose 0 kg ha⁻¹ os coeficientes foram significativos (p<0,01), pelo teste t. Na dose 35 kg ha⁻¹ os coeficientes foram significativos (p<0,05 e p<0,01), pelo teste t. Nas doses 17,5 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ não houve efeito significativo (Figura 25). Na dose 0 kg ha⁻¹ ocorreu aumento na massa de 100 grãos até a dose 47,75 g ha⁻¹ de formononetina.

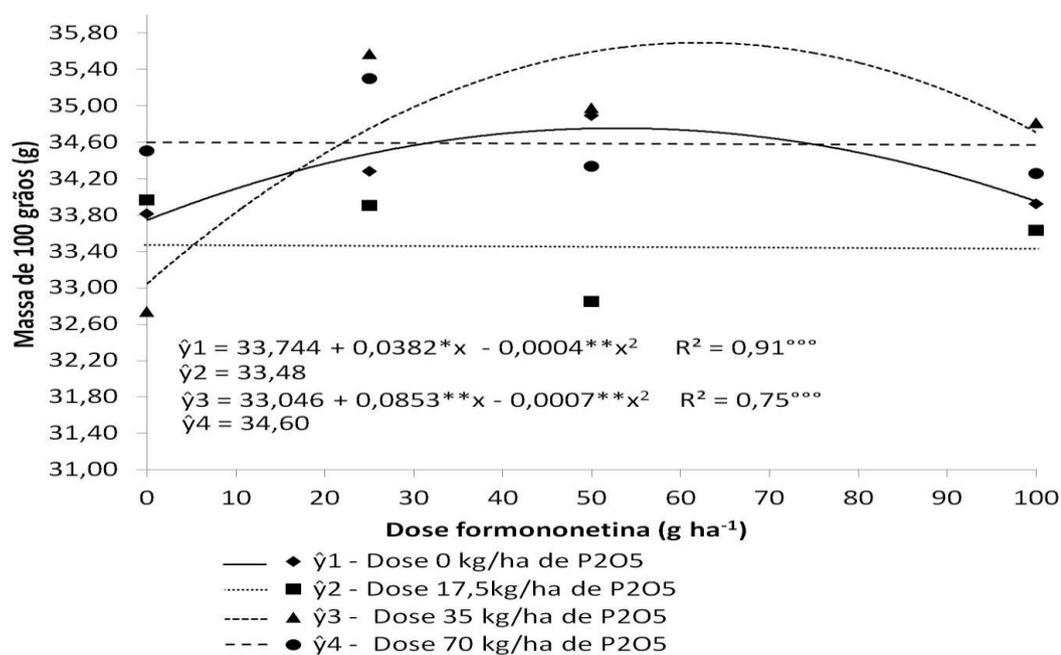


FIGURA 25. Massa de 100 grãos de milho, em função da aplicação de formononetina, dentro de cada dose de P₂O₅. (*: Significativo a 5% de probabilidade pelo teste t. **: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste t. ***: Significativo a 1% de probabilidade pelo teste F).

Bressan et al. (2002) estudaram o sorgo inoculado com *Glomus etunicatum*, doses acima de 150 mg kg⁻¹ reduziram a massa de grãos, evidenciando a importância do fósforo na resposta dos fungos micorrízicos nas duas espécies estudadas. No presente trabalho não ficou evidente o efeito de doses elevadas de fósforo na redução da massa de grãos, provavelmente as doses não foram suficientemente elevadas para causar essa redução. O fósforo é um nutriente essencial ao desenvolvimento da planta e dos grãos, pois faz parte de compostos de energia (ATP), fosfolipídios e outros ésteres (MALAVOLTA et al., 2006), necessário ao adequado desenvolvimento do sistema radicular e conseqüentemente absorção de nutriente (CRUSCIOL et al., 2005). Com isso, os benefícios da micorrização podem ter melhorado absorção de nutrientes, principalmente do fósforo.

A formononetina não proporcionou aumentos significativos na produção do milho, sendo que as produções médias foram 9443, 9645, 9524 e 9512 kg há⁻¹ para as doses 0, 25, 50 e 100 g ha⁻¹ de formononetina, respectivamente. Com isso, apesar de não haver ganhos, é possível afirmar que a aplicação do produto pode ser vantajosa economicamente, dependendo do preço da adubação fosfatada e do produto, pois não houve perdas de produção.

O número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares no solo após o cultivo do milho foi afetado significativamente para doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,01), pelo teste F, e pela interação entre doses de P₂O₅ e doses de formononetina (p<0,05), pelo teste F (Quadro 17).

QUADRO 17. Resumo da análise de variância do número de esporos no solo para a cultura do milho

Fonte de variação	Número de esporos no solo após cultivo
Dose de P ₂ O ₅ (P)	9,860 **
Dose de formononetina (F)	10,367 **
P x F	2,323 *
CV 1 (%)	6,77
CV 2 (%)	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.

Para as doses 17,5 e 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ 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 $17,5 \text{ kg ha}^{-1}$ ($p < 0,01$) e 70 kg ha^{-1} ($p < 0,05$), pelo teste t. Para as doses 0 e 35 kg ha^{-1} de P_2O_5 não houve efeito da aplicação de formononetina na esporulação (Figura 26). Na dose $17,5 \text{ kg ha}^{-1}$ ocorreu aumento na esporulação até a dose $42,8 \text{ g ha}^{-1}$ de formononetina. Na dose 70 kg ha^{-1} ocorreu aumento na esporulação até a dose 57 g ha^{-1} de formononetina.

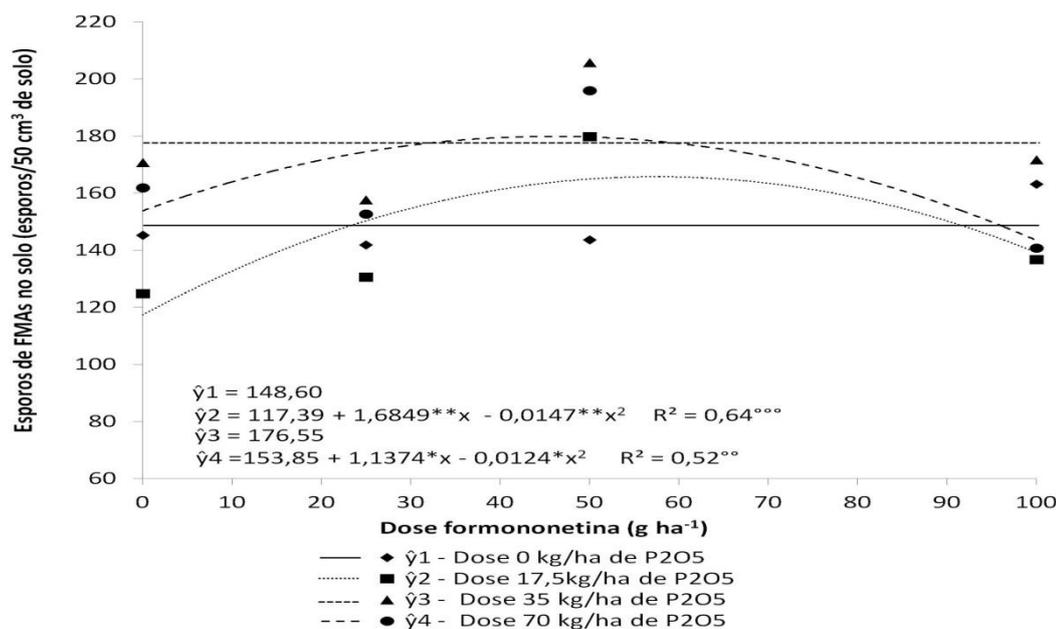


FIGURA 26. Número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no solo, após a colheita do milho, em função da aplicação de formononetina, para cada dose de P_2O_5 . (**: Significativo a 1% pelo teste t. *: Significativo a 5% pelo teste t. ooo : Significativo a 1% pelo teste F. oo : Significativo a 5% pelo teste F)

Os fungos micorrízicos arbusculares são biotróficos obrigatórios, ou seja, completam o ciclo apenas em um hospedeiro vivo, além disso, é grande a importância do aumento na esporulação, pois os glomoesporos são as principais estruturas de sobrevivência dos fungos micorrízicos arbusculares (MAIA et al., 2010). Nesse contexto, a eficiência simbiótica está relacionada com a capacidade de infecção, disseminação das micorrizas e o potencial de inóculo no solo, sendo o número de esporos no solo um dos fatores que influenciam o potencial de inóculo (CARRENHO et al., 2010). Com isso, o aumento na esporulação pode indicar uma colonização mais eficiente nas raízes das plantas.

Aumento no número de glomoesporos pela formononetina é relatado por outros autores. Davies et al. (2005), também, verificaram que a aplicação de

formononetina em seis cultivares de batatas em solos do planalto peruano promoveu aumento em mais de três vezes no número de esporos de fungos micorrízicos indígenas. Novais e Siqueira (2009) encontraram aumento na esporulação e correlação entre colonização e esporulação quando se aplicou formononetina no solo com *Brachiaria decumbens*.

CONCLUSÕES

- A aplicação de formononetina promove melhorias na esporulação de fungos micorrízicos arbusculares;
- A aplicação de formononetina aumenta o teor de nitrogênio, fósforo, e enxofre na folha de milho no estágio Vt;
- Aplicação de formononetina aumenta a massa de grãos de milho e a altura de plantas;
- Com aplicação de formononetina existe a possibilidade de redução na adubação fosfatada em milho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.L.N. **Micorrizas vesicular-arbusculares no crescimento e utilização do fósforo de solo pela braquiária e estilosantes**. 1988. 42f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – ESAL, Lavras - MG.
- ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.O.D. Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.1191-1198, 2004.
- BRESSAN, W.; SIQUEIRA, J.O.; VASCONCELLOS, C.A.; CORSETTI, A.A.P. Fungos micorrízicos e fósforo, no crescimento, nos teores de nutrientes e na produção do sorgo e soja consorciados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.315-323, 2001.
- BRESSAN, W.; VASCONCELLOS, C.A. Alterações morfológicas no sistema radicular do milho induzidas por fungos micorrízicos e fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.509-517, 2002.
- 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.
- CARDOSO, E.J.B.N.; CARDOSO, I.M.; NOGUEIRA, M.A.; BARRETA, C.R.D.M.; PAULA, A.M. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. 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. 153-214.
- CARDOSO, I.M.; BODDINGTON, C.; JANSSEN, B.H.; OENEMA, O.; KUYPER, T.W. Differential Access to phosphorus pools of an Oxisol by mycorrhizal and non-mycorrhizal maize. **Commun Soil Science Plant Analysis**, v.37, p.11-12, 2006.
- CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; DAVIDE, A.C.; JANE, L.; CURI, N.; VALE, F.R. Fungo micorrízico e superfosfato no crescimento de espécies arbóreas tropicais. **Scientia Florestalis**, v.50, p.21-36. 1996.
- CARVALHO, T.S.; MOREIRA, F.M.S. Simbioses leguminosas, fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. 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. 383-414.
- 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. **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.

COSTA, T.A.; SCHUNK, E.; PINTRO, J.C.; COSTA, S.M.G. Influência da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares da acidez do solo e de fontes de fósforo no crescimento do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v.24, p.1583-1590, 2002.

CRUSCIOL, C.A.C.; MAUAD, M.; ALVAREZ, R.C.F.; LIMA, E.V.; TIRITAN, C.S. Doses de fósforo e crescimento radicular de cultivares de arroz de terras altas. **Bragantia**, v.64, p.643-649, 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.

FENG, G.; SONG, Y.C.; LI, X.L.; CHRISTIE, P. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. **Applied Soil Ecology**, v.22, p.139-148, 2003.

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.

GRAHAM, J.H.; EISSENSTAT, D.M. Host genotype and formation and function of VA mycorrhizae. **Plant and Soil**, v.159, p.159-179, 1994.

HERNANDEZ, R.J.M.; SILVEIRA, R.I. Efeitos da saturação por bases, relações ca:mg no solo e níveis de fósforo sobre a produção de material seco e nutrição mineral do milho (*Zea mays* L.). **Scientia Agricola**, v.55, p.79-85, 1998.

JONER, E.J.; JAKOBSEN, I. Growth e extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. **Soil Biology & Biochemistry**, v.27, p.1153-1159, 1995.

JONER, E.J.; Van AERLE, I.M.; VOSATKA, M. Phosphatase activity of extra-radical arbuscular mycorrhizal hyphae. **Plant and Soil**, v.226, p.199-210, 2000.

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.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.

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.

NESS, R.L.L.; VLEK, P.L.G. Mechanism of calcium and phosphate release from hydroxyl-apatite by mycorrhizal hyphae. **Soil Science Society of America Journal**, v.64, p.949-955, 2000.

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.

O'KEEFE, D.M.; SYLVIA, D.M. Mechanisms of the vesicular-arbuscular mycorrhizal plant-growth response. IN: ARORA, D.K. et al. (ed). **Handbook of Applied Micology**. New York: M. Dekker, 1991, p.35-53.

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.)**. 1999. 40f. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SANGOI, L.; ALMEIDA, M.L. Doses e época de aplicação de nitrogênio para a cultura do milho num solo com alto teor de matéria orgânica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, p.13- 24, 1994.

SANTOS, I.P.A.; PINTO, J.C.; SIQUEIRA, J.O.; MORAIS, A.R.; SANTOS, C.L. Influencia do fósforo, micorriza e nitrogênio no conteúdo de minerais de *Brachiaria brizantha* e *Arachis pintoi*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.605-616, 2002.

SILVA JÚNIOR, J.P.; SIQUEIRA, J.O. Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.9, p.35-41, 1997.

SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N. Arbuscular mycorrhiza and kinetic parameters of phosphorus absorption by bean plants. **Scientia Agricola**, v.61, p.203-209, 2004.

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.

SOUZA, A.C.; CAVALHO, J.G.; PINHO, R.G.V.; CARVALHO, M.L.M. Parcelamento e época de aplicação de nitrogênio e seus efeitos em características agrônômicas do milho. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, p.321-329, 2001.

CONCLUSÕES GERAIS

- A aplicação de formononetina promove melhorias na esporulação de fungos micorrízicos arbusculares em soja e milho e da taxa de colonização por fungos micorrízicos arbusculares em raízes de soja;
- A aplicação de formononetina aumenta o teor de enxofre na folha de soja no estágio R2;
- A aplicação de formononetina aumenta o teor de nitrogênio, fósforo e enxofre na folha de milho no estágio Vt;
- Aplicação de formononetina aumenta o número e massa seca de nódulos nas raízes de soja no estágio R2;
- Aplicação de formononetina aumenta a massa de grãos de milho e a altura de plantas;
- Aplicação de formononetina aumenta a produtividade de grãos de soja, indicando a possibilidade de redução na adubação fosfatada;
- Com a aplicação de formononetina existe a possibilidade de redução na adubação fosfatada em milho.