



**JESSÉ VALENTIM DOS SANTOS**

**FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE  
MICORRIZAÇÃO EM MILHO**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**JESSÉ VALENTIM DOS SANTOS**

**FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE MICORRIZAÇÃO EM  
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

**LAVRAS - MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Santos, Jessé Valentim dos.

Formononetina como estimulante de micorrização em milho /  
Jessé Valentim dos Santos. – Lavras : UFLA, 2014.  
71 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.  
Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.  
Bibliografia.

1. Isoflavonóide. 2. Micorriza arbuscular. 3. *Zea mays*. 4.  
Diazotróficas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

**JESSÉ VALENTIM DOS SANTOS**

**FORMONONETINA COMO ESTIMULANTE DE MICORRIZAÇÃO EM  
MILHO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 17 de março de 2014.

Dr. Renzo Garcia Von Pinho	UFLA
Dra. Ana Rosa Ribeiro Bastos	UFLA
Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro	UFLA
Dr. Carlos Juliano Brant Albuquerque	EPAMIG

Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2014**

*Aos meus pais,  
João Batista dos Santos (in memoriam)  
&  
Fernandina Valentim dos Santos,*

**Ofereço**

*À minha filha Lara, à minha esposa Tida, aos meus irmãos, João Fernandes,  
Jeane, Pedro, Rita, Rosimeire, Jaqueline e Jaciane  
&  
sobrinhos,*

**Dedico!**

## AGRADECIMENTOS

A Deus. À UFLA, por meio do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Ao CNPq e ao MCT pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa.

À minha esposa Tida por todo apoio e companheirismo, compreendendo minhas ausências e suportando meus "estresses" durante o doutorado.

Aos amigos em Lavras, Amanda, Carol, Márcia, Thiago, Tida e Wesley pela convivência.

Aos meus amigos Paula, Márcia, Wesley, Isaac, Teo, Emanuely, Leo, André, Thiago, Carol, Jacqueline, Kize e Karina, que me ajudaram diretamente durante as análises.

Aos técnicos Manoel e Marlene pela atenção prestada durante a execução do trabalho.

Ao Professor Renzo pelo seu apoio, bem como de seus orientados, em especial ao Ivan, Adriano Delly e Leandro Cancelier, que foram imprescindíveis para a instalação e condução dos experimentos de campo.

Ao Pesquisador Carlos Juliano pelo apoio na instalação e condução do experimento em Uberlândia.

Aos Professores Renzo Garcia Von Pinho, Ana Rosa Ribeiro Bastos, Marco Aurélio Carbone Carneiro, Carlos Juliano Brant Albuquerque e Fatima Maria de Souza Moreira que compoem a banca examinadora, deram importantes contribuições para a confecção final da dissertação.

À minha orientadora Professora Fatima Maria de Souza Moreira pela oportunidade concedida.

## RESUMO GERAL

A agricultura brasileira é bastante dependente de fertilizantes fosfatados importados. Estudos têm comprovado a importância das associações micorrízicas no suprimento de fósforo(P) para as plantas, incluindo as de interesses agrícolas. O isoflavonoide formononetina é um estimulante biológico dessas associações e com forte potencial de uso na agricultura, visando à diminuição da necessidade de aplicação de fósforo ao solo. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a eficiência da formononetina (PHC-506) associada à adubação fosfatada na cultura do milho (Artigo 1) e analisar os efeitos da formononetina sobre a densidade de bactérias diazotróficas associativas (Artigo 2). Os experimentos foram conduzidos em três localidades do Estado de Minas Gerais (Lavras, Ijaci e Uberlândia). Foram avaliados os efeitos de doses (0, 25, 50 e 100 g ha<sup>-1</sup>) de PHC-506 em três níveis (0%, 50% e 100% do recomendado) de P sobre a taxa de colonização micorrízica (TCM) e sobre diferentes características agronômicas do milho (altura de planta, altura de inserção de espigas, peso de 100 grãos e produtividade de grãos). Para avaliação dos efeitos da formononetina sobre a densidade de bactérias diazotróficas, amostras do solo rizosférico de plantas de milho foram inoculadas em dois meios de culturas (FAM e NFb) semissólidos. As densidades de bactérias nos dois meios foram determinadas por estimativa do número mais provável. Pelos resultados concluiu-se que o uso da formononetina em condições de campo estimulou a taxa de colonização micorrízica e elevou a produtividade de grãos de milho cultivado em baixos níveis de fósforo. A formononetina não afetou a densidade de bactérias diazotróficas associativas em plantas de milho.

Palavras-chave: Isoflavonoide. Micorriza arbuscular. *Zea mays*. Bactérias diazotróficas .

## GENERAL ABSTRACT

Brazilian agriculture is heavily dependent on imported phosphate fertilizers. Studies have proven the importance of mycorrhizal associations to supply phosphorus (P) for plants, including agricultural interests. The isoflavonoid formononetin is a biological stimulant such associations with strong potential for use in agriculture in order to reduce the need for application of phosphorus to soil. The present study aimed to evaluate the efficiency of formononetin (PHC-506) associated with P fertilization in maize (Article 1), and analyze the effects of formononetin on the density of diazotrophic bacteria (Article 2). Experiments were conducted at three locations in the State of Minas Gerais (Lavras, Ijaci and Uberlândia). The effects of PHC-506 doses (0, 25, 50 and 100 g ha<sup>-1</sup>), in three P levels (0, 50% and 100% of recommended) on the rate of mycorrhizal colonization (TCM) and on different agronomic traits of corn (plant height, ear insertion height, 100 grain weight and grain yield) were evaluated. To assess the effects of formononetin on the density of diazotrophic bacteria in the rhizosphere of maize plants, samples were inoculated into two culture media (FAM and NFB) semisolid. The bacterial densities in both media were determined by estimating the most probable number. It was concluded that the use of formononetin in field conditions stimulates the rate of mycorrhizal colonization and increases the grain yield of maize grown in low levels of phosphorus. The formononetin did not affect the density of diazotrophic bacteria in maize plants.

Keywords: Isoflavonoid. Mycorrhiza. *Zea mays*. Associative diazotrophic bacteria.

## LISTA DE ABREVIATURAS

apr	April
aug	August
dec	December
feb	February
jun	June
jul	July
mar	March / Março
nov	November
oct	October
PROD	Produtividade
sep	September

## LISTA DE SIGLAS

AIE	Altura de Inserção da Espiga
AP	Altura de Plantas
ANDA	Associação Nacional para Difusão de Adubos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DE	Densidade de Esporos
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i> - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
FMA	Fungo Micorrízico Arbuscular
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFA	<i>International Fertilizer Industry Association</i> - Associação Internacional da Indústria de Fertilizantes
IPNI	<i>International Plant Nutrition Institute</i>
MA	Micorriza Arbuscular
MAP	<i>Monoammonium phosphate</i> - Fosfato monoamônio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MME	Ministério de Minas e Energia
NMP	Número Mais Provável
PHC	Plant Health Care
PIB	Produto Interno Bruto
TCM	Taxa de Colonização Micorrízica
UFLA	Universidade Federal de Lavras

UNFPA *United Nations Population Fund* - Fundo de População das Nações Unidas

USDA *United States Department of Agriculture* - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

## LISTA DE SÍMBOLOS

N	Nitrogênio
P	Fósforo
K	Potássio
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
Al	Alumínio
H	Hidrogênio
Fe	Ferro
m	Metro
cm <sup>-3</sup>	Centímetro cúbico
%	Porcento
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
g	Grama
mL	Mililitro
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de fósforo
PH	Potencial de Hidrogênio
mg.dm <sup>-3</sup>	Miligrama por decímetro cúbico
cmolc. dm <sup>-3</sup>	Centimol de carga por decímetro cúbico
°C	Graus Celsius
Mm	Milímetro
Kg	Quilograma
K <sub>2</sub> O	Óxido de Potássio
S	Enxofre
Ha	Hectare
P100G	Peso de 100 grãos de milho
KOH	Hidróxido de Potássio

p/v	Relação peso/volume
HCl	Ácido Clorídrico
Mn	Manganês
Zn	Zinco
SO <sub>4</sub>	Sulfato
Mo	Molibidênio
Na	Sódio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	14
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1 Perspectivas mundiais do crescimento populacional e agrícola</b> .....	17
<b>2.2 Adubação fosfatada no Brasil</b> .....	19
<b>2.3 Fungos micorrízicos arbusculares e sua importância para a nutrição das plantas</b> .....	21
<b>2.4 Estabelecimento da associação micorrízica</b> .....	24
<b>2.5 Formononetina no solo</b> .....	27
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS</b> .....	35
<b>ARTIGO 1 Formononetina incrementa a produtividade e a colonização micorrízica de milho em baixas doses de fósforo</b> .....	35
<b>ARTIGO 2 Formononetina e fósforo na densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas na rizosfera de milho</b> .....	58

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

Atualmente o Brasil é o quarto maior importador de fertilizantes do mundo, e só no ano de 2013, quase 70% dos fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos (o equivalente a 21,6 milhões de toneladas) foram provenientes de outros países (ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA, 2014). Entre as *commodities* agrícolas brasileiras, o milho é um dos principais responsáveis pelo consumo de fertilizantes.

Com o objetivo de reduzir essa dependência, o governo brasileiro, por meio do Ministério do Abastecimento Pesca e Agropecuária e Ministério de Minas e Energia, tem dado incentivos à indústria nacional com o Plano Nacional de Fertilizantes na busca por novas jazidas e ampliação da capacidade de produção de fertilizantes até o ano de 2019. Dentro desse contexto, o Ministério da Ciência e Tecnologia, atual Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação(MCTI) junto com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq lançaram, em 2009, edital para financiamento de projetos com objetivo de mobilizar e articular competências para promoção dos avanços tecnológicos para a aplicação de bactérias diazotróficas de gramíneas e fungos micorrízicos. Assim, diminuir a dependência externa em fertilizantes e promover a eficiência de uso e a economia de gastos com fertilizantes, gerando maior sustentabilidade dos agrossistemas e a competitividade do agronegócio brasileiro.

O projeto intitulado: "Biofertilizante formononetina (isoflavonoide) como estimulante de micorrização em soja e milho para aumento de produtividade associada à eficiência do uso de fertilizantes minerais" sob a liderança da Universidade Federal de Lavras foi aprovado dentro deste edital,

tendo as seguintes instituições como parceiras na execução do projeto: Universidade Federal de Goiás (UFG), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), Universidade Federal do Piauí (UFPI) e Empresa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

Cerca de 70% da produção agrícola brasileira tem origem no Cerrado, o qual é caracterizado por possuir solos com baixa fertilidade natural e alta capacidade de fixação de fósforo. Devido à facilidade do P ficar retido no solo, grandes volumes de fertilizantes fosfatados são aplicados anualmente para atender à demanda nutricional das culturas. Portanto, a necessidade de reposição constante deste nutriente para atender a produção agrícola torna o Brasil dependente da importação deste insumo. A problemática em torno do fósforo exige alternativas que tornem mais eficiente o uso dos insumos agrícolas contendo este elemento, ou até mesmo a diminuição no uso dos fertilizantes fosfatados. Uma dessas alternativas é a maximização dos benefícios da associação simbiótica entre as raízes de plantas e fungos micorrízicos arbusculares denominadas micorrizas arbusculares (MA).

Embora diversos benefícios decorram desta associação, são os nutricionais os mais consistentes e importantes. De fato, as MA podem ampliar a capacidade das plantas em absorver P em até 80%, N em 25%, K em 10%, Zn em 25% e Cu em 60% (MARSCHNER; DELL, 1994). Como maiores respostas à aplicação de MAs são obtidas com o elemento P, grande parte dos estudos realizados com foco nos benefícios nutricionais das MAs para as plantas envolve este nutriente. Portanto esta associação é considerada uma alternativa biotecnológica sustentável com grande potencial de contribuição para maximizar o uso racional do fósforo na agricultura.

Apesar dos comprovados benefícios das micorrizas arbusculares, sua exploração agrícola de maneira extensiva é limitada pela impossibilidade de se

produzir propágulos infectivos em larga escala. No entanto, o isoflavonoide formononetina, um bioestimulante da colonização micorrízica, surge como alternativa a essa limitação (SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991). A formononetina estimula o crescimento micelial do fungo nativo, que associado ao sistema radicular da planta, amplia a capacidade desta em absorver elementos essenciais, especialmente o fósforo. No entanto, para comprovar a eficácia desse isoflavonoide em promover ganhos em produtividade, são necessários estudos conduzidos em condição de campo.

Nesse contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a eficiência do uso da formononetina, associada a diferentes doses de fósforo, na cultura do milho, em experimentos de campo visando obter informações úteis, que poderão sustentar o uso da formononetina em grande escala na agricultura brasileira, buscando diminuir a adubação com fertilizantes fosfatados. Além disso, também foram estudados os efeitos da formononetina sobre a densidade de bactérias diazotróficas associativas em milho.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Perspectivas mundiais do crescimento populacional e agrícola**

O crescimento da população mundial tem elevado a demanda por alimentos e outras matérias-primas. Segundo estimativas do Fundo de População das Nações Unidas (UNITED NATIONS POPULATION FUND- UNFPA, 2011), a população mundial deve ultrapassar os nove bilhões de habitantes em 2050, elevando ainda mais a demanda global por produtos de origem agrícola.

É consenso dos órgãos governamentais, a necessidade de ampliação da capacidade mundial em suprir as necessidades atuais e futuras, especialmente por alimentos, ração, celulose, biocombustíveis e outros insumos industriais.

No período compreendido entre as décadas de 1960 e 2010, a demanda mundial por produtos agrícolas foi suprida pelo aumento da produção, do qual 23% foram devidos à expansão das fronteiras agrícolas, e a contribuição mais efetiva (acima de 70%) resultou de incrementos na produtividade física (WORLD BANK, 2011). De fato, desde a década de 1960, o consumo de fertilizantes NPK que era de cerca de 38 milhões de toneladas ultrapassou em 2012/13 a marca dos 180 milhões de toneladas (INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION - IFA, 2014). Neste mesmo período, a produção mundial de grãos passou de quase um bilhão para cerca de 2,5 bilhões de toneladas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2013). Com destaque para o Brasil, onde a agricultura avançou em cerca de 800% desde a década de 1960 quando a produção foi de 17,5 milhões de toneladas e atingiu cerca 190 milhões de toneladas no ano de 2013 (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2014a).

Atualmente o Brasil figura entre os principais produtores e exportadores agrícolas mundiais e segundo estimativas da FAO (2013) e United States Department of Agriculture - USDA (2014), o Brasil terá papel indispensável no suprimento alimentar mundial na próxima década. Portanto, a agricultura brasileira se manterá como um importante gerador de divisas para o país.

Dados divulgados pelo IBGE (2014b), relativos ao ano de 2013, mostram que o produto interno bruto (PIB) agropecuário foi de 234,6 bilhões de reais, cerca de 5% do PIB nacional. Como a agropecuária apresenta relação com outros setores da economia, como o comércio (12,7% do PIB), transporte (5,3%) e até a formação bruta de capital fixo (18%), esse efeito multiplicador dá origem ao chamado PIB do agronegócio que ultrapassou a cifra de um trilhão de reais no ano de 2013, confirmando a importância da agropecuária como um setor estratégico para a economia brasileira.

De fato, o Brasil é o maior exportador de açúcar, etanol e café do mundo, o segundo maior exportador de soja e o terceiro de milho (BRASIL, 2014). Se por um lado as perspectivas para a agricultura em termos de geração de divisas para o Brasil vislumbram uma fase de ascensão para as próximas décadas, por outro lado há gargalos que passam a fazer parte desse setor. Não obstante os problemas infraestruturais, um aspecto que tem merecido atenção constante do governo, através do Ministério do Abastecimento Pesca e Agropecuária (MAPA) é a dependência da agricultura brasileira por insumos, especialmente de fertilizantes importados.

Atualmente o Brasil é o quarto maior importador de fertilizantes do mundo e só no ano de 2013 quase 70% dos fertilizantes nitrogenados, fosfatados e potássicos, o equivalente a 21,6 milhões de toneladas foram provenientes de outros países (ANDA, 2014). No Brasil, as culturas da soja, milho, café, algodão e cana-de-açúcar são responsáveis por quase 80% do consumo de fertilizantes. Quando analisamos o consumo dos principais macronutrientes (N, P e K) em

2013, na forma de fertilizantes, associado às culturas, temos a seguinte distribuição: consumo de N: 27% pela cana-de-açúcar, 25% pelo milho, 12% pelo café e 7% algodão; consumo de P: 56% pela soja, 15% pelo milho, 7% pela cana-de-açúcar e 3% pelo café; consumo de K: 40% pela soja, 17% pela cana-de-açúcar e 6% pelo café (INTL FCSTONE, 2014).

Com o objetivo de diminuir essa dependência, o governo federal por meio do Ministério do Abastecimento Pesca e Agropecuária e do Ministério de Minas e Energia elaborou estratégias de incentivos à indústria nacional pelo Plano Nacional de Fertilizantes na busca por novas jazidas e ampliação da capacidade de produção de fertilizantes até o ano de 2019 (BRASIL, 2009). Dentro desse contexto, o Ministério da Ciência e Tecnologia, atual Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) junto com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq lançaram em 2009 um edital para financiamento de projetos com o objetivo de

mobilizar e articular competências para promover avanços tecnológicos para a aplicação de bactérias diazotróficas de gramíneas e fungos micorrízicos para diminuir a dependência externa em fertilizantes e promover a eficiência de uso e economia de gastos com fertilizantes, a sustentabilidade dos agrossistemas e a competitividade do agronegócio brasileiro (CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPQ, 2009).

## **2.2 Adubação fosfatada no Brasil**

O Brasil possui uma das maiores extensões de terras agricultáveis do mundo, grande parte dessas áreas é caracterizada por solos de baixa fertilidade, que requerem aplicação de grandes volumes de corretivos e fertilizantes, especialmente os fosfatados (AVILA et al., 2012; LOPES; GUILHERME, 1994). Nas regiões tropicais, boa parte do fósforo aplicado como fertilizante

torna-se indisponível, uma vez que tende a precipitar-se principalmente com alumínio (Al) e ferro (Fe) ou ainda pode ser adsorvido a partículas de argila ou óxidos de Fe e Al. Esse processo é conhecido como fixação do P e comumente ocorre em solos mais intemperizados, ácidos, argilosos e oxídicos (RESENDE; FURTINI NETO, 2007).

Cerca de 70% da produção agrícola brasileira tem origem no Cerrado. Esta fronteira agrícola é uma das maiores do mundo, e portanto, de suma importância para atender a demanda crescente por alimentos nas próximas décadas. No entanto, o Cerrado é caracterizado por possuir solos ácidos, altamente intemperizados com baixa fertilidade natural, além de alta saturação por alumínio e alta capacidade de fixação de P, tornando esse nutriente pouco disponível às plantas (LOPES; GUILHERME, 1994). Devido à facilidade do P ficar retido no solo, maiores volumes desse nutriente devem ser aplicados para promover sua saturação e criar um excedente que atenda a demanda nutricional das culturas (RESENDE; FURTINI NETO, 2007).

A não autossuficiência na produção de fertilizantes fosfatados, aliada à necessidade de reposição constante desses nutrientes para atender a produção agrícola tornam o Brasil dependente da importação desses insumos. Na década de 1960, o consumo de fósforo na agricultura brasileira foi de 74,2 mil toneladas, no ano de 2012/13 o volume consumido foi de quase 4,5 milhões de toneladas, desse montante cerca de 50% foi proveniente de importação (INTERNATIONAL PLANT NUTRITION INSTITUTE - IPNI, 2014).

Segundo estimativas da Associação Internacional da Indústria de Fertilizantes e da Associação Nacional para Difusão de Adubos (IFA/ANDA), a demanda por fertilizantes fosfatados no Brasil deve crescer cerca de 5% ao ano até 2019, enquanto a demanda mundial terá aumento de 3%. Essa elevação na demanda terá implicações no preço desses fertilizantes, elevando os custos de produção.

Portanto a problemática em torno do P exige alternativas que tornem mais eficiente o uso dos insumos agrícolas contendo esse elemento, ou até mesmo a diminuição no uso dos fertilizantes fosfatados. Uma dessas alternativas é a maximização dos benefícios das relações simbióticas entre as raízes de plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs).

### **2.3 Fungos micorrízicos arbusculares e sua importância para a nutrição das plantas**

Micorriza (do grego: Mykes - fungos, rhiza - raiz) é o termo que define a associação simbiótica mutualística entre as raízes de plantas e certos fungos do solo chamados fungos micorrízicos.

De acordo com o grupo de fungo que estabelece a associação e as características anatômicas da simbiose, as micorrizas são classificadas em: arbusculares, ectomicorrízicas, orquidoides, ericoides, arbutoides, monotropoides e ectendomicorrízicas. Uma segunda classificação, mais generalista, agrupa as associações, de acordo com a forma de penetração do fungo nas raízes, em ectomicorrizas e endomicorrizas. No primeiro caso, o fungo cresce intercelularmente no córtex das raízes e forma uma estrutura denominada rede de Harting, nesse tipo de associação, alterações morfológicas nas raízes são visíveis a olho nu. Nas endomicorrizas, os fungos penetram a parede celular do córtex radicular formando estruturas especializadas. Dentre as endomicorrizas, as micorrizas arbusculares (MAs) são os tipos mais comuns, ocorrendo em cerca de 70-90% das espécies de plantas terrestres (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As MAs têm recebido bastante atenção nas últimas décadas devido a sua importância para aquisição de nutrientes pelas plantas, especialmente o fósforo que é o nutriente mais limitante para a agricultura nas regiões tropicais

(SIQUEIRA et al., 2010). As MAs são formadas por fungos do solo, chamados fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pertencentes ao filo Glomeromycota, o qual se subdivide em 19 gêneros, contendo 230 espécies (STÜRMER; SIQUEIRA, 2013). Estudos de fósseis de plantas mostraram que esses fungos teriam surgido há cerca de 400 milhões de anos (TAYLOR et al., 1995). Nesse período, as plantas teriam iniciado sua adaptação ao ambiente terrestre. Por isso, tem sido hipotetizado que os FMAs teriam exercido um papel essencial durante esse processo adaptativo das plantas (PIROZYNSKI, 1981; REMY et al., 1994; SHERWOOD-PIKE, 1991; TAYLOR et al., 1995).

Durante o processo coevolutivo dos FMAs com as plantas, os fungos perderam a capacidade de crescer e produzir estruturas reprodutivas (esporos) sem estarem associados a raízes de plantas. Devido a esse aspecto, os FMAs não conseguem completar seu ciclo de vida sozinhos, sendo considerados simbiotróficos obrigatórios (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; PARNISKE, 2008; SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002; STÜRMER; SIQUEIRA, 2013). Quando a associação micorrízica arbuscular é estabelecida, o fungo ocupa o córtex radicular da planta hospedeira sem causar alterações morfológicas perceptíveis a olho nu e estende sua rede micelial para o exterior, funcionando como extensões das raízes e portanto ampliando a capacidade destas em absorver água e nutrientes (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; PARNISKE, 2008; STÜRMER; SIQUEIRA, 2013).

Observando raízes micorrizadas ao microscópio, verificam-se estruturas características típicas da associação denominada arbúsculos. Essas estruturas são os sítios de trocas de nutrientes entre os simbiontes. Os arbúsculos são formados dentro da cavidade celular e durante o seu processo de formação, invaginações na membrana do protoplasto celular são induzidas, bem como a síntese de uma nova membrana plasmática na célula hospedeira, permitindo um contato íntimo

entre o fungo e a planta (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; PARNISKE, 2008; RAMOS; MARTINS, 2010; SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002). Através dos arbúsculos, ocorre o fluxo bidirecional de nutrientes, em que parte dos nutrientes (principalmente o fósforo) e água absorvidos pelo fungo são transferidos para as raízes das plantas, enquanto carboidratos provenientes da fotossíntese são transferidos da planta para o fungo (PARNISKE, 2008; RAMOS; MARTINS, 2010; SOUZA et al., 2010).

Conforme afirmam Stürmer e Siqueira (2013), as MAs têm efeitos diretos e indiretos sobre a planta hospedeira. Segundo estes autores, embora diversos efeitos decorram desta associação, são os nutricionais os mais consistentes e importantes. De fato, a rede de hifas que se estendem para o solo, a partir das raízes podem alcançar valores superiores a 100 m por cm<sup>3</sup> de solo (MILLER; REINHARDT; JASTROW, 1995) e avançar por uma distância superior a 10 cm da superfície das raízes (LI; GEORGE; MARSCHNER, 1991) ampliando a capacidade de absorção de P em até 80 %, de N em 25%, de K em 10%, de Zn em 25% e de Cu em 60% (MARSCHNER; DELL, 1994). Embora as micorrizas ampliem a capacidade de absorção de todos os nutrientes, a importância da associação tem se dado em relação àqueles nutrientes com baixa mobilidade no solo como o P, Zn e Cu (STÜRMER; SIQUEIRA, 2013). Entre estes elementos o P é o mais requerido pelas plantas, por isto, grande parte dos estudos realizados com foco nos benefícios nutricionais das MAs para as plantas envolvem este elemento.

Portanto esta associação é considerada uma alternativa biotecnológica sustentável com grande potencial de contribuição para maximizar o uso racional do fósforo na agricultura. Uma característica importante no que se refere à possibilidade de exploração das micorrizas na agricultura é a ausência de especificidade entre os FMAs e as plantas, o que permite sua ampla utilização em diversas culturas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SIQUEIRA; LAMBAIS;

STÜRMER, 2002; STÜRMER; SIQUEIRA, 2013). Os benefícios da MA para plantas agrícolas, no entanto, não se limitam apenas ao efeito direto sobre a nutrição das plantas hospedeiras (efeito biofertilizador), mas também efeitos sobre a proteção da planta a patógenos e pragas; amenização de estresses decorrentes de contaminação por metais pesados e poluentes orgânicos; e benefícios na agregação do solo (efeito biocontrolador), além de favorecer a produção e acúmulo de metabólitos secundários e substâncias reguladoras do crescimento vegetal (efeito biocontrolador) (CARDOSO et al., 2010; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RILLIG; MUMMEY, 2006; SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002).

Embora os diversos benefícios das MAs para as plantas, incluindo-se as de interesses agrícolas sejam bem conhecidos, há limitações quanto à exploração dessa associação na agricultura extensiva (SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002; SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991). Segundo Siqueira, Lambais e Stürmer (2002), o caráter biotrófico obrigatório do fungo limita a produção de inóculos e uma alternativa para suprir esta limitação é o manejo da população de fungos indígenas, pois estes normalmente não se encontram em quantidades suficientes para colonizar as raízes precocemente em taxas adequadas para garantir benefícios nutricionais às culturas de ciclo curto como é o caso do milho.

#### **2.4 Estabelecimento da associação micorrízica**

No solo, diferentes estruturas (esporos, fragmentos de micélio, raízes colonizadas) podem servir como propágulos para estabelecimento de uma nova associação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; STÜRMER; SIQUEIRA, 2013). Normalmente os esporos germinam quando as condições de temperatura, umidade e pressão parcial de CO<sub>2</sub> são favoráveis (SIQUEIRA; LAMBAIS;

STÜRMER, 2002; STÜRMER; SIQUEIRA, 2013). As hifas crescidas a partir dos esporos e de outros propágulos sofrem ampla ramificação nas proximidades das raízes devido à presença de sinais químicos liberados pelas raízes (PARNISKE, 2008; SIQUEIRA; LAMBAIS; STÜRMER, 2002; STÜRMER; SIQUEIRA, 2013).

Em estudos com plantas de trevo (*Trifolium repens*) estressadas pela deficiência de P, Nair, Safir e Siqueira (1991) isolaram e identificaram substâncias produzidas pelas raízes dessas plantas e observaram que estas substâncias (isoflavonoides) eram ativas sobre propágulos de FMA. Posteriormente a partir de estudos *in vitro* foi demonstrado que a formononetina é o principal composto bioativo que atua estimulando o crescimento assimbiótico de esporos de FMA (BAPTISTA; SIQUEIRA, 1994; ROMERO; SIQUEIRA, 1996) e acelera a micorrização favorecendo o crescimento da planta hospedeira (SIQUEIRA; SAFIR; NAIR, 1991).

Estudando a micorrização em soja e milho estimulada pela aplicação de formononetina sintética, Silva-Júnior e Siqueira (1997) verificaram que ambas as espécies tiveram a formação micorrízica acelerada, além de aumento no número de pontos de entradas dos fungos nas raízes, na porcentagem de colonização e número de arbúsculos.

Fries, Pacovsky e Safir (1998) e Lambais, Ríos-Ruiz e Andrade (2003) também verificaram aumentos na taxa de colonização de feijão e milho estimulados pela formononetina. Aumentos de produtividade de 24% para o milho e 52% para soja estimulados pela aplicação de um produto à base de formononetina foram observados em condições de campo (SIQUEIRA et al., 1992).

Avaliando a produtividade de grãos na cultura do milho, Romero (1999) também observou aumentos de 14 a 28% na produção desta cultura, mostrando

após avaliação de custo/benefício, que o uso da formononetina sintética tem grande mercado potencial no Brasil.

Davies et al. (2005a, 2005b), em estudos realizados no Peru, verificaram aumento em mais de três vezes na densidade de esporos de fungos micorrízicos indígenas ( $6,3 \pm 1,2$  para  $19,4 \pm 1,1$  esporos  $g^{-1}$  solo) e aumentos significativos no desenvolvimento de tubérculos e no rendimento final de batatas com a aplicação de formononetina.

Mais recentemente, o produto Myconate® foi formulado pela empresa VAMTech L.L.C., na forma de sal de potássio (sal de potássio de 7-hidroxi, 4'-metoxi-isoflavona) com peso molecular 306, solúvel em água (1g em 3 mL de água), apropriados para a aplicação em larga escala, e tem se mostrado eficaz no aumento de produção de várias culturas e em vários países (<http://www.planthealthcare.com/myconate>), confirmando os resultados preliminares obtidos no Brasil.

Segundo Siqueira, Lambais e Stürmer (2002), para se obter sucesso com os produtos à base de isoflavonoide, devem ser observados vários aspectos, tais como: a cultura deve ser micotrófica e apresentar alta compatibilidade com os fungos indígenas; deve haver propágulos viáveis no solo, porém em densidade abaixo da necessária para atingir máxima colonização; as condições nutricionais ou ambientais devem impor algum grau de estresse para garantir os benefícios da melhor micorrização e a viabilidade tecnológica depende de benefícios consistentes na produtividade e/ou redução no uso de insumos, como os fertilizantes fosfatados.

Sem dúvida a relação custo benefício é um ponto chave da utilização da formononetina na agricultura. Nos últimos três anos, segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2014), a relação de troca fertilizante/produto, ou seja, a quantidade de produto agrícola necessária para adquirir uma tonelada de fertilizantes, para a cultura do milho foi de 52,2 sacas

em 2011, 53,3 sacas em 2012 e de 58 sacas em 2013. Portanto, a viabilidade econômica da aplicação da formononetina na cultura do milho, assim como em outras culturas, deve passar pela redução dos valores dessa relação.

A formulação contendo formononetina é um pó e pode ser aplicada diretamente nas semeadoras junto com as sementes no momento do plantio, dispensando operações adicionais. Segundo recomendações do fabricante da formononetina comercial, na cultura do milho seriam necessárias apenas 100g do produto formulado por hectare plantado. Ao passo que o uso de adubos fosfatados alcança dezenas ou centenas de quilogramas por hectare, exigindo maiores operações e máquinas para aplicação em grandes extensões de plantio.

## **2.5 Formononetina no solo**

Um dos fatores que gera preocupações no que se refere à utilização de novos compostos químicos em áreas agrícolas é seu impacto sobre o meio ambiente. Com a formononetina essa preocupação não é diferente. A formononetina é um composto biológico e já foi encontrado em diferentes espécies de plantas (GILDERSLEEVE et al., 1991; NAIR; SAFIR; SIQUEIRA, 1991; VOLPIN et al., 1994) e a degradação de compostos ativos biologicamente no solo tem sido reportada (DALTON, 1989; OZAN; SAFIR; NAIR, 1997).

Ozan, Safir e Nair (1997) avaliaram a persistência da formononetina no solo, além de seus efeitos sobre a microbiota, e verificaram que cerca de 60% da formononetina ainda permanecia no solo 15 dias após a aplicação, em seguida reduziu-se para 5% após três semanas em solo não autoclavado. Por outro lado, em solo autoclavado a formononetina foi totalmente recuperada. Os autores concluíram que a degradação da formononetina foi devido à microbiota presente no solo não autoclavado. De fato, nesse mesmo estudo foram observados estímulos da formononetina sobre os micro-organismos do solo.

Em relação à saúde humana, a manipulação da formononetina no uso agrícola parece não trazer grandes preocupações, uma vez que estudos recentes demonstraram crescente interesse da farmacologia por ser essa substância e seus derivados apresentarem ação anti-inflamatória, antioxidante, hipertensiva, antidiabética, antiestrogênica e antiangiogênica (MU et al., 2009; SIVESIND; SEGUIN, 2005; SUN et al., 2013; YANG et al., 2008).

## REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **Principais indicadores do setor de fertilizantes**. Disponível em: <<http://www.anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00&ver=por>>. Acesso em: 1 mar. 2014.
- ÁVILA, F. W. et al. Phosphite as phosphorus source to grain yield of common bean plants grown in soils under low or adequate phosphate availability. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 6, p. 639-648, nov./dez. 2012.
- BAPTISTA, M.J.; SIQUEIRA, J.O. Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimiótico do fungo micorrízico arbuscular *Gigaspora gigantea*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.6, n.2, p.127-134, dez. 1994.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>>. Acesso em: 28 fev. 2014.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Agrominerais oficina participativa**. Brasília, 2009. 33 p.
- CARDOSO, E. J. B. N. et al. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. p. 153-214.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Índices e insumos agrícolas relações de troca**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13\\_11\\_27\\_17\\_36\\_35\\_0602\\_relacoetroca\\_fertilizantes.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_11_27_17_36_35_0602_relacoetroca_fertilizantes.pdf)>. Acesso em: 3 mar. 2014.
- CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO. **Edital MCT/CNPq/CT-Agro nº 69/2009: microrganismos facilitadores da nutrição vegetal**. Brasília, 2009. Disponível em: <[http://www.cnpq.br/web/guest/chamadas-publicas;jsessionid=86832F3D6C436152E34E1D94E2E63415?p\\_p\\_id=resultadosportlet\\_WAR\\_resultadoscnpqportlet\\_INSTANCE\\_0ZaM&idDivulgacao=78&filtro=resultados&detalha=chamadaDetalhada&exibe=exibe&id=116-21-1001&idResultado=116-21-1001](http://www.cnpq.br/web/guest/chamadas-publicas;jsessionid=86832F3D6C436152E34E1D94E2E63415?p_p_id=resultadosportlet_WAR_resultadoscnpqportlet_INSTANCE_0ZaM&idDivulgacao=78&filtro=resultados&detalha=chamadaDetalhada&exibe=exibe&id=116-21-1001&idResultado=116-21-1001)>. Acesso em: 27 fev. 2014.

DALTON, B. R. Physicochemical processes affecting the recovery of exogenously applied ferulic acid from tropical forest soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 115, n. 1, p. 13-22, Mar. 1989.

DAVIES, F. T. et al. Influence of a flavonoid (formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 10, n. 3, p. 318-329, Oct. 2005a.

DAVIES, F. T. et al. Influence of a flavonoid indigenous to Peru and flavonoid on growth, yield and leaf elemental concentration of “Yungay” potatoes (*Solanum tuberosum* L.). **Hort Science**, Alexandria, v. 40, n. 2, p. 381-385, Apr. 2005b.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **FAO statistical yearbook 2013**. Rome, 2013. 289 p.

FRIES, L. L. M.; PACOVSKY, R. S.; SAFIR, G. R. Influence of phosphorus and formononetin on isozyme expression in the *Zea mays* – *Glomus intraradices* symbiosis. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 103, n. 2, p. 172-180, June 1998.

GILDERSLEEVE, R. R. et al. Detection of isoflavones in seedling subterranean clover. **Crop Science**, Madison, v. 31, n. 4, p. 889-892, July 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: estatística da produção agrícola**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201401.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201401.pdf)>. Acesso em: 27 fev. 2014a.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Sala de imprensa**. Disponível em: <<http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2591>>. Acesso em: 27 fev. 2014b.

INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION. **Global fertilizer trade Map 2014**. Disponível em: <<http://www.fertilizer.org/ifa/HomePage/FERTILIZERS-THE-INDUSTRY/Global-fertilizer-trade-flow-map>>. Acesso em: 1 mar. 2014.

INTERNATIONAL PLANT NUTRITION INSTITUTE. **Evolução do consumo aparente de N, P, K e Total de NPK no Brasil**. Disponível em: <<http://brasil.ipni.net/article/BRS-3132>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

INTL FCSTONE. **Consumo de Macronutrientes (NPK) deve ser de 13,054 milhões de toneladas em 2013**. Disponível em:

<[http://www.intlfcstone.com.br/content/upload/arquivos/Consumo%20de%20Fertilizantes%20no%20Brasil\(1\).pdf](http://www.intlfcstone.com.br/content/upload/arquivos/Consumo%20de%20Fertilizantes%20no%20Brasil(1).pdf)>. Acesso em: 3 mar. 2014.

LAMBAIS, M. R.; RÍOS-RUIZ, W. F.; ANDRADE, R. M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 160, n. 2, p. 421-428, Nov. 2003.

LI, X. L.; GEORGE, E.; MARSCHNER, H. Extension of the phosphorus depletion zone in VA-mycorrhizal white clover in a calcareous soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 136, n. 1, p. 41-48, Sept. 1991.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. **Solos sob cerrado: manejo da fertilidade para a produção agropecuária**. 2. ed. São Paulo: ANDA, 1994. 62 p. (Boletim Técnico, 5).

MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, The Hague, v. 159, n. 1, p. 89-102, Feb. 1994.

MILLER, R. M.; REINHARDT, D. R.; JASTROW, J. D. External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities. **O ecologia**, Berlin, v. 103, n. 1, p. 17-23 July 1995.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MU, H. et al. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover). **Phytomedicine**, Jena, v. 16, n. 4, p. 314-319, Apr. 2009.

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**, Washington, v. 57, n. 2, p. 434-439, Feb. 1991.

OZAN, A.; SAFIR, G.; NAIR, M. Persistence of isoflavonoids formononetin and biochanin A in soil and their effects on soil microbe populations. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 2, p. 247-258, Feb. 1997.

- PARNISKE, M. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 6, n. 10, p. 763-775, Oct. 2008.
- PIROZYNSKI, K. A. Interactions between fungi and plants through the ages. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, n. 10, p. 1824-1827, Oct. 1981.
- RAMOS, A. C.; MARTINS, M. A. Fisiologia de micorrizas arbusculares. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. p. 133-152.
- REMY, W. et al. Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 91, n. 25, p. 11841-11843, Dec. 1994.
- RESENDE, A. V.; FURTINI NETO, A. E. **Aspectos relacionados ao manejo da adubação fosfatada em solos do Cerrado**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2007. 32 p. (Documentos EMBRAPA, 195).
- RILLIG, M. C.; MUMMEY, D. L. Mycorrhizas and soil structure. **New Phytologist**, Cambridge, v. 171, n. 1, p. 41-53, May 2006.
- ROMERO, A. G. F. **Avaliação agronômica de formulações de isoflavonóide estimulante da micorrização no milho (*Zeamays L.*)**. 1999. 40 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.
- ROMERO, A. G. F.; SIQUEIRA, J. O. Atividade de flavonóides sobre esporos do fungo micorrízico *Gigasporagigantea* in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 7, p. 517-522, jul. 1996.
- SHERWOOD-PIKE, M. Fossils as keys to evolution in fungi. **Bio Systems**, London, v. 25, n. 1/2, p. 121-129, June 1991.
- 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**, Londrina, v. 9, n. 1, p. 35-41, abr. 1997.

SIQUEIRA, J. O. et al. Field application of the VA-mycorrhiza stimulating isoflavonoide formononetin (Rhizotropin<sup>TM</sup>) 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. 132 p.

SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. 716 p.

SIQUEIRA, J. O.; LAMBAIS, M. R.; STÜRMER, S. L. Fungos Micorrízicos Arbusculares. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 25, p. 12-21, mar. 2002.

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. Stimulation of vesicular-arbuscularmycorrhizaformationandgrowthofwhitecloverbyflavonoidcompouds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 118, n. 1, p. 87-93, May 1991.

SIVESIND, E.; SEGUIN, P. Effects of the environment, cultivar, maturity, and preservation method on red clover isoflavone concentration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 16, p. 6397-6402, Aug. 2005.

SOUZA, F. A. et al. Classificação e taxonomia de fungos micorrízicos arbusculares e sua diversidade e ocorrência no Brasil. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. p. 15-73.

STÜRMER, L. S.; SIQUEIRA, J. O. Fungos micorrízicos. In: MOREIRA, F. M. S. et al. (Ed.). **O ecossistema solo**. Lavras: UFLA, 2013. p. 291-310.

SUN, T. et al. Antihypertensive effect of formononetin through regulating the expressions of eNOS, 5-HT<sub>2A/1B</sub> receptors and  $\alpha$ 1-adrenoceptors in spontaneously rat arteries. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 699, n. 1/3, p. 241-249, Jan. 2013.

TAYLOR, T. N. et al. Fossil arbuscular mycorrhizae from the early Devonian. **Mycologia**, New York, v. 87, n. 4, p. 560-573, July 1995.

UNITED NATIONS POPULATION FUND. **Population dynamics in the least developed countries: challenges and opportunities for development and poverty reduction**. New York, 2011.38 p.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Agricultural projections**. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/publications/oce081>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

VOLPIN, H. et al. A vesicular arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradix*) induces a defense response in alfalfa roots. **Plant Physiology**, Washington, v. 104, n. 2, p. 683-689, 1994.

WORLD BANK. **Rising global interest in farmland: can it yield sustainable and equitable benefits?** Washington, 2011. 214 p.

YANG, Y. et al. Synthesis and biological evaluation of 7-O-modified. **Research Letters in Organic Chemistry**, Cairo, v. 2008, p. 1-4, Sept. 2008.

**SEGUNDA PARTE - ARTIGOS****ARTIGO 1 Formononetina incrementa a produtividade e a colonização micorrízica de milho em baixas doses de fósforo**

**Artigo formatado de acordo com as normas para submissão da Revista  
Pesquisa Agropecuária Brasileira**

Jessé Valentim dos Santos<sup>1</sup>, Paula Rose de Almeida Ribeiro<sup>1</sup>, Maria Angélica Barcelos Carneiro<sup>2</sup>, Isaac Carvalho Soares<sup>3</sup>, Ivan Vilela Andrade Fiorini<sup>4</sup>, Leandro Lopes Cancellier<sup>4</sup>, Adriano Delly Veiga<sup>5</sup>, Carlos Juliano Brant Albuquerque<sup>6</sup>, Renzo Garcia Von Pinho<sup>7</sup>, Fatima Maria de Souza Moreira<sup>7</sup>.

<sup>1</sup> Doutorando em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Lavras. js.valentim@hotmail.com, paularoseribeiro@gmail.com

<sup>2</sup> Graduanda em Agronomia. Universidade Federal de Uberlândia

<sup>3</sup> Graduanda em Agronomia. Universidade Federal de Lavras

<sup>4</sup> Doutorando em Fitotecnia. Universidade Federal de Lavras

<sup>5</sup> Pesquisador. Embrapa Cerrados

<sup>6</sup> Pesquisador. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais

<sup>7</sup> Professor(a) Associado(a). Universidade Federal de Lavras. renzo@dag.ufla.br, fmoreira@dcs.ufla.br

## RESUMO

Estudos têm comprovado a importância das associações micorrízicas no suprimento de fósforo (P) para as plantas, incluindo as de interesses agrícolas. O isoflavonoide formononetina é um estimulante biológico dessas associações e com forte potencial de uso na agricultura, visando à diminuição da necessidade de aplicação de fósforo ao solo. Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do bioestimulante formononetina, associada à adubação fosfatada, na cultura do milho. Nos anos agrícolas 2010/11 e 2011/12 em três localidades do Estado de Minas Gerais foram avaliados os efeitos da formononetina sobre a taxa de colonização micorrízica (TCM) e sobre diferentes características agronômicas do milho; para isso foram conduzidos experimentos de campo com diferentes doses de formononetina (0, 25, 50 e 100 g ha<sup>-1</sup>) associadas a três doses de fósforo correspondentes a 0, 50 e 100% do P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> recomendado a partir das análises do solo. O uso de 100 g ha<sup>-1</sup> de formononetina elevou a TCM em até 30% nas quatro primeiras semanas da cultura no nível 0 de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e em até 17% nos níveis 70 ou 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. A aplicação de formononetina (50 - 100 g ha<sup>-1</sup>) também mostrou efeitos significativos sobre as alturas de plantas e de inserção das espigas e elevou a produtividade de grãos entre 22 e 76% no nível 0 de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Os efeitos positivos da formononetina sobre a produtividade de grãos de milho foram consistentes nos dois anos de estudos. Portanto, o uso do bioestimulante formononetina reduz a necessidade de adubação fosfatada na cultura do milho.

Palavras-chave: *Zea mays*, isoflavonóide, bioestimulante, produtividade.

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura tem avançado bastante nas últimas décadas, como consequência a necessidade de aporte tecnológico que sustente esse avanço se tornou pauta importante nesse setor da economia. No Brasil, por exemplo, segundo dados governamentais, a produção agrícola aumentou em cerca de 800% entre a década de 1960 e 2010, enquanto a expansão da área cultivada foi de cerca de 20% (IBGE, 2014).

Um dos fatores que favoreceu a esse aumento foi o consumo de insumos agrícolas, principalmente, na forma de fertilizantes. Embora o Brasil possua uma das maiores extensões de terras agricultáveis do mundo, grande parte dessas áreas é caracterizada por solos de baixa fertilidade, que requerem aplicação de grandes volumes de corretivos e fertilizantes, especialmente os fosfatados (Avila et al., 2012).

Em um período de aproximadamente 50 anos, o consumo de fósforo na agricultura brasileira passou de cerca de 48 mil toneladas, na década de 1960, para quase 4,5 milhões de toneladas em 2012/13, dos quais 50,7% foi proveniente de importação (Lapido-Loureiro e Melamed, 2006; IPNI 2014). Não obstante o aumento da aplicação de fertilizantes fosfáticos, um aspecto que causa certa preocupação à agricultura brasileira, é que a demanda por este fertilizante é suprida, em grande parte, por matéria prima importada. Além disso, as reservas mundiais de rochas fosfáticas para atender a produção de fertilizantes, se forem considerados os processos de transformações atuais, serão suficientes, apenas, para os próximos 120 anos (Lopes et al., 2004).

Portanto a problemática em torno do fósforo exige alternativas que tornem mais eficiente o uso dos insumos agrícolas contendo este elemento, ou até mesmo a diminuição no uso dos fertilizantes fosfatados. Uma dessas alternativas é a maximização dos benefícios das relações simbióticas entre as

raízes de plantas e fungos micorrízicosarbusculares (FMAs). Estas simbioses são denominadas de micorrizas arbusculares e amplamente reconhecidas pelo seu efeito biofertilizante, biorregulador e bioprotetor (Gianinazzi et al., 2002; Siqueira et al., 2002; Zayed et al., 2013). Dentre os diferentes papéis desempenhados pelos FMAs, destaca-se o potencial em reduzir o uso de fertilizantes (Gemma et al., 1997; Tawaraya et al., 2012; Cozzolino et al., 2013) e amenizar os efeitos de estresses diversos (Siqueira et al., 1999; Garmendia et al., 2004; Rangel et al., 2013; Schneider et al., 2013; Zayed et al., 2013), efeito facilitador da agregação do solo e estabilização dos agregados (Bearden e Petersen, 2000; Rilling e Mummey, 2006; Graf e Frei, 2013). Esses estudos tem demonstrado que plantas micorrizadas se desenvolvem mais rapidamente, são mais bem nutridas e mais tolerantes ao déficit hídrico e estresses causados por fatores tóxicos e por doenças.

Apesar dos comprovados benefícios das micorrizas arbusculares, sua exploração agrícola de maneira extensiva é limitada pela impossibilidade de se produzir propágulos infectivos em larga escala. No entanto, o isoflavonoide formononetina, um bioestimulante da colonização micorrízica, surge como alternativa a essa limitação (Nair et al., 1991; Siqueira et al., 1991; Siqueira et al., 1992). A formononetina estimula o crescimento micelial do fungo nativo, que associado ao sistema radicular da planta, amplia a capacidade desta em absorver elementos essenciais, especialmente o fósforo (Nair et al., 1991; Siqueira et al., 1991; Siqueira et al., 1992; Silva-Júnior e Siqueira, 1997; Davies et al., 2005; Novais e Siqueira, 2009). Nesse contexto, a avaliação do uso da formononetina, associada a diferentes doses de fósforo, na cultura do milho, em experimento de campo, trará informações úteis, que poderão sustentar seu uso em grande escala na agricultura brasileira, buscando diminuir a necessidade de fertilizantes fosfatados.

Diante do exposto o presente trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência do bioestimulante formononetina, associada à adubação fosfatada, na cultura do milho.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Descrição das áreas experimentais

Todos os experimentos foram conduzidos nas cidades de Lavras, Ijaci e Uberlândia no estado de Minas Gerais, Brasil, nos anos agrícolas 2010/11 e 2011/12, totalizando cinco experimentos.

Em Lavras os experimentos foram instalados no campus da Universidade Federal de Lavras ( 21°13' 27''Sul, 44° 58'19''Oeste e 927 m de altitude). O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Distrófico e possui textura argilosa. As características químicas do solo antes da instalação do experimento foram: pH (H<sub>2</sub>O) 5,80; 4,9 mg dm<sup>-3</sup> de P (Mehlich I); 125 mg dm<sup>-3</sup> de K; 4,6 cmolc dm<sup>-3</sup> de Ca; 0,4 cmolc dm<sup>-3</sup> de Mg; 0,0 cmolc dm<sup>-3</sup> de Al; 4,0 cmolc dm<sup>-3</sup> de H+Al. Nessa área houve plantio de milho nos 10 anos anteriores.

Em Ijaci os experimentos foram instalados na fazenda experimental da UFLA (21°12' 18''Sul, 44° 58'49''Oeste e 957 m de altitude). O solo da área foi classificado como Latossolo Vermelho Amarelo e possui textura argilosa e as seguintes características químicas: pH (H<sub>2</sub>O) 6,5; 10,3 mg dm<sup>-3</sup> de P (Mehlich I); 101 mg dm<sup>-3</sup> de K; 3,8 cmolc dm<sup>-3</sup> de Ca; 1,5 cmolc dm<sup>-3</sup> de Mg; 0,0 cmolc dm<sup>-3</sup> de Al; 2,3 cmolc dm<sup>-3</sup> de H+Al. Até o ano de 2009 esta área estava coberta por pastagem (*Brachiaria spp.*), e a partir de 2009 foi cultivada com milho. O clima da região de Lavras e Ijaci é do tipo mesotérmico de inverno seco (Cwb), temperatura média anual de 19,3°C e precipitação média anual de 1.411 mm.

Em Uberlândia, o experimento foi instalado na fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), no ano 2010/11 em um Latossolo Vermelho distroférico (18°50'24" Sul e 48°14'57" Oeste e altitude de 840m), com textura argilosa e as seguintes características químicas: pH (H<sub>2</sub>O) 5,8; 1,2 mg dm<sup>-3</sup> de P (Mehlich I); 54,7 mg dm<sup>-3</sup> de K; 1,0 cmolc dm<sup>-3</sup> de Ca; 0,4 cmolc dm<sup>-3</sup> de Mg; 0,1 cmolc dm<sup>-3</sup> de Al; 2,9 cmolc dm<sup>-3</sup> de H+Al. A área onde o experimento foi instalado estava com cobertura de braquiária por aproximadamente 20 anos. O clima da região de Uberlândia na classificação de Köppen é do tipo Aw, caracterizado como tropical chuvoso, megatérmico, típico de savanas, com inverno seco. A precipitação e temperatura anuais médias são de 1.550 mm e 23,1 °C, respectivamente.

Os dados médios mensais de temperatura e precipitação nas três localidades referentes ao período de estudo são mostrados na Figura 1.

## 2.2 Delineamento e instalação dos experimentos

Todos os experimentos foram instalados em blocos casualizados, em esquema fatorial 3 x 4, sendo 3 doses de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 0, 70 e 140 kg ha<sup>-1</sup> em Lavras e Uberlândia; 0, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup> em Ijaci e 4 doses de formononetina (produto comercial PHC-506): 0, 25, 50 e 100 kg ha<sup>-1</sup>. A parcela experimental foi formada por quatro linhas de plantio com 6 metros de comprimento, espaçadas em 0,80 m, com 4 repetições (blocos). Os plantios ocorreram nos meses de dezembro dos respectivos anos de 2010 e 2011 e as colheitas nos meses de abril de 2011 e 2012.

A aplicação de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> foi realizada na forma de MAP, na formulação (10-54-00), em fundação, quando também foram aplicados 40 kg de N ha<sup>-1</sup> na forma de uréia, tomando-se o cuidado em descontar o conteúdo de N no MAP, e de 80 kg de K<sub>2</sub>O na forma de KCl. Após 30 dias foi realizada a adubação de cobertura

nas seguintes doses: 135 kg de N ha<sup>-1</sup> na forma de uréia, 90 kg de K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> na forma de KCl e 60 kg ha<sup>-1</sup> de S na forma de sulfurgram (90% de S). As adubações e sementeiras foram realizadas manualmente em dezembro de 2010.

A formononetina foi aplicada diretamente sobre as sementes antes da sementeira. Para isto as sementes foram colocadas em sacolas plásticas estéreis juntamente com as doses de formononetina, em seguida foram homogeneizadas para que houvesse uma cobertura completa da semente pelo produto. Nos dois anos estudados a cultivar de milho utilizada em Lavras e Ijaci foi a GNZ 2004, em Uberlândia foi utilizada a PIONEER® P3646H (Herculex®). Durante a condução dos experimentos foram realizadas aplicações de defensivos agrícolas para controle/prevenção de pragas e doenças e no controle de plantas daninhas conforme recomendações e práticas comumente adotadas em cada região.

### **2.3 Avaliação dos experimentos**

As seguintes avaliações foram realizadas: taxa de colonização micorrízica (TCM), altura de plantas (AP), altura de inserção das espigas (ALE), peso de 100 grãos (P100G), teores de nutrientes foliares e a produtividade de grãos de milho (PROD).

Para avaliação da TCM, em Lavras e Ijaci no ano agrícola de 2010/11, foram realizadas coletas de raízes 4 e 6 semanas após a emergência das plantas. Em Uberlândia 2010/11 e em Lavras e Ijaci nos experimentos de 2011/12 as coletas foram realizadas apenas na sexta semana após a emergência. Raízes finas de 8 plantas por parcela foram coletadas e armazenadas em sacos plásticos estéreis. No laboratório, as raízes foram lavadas individualmente e colocadas em cápsulas plásticas (1 g). Em seguida, clarificadas em solução de KOH 5% (p/v). Posteriormente as raízes foram lavadas em água corrente e agitadas por 3 a 4 minutos em HCl 1%. Em seguida as raízes foram coradas com azul de tripan em

lactoglicerol 0,05% (água: glicerol: ácido láctico, 1:1: 1) por 10 minutos. A estimativa da porcentagem de raiz colonizada foi realizada pelo método de intercessão descrito por Giovanetti & Mosse (1980).

Durante o estágio fenológico 4 (emissão do pendão) foram realizadas amostragens foliares para avaliação dos teores de nutrientes foliares, para isso, folhas oposta e abaixo da espiga de quatro plantas por parcela foram amostradas. As folhas coletadas foram armazenadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar a 70 °C até atingir peso constante, posteriormente foram moídas em moinho tipo Willey e em seguida as amostras foram analisadas quanto aos teores de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, conforme metodologia a seguir: digestão nitroperclórica para a determinação de P (colorimetria), K (fotometria de chama), Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn (espectrofotometria de absorção atômica), segundo metodologia descrita por Malavolta et al. (1997), enquanto os teores de N foram determinados pelo método de Kjeldahl.

As alturas das plantas e da inserção foram avaliadas durante o estágio fenológico 6 (~10 semanas após emergência). Ao final do ciclo do milho foram avaliados os efeitos dos tratamentos, realizando-se as seguintes determinações, tais como: estande inicial por parcela, altura das plantas, número de espigas por parcela (milho), peso de 100 grãos e produção de grãos por parcela, que foi transformado posteriormente para produtividade de grãos.

#### **2.4 Análises estatísticas**

Os dados foram submetidos a análises variância individual e conjunta envolvendo os diferentes locais e testes de média pelo teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011). Com a finalidade de se obter homocedasticidade, os dados referentes à

porcentagem de colonização micorrízica foram transformados pelo arco seno  $(x/100)^{0,5}$ . Os grãos tiveram sua umidade corrigida para 14%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância conjunta envolvendo os três locais e os dois anos de plantio mostram que a aplicação de fósforo e de formononetina afetou significativamente todas as características agronômicas avaliadas, exceto o peso de 100 grãos e teores de nutrientes foliares (dados não apresentados), (Tabela 1). As interações significativas entre fósforo x formononetina indicam que os efeitos da PHC-506 sobre a TCM, PROD, AP e AE foram dependentes da adubação fosfatada. As interações Ano x formononetina e Locais x formononetina não foram significativas ( $P < 0,01$ ) indicando que os efeitos do formononetina não foram dependentes dos locais estudados, bem como do ano de plantio.

A TCM variou de 54 a 80 % e foi influenciada significativamente pelos níveis de P em todos os locais, nos dois anos de estudos (Tabela 2 e 3). As maiores TCM ( $P < 0,01$ ) ocorreram principalmente nos níveis 0 e 70 ou 50 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, cujos valores foram ~14% superiores aos observados no nível de 140 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Essa menor TCM em níveis elevados de P ocorreu porque as plantas quando supridas nutricionalmente, especialmente em P, diminuem o estímulo à colonização micorrízica (Nogueira e Cardoso, 2007; Reis et al., 2008; Balota et al., 2012; Balzergue et al., 2013). De fato, na simbiose micorrízica a planta fornece fotoassimilados para os fungos, no entanto, quando o solo apresenta boa fertilidade, o sistema radicular da planta consegue absorver os nutrientes e água com maior facilidade, assim, indiretamente a aplicação de fósforo tende a reduzir ou inibir a colonização das raízes pelos fungos.

A formononetina elevou ( $P < 0,01$ ) a TCM em ~30% nas primeiras quatro semanas após a germinação do milho, quando utilizou-se a dose de  $100 \text{ g ha}^{-1}$  do produto associado a 0 de  $\text{P}_2\text{O}_5$  e em até 17% na presença de 70 ou  $50 \text{ kg ha}^{-1}\text{P}_2\text{O}_5$  (Tabela 2 e 3). Nas coletas realizadas seis semanas pós emergência houve efeito significativo ( $P < 0,01$ ) da formononetina apenas no nível 70 ou  $50 \text{ kg ha}^{-1}\text{P}_2\text{O}_5$ , em Lavras e Ijaci em 2010 e Lavras 2011 (Tabela 2 e 3). Embora também tenham ocorrido elevações da TCM em Uberlândia 2010 e em Ijaci 2011, com o aumento das doses de formononetina, nos níveis 0 e 70 ou  $50 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , este efeito não foi significativo (Tabela 2 e 3).

Comparando-se as coletas de raízes em 2010-1 e 2010-2 (4 e 6 semanas após a emergência), realizadas em Lavras e Ijaci, observamos aumento de 8 a 17 % na TCM neste intervalo de tempo (Tabela 3). As diferenças observadas na quarta semana em entre os níveis de formononetina em 0 e  $70 \text{ kg ha}^{-1}$ , ocorreram porque esse isoflavonóide favorece a germinação de propágulos dos FMAs antecipando o processo de estabelecimento da simbiose (Nair et al., 1991; Siqueira et al., 1991; Siqueira et al., 1992; Silva-Júnior e Siqueira, 1997; Davies et al., 2005; Novais et al., 2009), assim, quando as sementes germinam, e as primeiras raízes estão formadas, os FMAs iniciam o processo simbiótico mais cedo do que ocorre no processo natural sem o uso do formononetina.

Os resultados evidenciam que no período de seis semanas após a germinação esses efeitos relativos ao tempo de ocupação das raízes tendem a diminuir. Isto ocorre porque as raízes das plantas que receberam o estímulo da formononetina, após 4 semanas já se encontrava com uma TCM elevada (de ~67 a 77% (Tabela 3). Por outro lado, após esse período as plantas que não foram estimuladas pela formononetina, passam a ter suas raízes ocupadas gradativamente, alcançando valores próximos aos apresentados pelas plantas cujas sementes foram tratadas com o formononetina (Tabela 3).

Essa diferença no tempo de ocupação dos sítios da simbiose pode ser um dos pontos-chaves do benefício da formononetina para as plantas de milho. Assim as plantas com maior colonização radicular nos primeiros estádios, possuem maior capacidade de exploração e portanto de absorção de nutrientes e água, comparativamente a plantas com menor TCM. Contudo, esses efeitos foram mais perceptíveis em condições de baixa disponibilidade de P, corroborando com relatos de outros autores (Nogueira e Cardoso, 2007; Balota et al., 2012; Balzergue et al., 2013).

As contribuições das micorrizas para as plantas em condições estressantes são bem conhecidas, e não estão limitadas apenas a condição de baixa disponibilidade de P, mas também a outras situações, tais como baixa umidade, solos salinos e até mesmo contaminados por metais pesados ou elementos-traços (Siqueira et al., 1999; García e Mendonza, 2007; Rangel et al., 2013; Schneider et al., 2013). Esta é uma informação relevante pois os benefícios da formononetina como estimulante da micorrização não ficam restritos apenas a finalidades agrícolas, podendo ser utilizada para ampliar os benefícios da simbiose em plantas durante os processos de recuperação de áreas degradadas ou contaminadas.

No nível 0 de  $P_2O_5$  houve efeito da adição de formononetina sobre a produtividade de grãos de milho, em Lavras 2010 e 2011 e em Ijaci 2010, sobre a altura de plantas em Lavras e Ijaci em 2011 e altura de inserção de espigas em Ijaci 2011 (Tabela 4).

A aplicação de doses de 50 e 100 g  $ha^{-1}$  de formononetina em sementes de milho elevou a produtividade de grãos entre 22 - 76 %, no nível 0 de  $P_2O_5$ , comparando com a dose 0 de formononetina (Tabela 5). Nestas condições, a produtividade elevou-se em média de cerca de  $\sim 3200$  para  $5600$  kg  $ha^{-1}$  em Lavras 2010/11, de  $\sim 4300$  para  $7100$  kg  $ha^{-1}$  em Lavras 2011/12, de  $\sim 4300$  para  $5600$  kg  $ha^{-1}$  em Ijaci 2010/11 e de  $\sim 5900$  para  $7300$  kg  $ha^{-1}$  em Ijaci 2011/12. A

produtividade média alcançada, nestas condições, foram tão elevadas quanto aquelas obtidas quando o solo foi adubado com 50 ou 100% do P recomendado. Neste caso, em que há maior disponibilidade de P a formononetina tem seu efeito reduzido ou inibido (Tabela 5). De fato, a formononetina age diretamente sobre os propágulos de FMAs presentes no solo, estimulando-os durante o processo de infecção das raízes das plantas. No entanto, esse efeito é controlado pela planta, a qual tende a dispensar o fungo, quando se encontra bem suprida em fósforo.

Estes resultados evidenciam a importância da aplicação do isoflavonoide em baixa disponibilidade de fósforo. Siqueira et al. (2002) relataram que, em parte, para se obter sucesso com produtos a base de isoflavonóides, condições nutricionais ou ambientais devem impor algum grau de estresse sob a cultura em questão. De fato, o isoflavonoide formononetina foi isolado e identificado em plantas de trevo (*Trifolium repens*) estressadas pela deficiência de fósforo (Nair et al., 1991; Siqueira et al., 1991). Em condições de elevada disponibilidade de fósforo a planta dispensa a contribuição dos fungos micorrízicos do solo, conseqüentemente, o papel da formononetina se torna bastante reduzido ou até mesmo inexistente.

Destacamos que o fato de o uso da formononetina não promover elevação da produtividade de grãos, tanto quanto as obtidas pela adição de grandes volumes de adubos fosfatados, não inviabiliza seu uso. Uma vez que é necessário embutir os custos com transporte e aplicação dos adubos. A formononetina é um pó e pode ser aplicada diretamente nas "plantadeiras" junto com as sementes no momento do plantio, dispensando operações adicionais. Além disso, poucos gramas (50-100g) do formononetina são aplicados por hectare, ao passo que o uso de adubos fosfatados alcança dezenas ou centenas de quilogramas, exigindo maiores operações e máquinas para aplicação em grandes extensões de plantio.

Outro aspecto relevante, é que no Brasil a produtividade de grãos de milho é bastante variável entre as regiões do país. Enquanto nas Regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste a produtividade média em 2013 foi de cerca de 5.700 kg.ha<sup>-1</sup>, nas Regiões Norte e Nordeste a produtividade fica abaixo dos 2.800 kg.ha<sup>-1</sup>, incluindo-se alguns estados onde a produtividade ficou abaixo dos 1.000 kg.ha<sup>-1</sup> (IBGE, 2014). Essas discrepâncias estão relacionadas ao nível tecnológico utilizado em cada região. Os resultados obtidos neste trabalho indicam respostas positivas da formononetina na ausência de aplicação de P.

#### **4 CONCLUSÃO**

O uso da formononetina em condições de campo estimula a taxa de colonização micorrízica e elevou a produtividade de grãos de milho cultivado em baixos níveis de fósforo.

Os efeitos da formononetina foram consistentes em dois anos de avaliação de cultivo de milho e em diferentes localidades.

O uso do bioestimulante formononetina pode reduzir a necessidade de adubação fosfatada na cultura do milho.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e ao Ministério de Ciência e Tecnologia pelo apoio financeiro (MCT/CNPq/Ct-AGRO, Processo: 559120/2009-5 Edital: 69/2009), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -CAPES pela concessão de bolsa ao segundo autor ao Setor de Agrometeorologia da UFLA pelos dados meteorológicos e a EPAMIG pelo apoio à instalação do experimento em Uberlândia. Agradecemos também ao CNPq pelas concessões

de bolsas em produtividade à Fatima Maria de Souza Moreira e Renzo Garcia Von Pinho.

### **Referências Bibliográficas**

AVILA FW, FAQUIN V, SILVA DRG, BASTOS CEA, OLIVEIRA NP, SOARES DA (2012) Phosphite as phosphorus source to grain yield of common bean plants grown in soils under low or adequate phosphate availability. *Ciêncagrotec* 36:639-648

BALOTA EL, MACHINESKI O, SCHERER, A (2012) Mycorrhizal effectiveness on physic nut as influenced by phosphate fertilization levels. *Rev Bras Ciênc Solo* 36:23-32

BALZERGUE C, CHABAUD M, BARKER DG, BÉCARD G, ROCHANGE SF (2013) High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. *Front Plant Sci* 4 (article 426):1-15

BEARDEN BN, PETERSEN L (2000) Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on soil structure and aggregate stability of a vertisol. *Plant Soil* 218:173–183

COZZOLINO V, DI MEO V, PICCOLO A (2013) Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. *J Geochem Explor* 129:40–44

DAVIES JR FT, CALDERÓN CM, HUAMAN Z, GÓMEZ R(2005) Influence of a flavonoid (formononetin) on mycorrhizal activity and potato crop productivity in the highlands of Peru *SciHortic* 106: 318–329

FERREIRA DF (2011) Sisvar a computer statistical analysis system. *Cienc Agrotec* 35:1039–1042

GARCÍA IV, MENDOZA RE (2007) Arbuscular mycorrhizal fungi and plant symbiosis in a saline-sodic soil. *Mycorrhiza* 17:167–174

GARMENDIA I, GOICOECHEA N, AGUIREOLEA J (2004) Effectiveness of three *Glomus* species in protecting pepper (*Capsicum annuum* L.) against verticillium wilt Biol. Control, 31:296–305

GEMMA JN, KOSKE RE, ROBERTS EM (1997) Mycorrhizal fungi improve drought resistance in creeping bentgrass. J Turfgrass Sci 73:15-29

GIANINAZZI S, SCHÜEPP H, BAREA JM, HASELWANDTER K(2002) Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag. 296p

GIOVANNETTI M, MOSSE B (1980) An evaluation of techniques for measure vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol 84:482-500

GRAF F, FREI M. (2013) Soil aggregate stability related to soil density, root length, and mycorrhiza using site-specific *Alnusincana* and *Melanogaster variegatus*.l. Ecol Eng 57:314-323

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201401.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201401.pdf)>. Acesso em: 27 fev 2014.

INTERNATIONAL PLANT NUTRITION INSTITUTE. Disponível em <<http://brasil.ipni.net/article/BRS-3132>>. Acesso em: 20 fev. 2014.

LAPIDO-LOUREIRO FEV, MELAMED R (2006) O fósforo na agricultura brasileira: uma Abordagem Mínero-Metalúrgica, Centro de Tecnologia Mineral, Rio de Janeiro.

LOPES, AS, SILVA CAP, BASTOS ARR (2004) 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.

MALAVOLTA, E., VITTI GC, OLIVEIRA AS (1997) Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. POTAFOS, Piracicaba.

NAIR MG, SAFIR GN, SIQUEIRA JO (1991) Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. Appl Environ Microb 57:434-439.

NOGUEIRA MA, CARDOSO EJBN (2007) Phosphorus availability changes the internal and external endomycorrhizal colonization and affects symbiotic effectiveness. *Sci. agric.*64:295-300.

NOVAIS CB, SIQUEIRA JO (2009) Formononetin application on colonization and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi in *Brachiaria* Pesq agropecbras 44:496-502 (Abstract in English).

RANGEL WM, SCHNEIDER J, COSTA ETS, SOARES CRFS, .  
GUILHERME LRG, MOREIRA FMS (2013) Phytoprotective effect of arbuscular mycorrhizal fungi species against arsenic toxicity in tropical leguminous species. *Int J Phytorem* 16:840-858.

REIS EF, CARNEIRO MAC, SAGGIN-JÚNIOR OJ, ROTTA DA, SOUSA MY (2008) Phosphorus absorption in twelve corn genotypes inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus in cerrado soil. *Cienc. Rural* 38:2441-2447 (In Portuguese, abstract in English).

RILLIG MC, MUMMEY DL (2006) Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol* 171:41-53.

SCHNEIDER J, LABORY CRG, RANGEL WM, ALVES E, GUILHERME LRG (2013) Anatomy and ultrastructure alterations of *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculated with mycorrhizal fungi in response to arsenic-contaminated soil. *J Hazard Mater* 262: 1245-1258.

SILVA-JÚNIOR JP, SIQUEIRA JO (1997) Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e na soja. *Rev Bras Fisiol Veg* 9:35-41.

SIQUEIRA, J. O. et al. Field application of the VA-mycorrhiza stimulating isoflavonoid formononetin (Rhizotropin<sup>TM</sup>) 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 JO, LAMBAIS, MR, STÜRMER SL (2002) Fungos micorrízicosarbusculares: características, associação simbiótica e aplicação na agricultura. *Biotechn Ciên Desenv* 25:12-21.

SIQUEIRA JO, PEREIRA MAM, SIMÃO JBP, MOREIRA FMS (1999) Effect of formononetin (7 hydroxy 4' methoxy isoflavona) on mycorrhizal colonization and growth of corn in soil with excess of heavy metals. Rev Bras Ciên Solo 23: 571-577.

SIQUEIRA JO, SAFIR GR, NAIR MG (1991) Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. New Phytol 118:87-93.

TAWARAYA K, HIROSE R, WAGATSUMA T (2012) Inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi can substantially reduce phosphate fertilizer application to *Allium fistulosum* L. and achieve marketable yield under field condition. Biol Fertile Soils 48:839-843.

ZAYED MS, HASSANEIN MKK, ESA NH, ABDALLAH MMF (2013) Productivity of pepper crop (*Capsicum annuum* L.) as affected by organic fertilizer, soil solarization, and endomycorrhizae. Ann Agr Sci 58:131–137.

**(VERSÃO PRELIMINAR)**

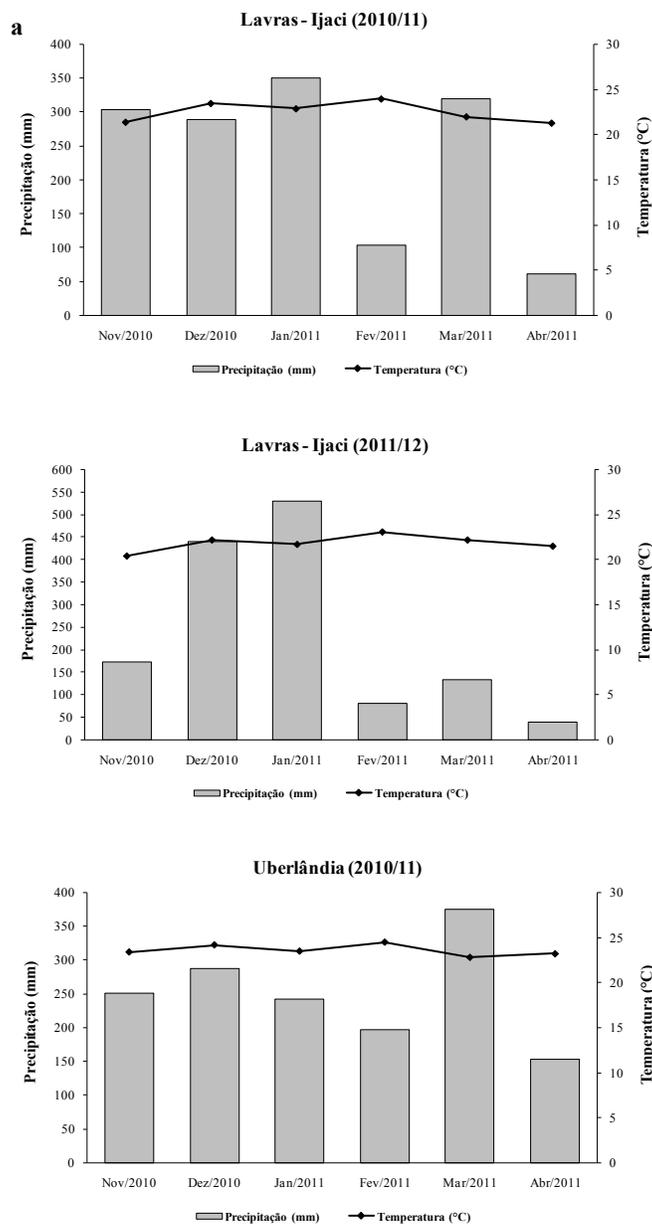


Figura 1 - Precipitação e temperatura média da região de Lavras e Ijaci entre Novembro a abril de 2010/11 (a) e de 2011/12 (b) e da região de Uberlândia em 2010/11

Tabela 1 - Resumo da análise de variância conjunta envolvendo os dois anos e os três locais de cultivo de milho, para taxa de colonização micorrízica (TCM) e as características agrônômicas de produtividade (PROD), alturas de plantas (AP) e espigas (AE).

Fonte de Variação	GL	QM			
		TCM	PROD	AP	AE
Ano	1	122,76*	37106641,16**	0,06ns	0,09**
Local	2	188,32**	3679899,27*	2,71**	0,01ns
P	2	2422,06**	56223245,08**	0,94**	0,46**
PHC-506	3	147,58**	7859131,12**	0,15**	0,06**
Ano x PHC-506	3	2,48 <sup>ns</sup>	967542,82 <sup>ns</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>
Local x PHC-506	4	33,34 <sup>ns</sup>	595642,98 <sup>ns</sup>	0,004 <sup>ns</sup>	0,001 <sup>ns</sup>
P x PHC-506	6	96,55**	9998343,02**	0,19**	0,08**
Erro	189 (191)	20,82	1606637,75	0,026	0,01
Média		69,36	6261,20	1,94	1,00
CV		6,58	20,24	8,33	10,36

\*\* , \* e <sup>ns</sup> - significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente pelo teste F

Tabela 2- Resumo da análise de variância individual para cada local de cultivo de milho, para taxa de colonização micorrízica (TCM).

Característica	Fonte de Variação	Lavras			Ijaci			Uberlândia
		2010-1 <sup>a</sup>	2010-2 <sup>b</sup>	2011 <sup>b</sup>	2010-1 <sup>a</sup>	2010-2 <sup>b</sup>	2011 <sup>b</sup>	2010 <sup>b</sup>
TCM	Fósforo (F)	**	**	**	**	**	**	**
	PHC-506	**	**	**	**	**	ns	ns
	F x PHC-506	**	ns	**	**	ns	ns	**
	CV	5,25	6,25	3,96	5,27	6,85	5,06	4,39

<sup>a</sup> - 4 semanas pós emergência, <sup>b</sup> - 6 semanas pós emergência; \*\*, \* e <sup>ns</sup> - significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente pelo teste Scott-Knott

Tabela 3- Taxa de colonização micorrízica em plantas de milho cultivadas em diferentes doses de PHC-506 associada a três níveis de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, no estado de Minas gerais nos anos agrícolas 2010/11 e 2011/12

Fósforo (kg ha <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	PHC-506 (g ha <sup>-1</sup> )	Lavras			Ijaci			Uberlândia
		2010-1 <sup>b</sup>	2010-2 <sup>c</sup>	2011 <sup>c</sup>	2010-1 <sup>b</sup>	2010 <sup>c</sup>	2011 <sup>c</sup>	2010 <sup>c</sup>
0	0	59,5 c	68,9 a	77,0 a	58,8 c	69,6 a	74,0 a	68,6 a
	25	64,0 b	72,7 a	79,1 a	61,8 c	74,9 a	76,9 a	69,1 a
	50	68,1 b	73,4 a	78,5 a	70,3 b	76,4 a	77,5 a	66,9 a
	100	76,9 a	77,3 a	80,5 a	76,2 a	77,8 a	79,3 a	71,7 a
	Média	67,1 A	73,3 A	78,8 A	66,8 A	74,6 A	76,9 A	69,1 A
70 ou 50	0	64,5 b	68,7 b	64,4 b	60,2 b	68,6 b	68,1a	66,2 a
	25	63,0 b	67,0 b	64,8 b	62,7 b	68,8 b	68,4a	67,9 a
	50	67,4 a	73,1 a	75,6 a	67,0 a	75,6 a	70,3a	71,0 a
	100	71,6 a	75,8 a	79,1 a	71,6 a	76,2 a	72,6a	71,2 a
	Média	66,6 A	71,1 A	71,0 B	65,4 A	72,3 A	70,0 B	69,1 A
140 ou 100	0	56,8 a	64,9 a	59,5 a	56,1 a	61,5 a	66,5 a	66,1a
	25	56,6 a	66,4 a	60,2 a	57,5 a	60,8 a	66,7 a	67,5a
	50	54,6 a	66,9 a	56,5 a	54,3 a	64,0 a	67,7 a	67,7a
	100	57,1 a	66,6 a	58,5 a	54,9 a	63,0 a	64,0 a	66,8a
	Média	56,3 B	66,2 B	58,7C	55,7 B	62,3 B	66,2 C	67,0 A

<sup>a</sup>- 70 kg ha<sup>-1</sup> em Lavras e Uberlândia e 50 kg ha<sup>-1</sup> em Ijaci; <sup>b</sup>- 4 semanas pós emergência, <sup>c</sup>- 6 semanas pós emergência; Letras minúsculas comparam TCM dentro de PHC, letras maiúsculas comparam médias de TCM nos níveis de fósforo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Tabela 4- Resumo da análise de variância individual para cada local de cultivo de milho, para altura de plantas (AP), altura de inserção de espigas (AE) e produtividade de grãos de milho.

Características	Fonte de Variação	Lavras		Ijaci		Uberlândia
		2010	2011	2010	2011	2010
Altura de Planta	Fósforo	***	***	***	***	NA
	PHC-506	ns	**	ns	***	
	F x PHC-506	**	***	ns	**	
	CV	10,15	6,92	6,45	4,93	
Altura de inserção de espiga	Fósforo	***	***	***	***	NA
	PHC-506	ns	ns	ns	***	
	F x PHC-506	***	***	ns	***	
	CV	8,28	10,40	8,75	6,91	
Produtividade	Fósforo	***	***	***	***	***
	PHC-506	**	***	***	ns	ns
	F x PHC-506	***	***	*	ns	**
	CV	13,02	12,01	13,43	13,85	20,54

\*\*\*, \*\* e <sup>ns</sup> - significativo a 1%, 5% e não significativo, respectivamente pelo teste Scott-Knott

Tabela 5- Produtividade de grãos de milho em experimento de campo com diferentes doses de PHC-506 associada a três níveis de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, no estado de Minas gerais nos anos agrícolas 2010/11 e 2011/12

Fósforo (kg ha <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	PHC-506	Lavras		Ijaci		Uberlândia	Média
		2010/11	2011/12	2010/11	2011/12	2010 <sup>b</sup>	
0	0	3472b	4160c	4272b	6322b	3918a	4429b
	25	2869b	4554c	4443b	5567b	3778a	4242b
	50	5853a	7699a	5493a	6954a	5283a	6256a
	100	5354a	6573b	5647a	7590a	6462a	6325a
	Média	4387C	5747B	4964B	6608B	4860B	5313,2
70 ou 50	0	7441a	7033a	5005a	7163a	6619a	6652a
	25	7934a	6328a	5271a	7468a	5612a	6523a
	50	7067a	6576a	5663a	7917a	5834a	6611a
	100	7098a	6326a	5551a	6497a	6915a	6477a
	Média	7385A	6565A	5373B	7261A	6245A	6565,8
140 ou 100	0	5786a	6057b	5423b	7652a	8935a	6771b
	25	6579a	6403b	6248a	7957a	8438a	7125a
	50	4206b	5996b	5071b	7865a	9417a	6511b
	100	6913a	7435a	6745a	7741a	7224a	7212a
	Média	5871B	6473A	5872A	7804A	8504A	6904,8

<sup>a</sup> - 70 kg ha<sup>-1</sup> em Lavras e Uberlândia e 50 kg ha<sup>-1</sup> em Ijaci; Letras minúsculas comparam TCM dentro de PHC, letras maiúsculas comparam médias de TCM nos níveis de fósforo pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

**ARTIGO 2 Formononetina e fósforo na densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas na rizosfera de milho**

**Artigo formatado de acordo com as normas para submissão da Revista  
Pesquisa Agropecuária Brasileira**

Jessé Valentim dos Santos, Paula Rose de Almeida Ribeiro, Emanuely Silva Assis, Bruna Mayrinck de Freitas, Isaac Carvalho Soares, Fatima Maria de Souza Moreira

**Jessé Valentim dos Santos, Paula Rose de Almeida Ribeiro**

Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil

**Emanuely Silva Assis, Bruna Mayrinck de Freitas**

Ciências Biológicas pela UFLA

**Isaac Carvalho Soares**

Ciências Biológicas pela UFLA

**Fatima Maria de Souza Moreira\***

Setor de Biologia, Microbiologia e Processos Biológicos, Departamento de Ciência do solo, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil  
Email: fmoreira@dcs.ufla.br

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de formononetina e de fósforo sobre a densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas na rizosfera de plantas de milho, em experimento de campo com diferentes doses de formononetina (0, 25, 50 e 100 g ha<sup>-1</sup>) associadas a três doses de fósforo correspondentes a 0, 50 e 100% do P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> recomendado a partir da análise do solo. A densidade de bactérias foi determinada por meio do método do número mais provável (NMP) a partir da presença ou ausência de película formada próxima à superfície em dois meios de cultura (FAM e NFb) após 15 dias de incubação a 28°C. Houve crescimento bacteriano com formação de películas nos dois meios. Os números de bactérias variaram de 4,5 x 10<sup>2</sup> a 5,7 x 10<sup>3</sup> no meio FAM, e de 3,6 x 10<sup>3</sup> a 4,8 x 10<sup>4</sup> no meio NFb, ambos foram considerados baixos. As doses de formononetina avaliadas não mostraram efeitos sobre a densidade de bactérias diazotróficas associativas em milho cultivado sob diferentes níveis de fósforo.

Palavras-chave: Isoflavonóide, bactérias diazotróficas, fixação biológica.

## 1. INTRODUÇÃO

De todos os organismos conhecidos apenas uma parcela do grupo dos procariotos são capazes de reduzir enzimaticamente o  $N_2$  à amônia, a qual pode ser utilizada para o seu metabolismo (Moreira e Siqueira, 2006; Moreira et al., 2010). Os organismos capazes de realizar esse processo possuem a enzima nitrogenase, responsável pela redução do  $N_2$  e são denominados de diazotróficos e o processo biológico de conversão de  $N_2$  à amônia por esses organismos recebe o nome de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Moreira e Siqueira, 2006).

Estudos relacionados com a fixação biológica de nitrogênio são de grande importância, tendo em vista a relevância desse processo para o fornecimento de nitrogênio nos mais diversos ambientes, sejam esses ecossistemas naturais ou manejados (Moreira et al., 2010). Comparativamente a FBN realizada pelas simbioses rizóbio-leguminosas a eficiência da fixação pelas diazotróficas associativas pode ser considerada baixa (Moreira et al., 2013). No entanto, esse aspecto não é suficiente para inviabilizar possíveis usos desse grupo de diazotróficas na agricultura, pois vale ressaltar que os fertilizantes nitrogenados elevam os custos de produção, e a demanda por alimentos cresce anualmente (Moreira et al., 2010).

Estimativas têm apontado que as bactérias associativas podem gerar acréscimos entre 20 e 30 % na aquisição de N em gramíneas, incluindo-se o milho (Moreira et al., 2013). Portanto, uma redução na aplicação de fertilizantes tende a reduzir também os custos dos produtos agrícolas.

O milho é uma das culturas de grande importância agrícola para o Brasil. No entanto, os gastos com fertilizantes nessa cultura resultam em um elevado custo de produção para o agricultor. No caso dos fertilizantes nitrogenados essa cultura foi responsável pelo segundo maior consumo (~900 mil toneladas) entre as culturas agrícolas em 2013 (INTL FCSTONE, 2013).

Assim, há a necessidade de avanços em pesquisas com micro-organismos que vivem associados aos vegetais, os quais auxiliam na obtenção de nutrientes, diminuindo os custos e aumentando a produção.

A importância dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA), especialmente para o suprimento de fósforo às plantas, é bastante conhecido. A utilização do isoflavonóide formononetina estimula a associação desses fungos com as raízes de plantas e conseqüentemente amplia a capacidade de absorção de elementos essenciais, podendo resultar em ganho de produtividade (Nair et al., 1991; Siqueira et al., 1991; Siqueira et al., 1992; Silva-Júnior e Siqueira, 1997).

Assim o uso da formononetina pode reduzir a necessidade de adubação fosfatada. Vários estudos demonstraram o potencial da formononetina como insumo biológico para uso na agricultura brasileira (Siqueira et al., 1992; Silva-Júnior e Siqueira, 1997, Romero e Siqueira, 1996, Romero, 1999, Novais e Siqueira, 2009). No entanto não há relatos dos efeitos (positivos ou negativos) desse isoflavonóide sobre as bactérias associativas.

Vale ressaltar que a introdução de substâncias estimulantes na agricultura exige informações sobre seus efeitos em outros organismos, além daqueles que já são o alvo principal de sua ação. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de formononetina associada a doses de fósforo na densidade de bactérias fixadoras de nitrogênio associativas na rizosfera de milho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Experimento de campo

O experimento foi conduzido no campus da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. (21°13' 27''Sul, 44° 58'19''O este e 920 m de altitude). O solo da área é classificado como Latossolo Vermelho distrófico e possui textura argilosa. O clima da região é do tipo mesotérmico de inverno seco (Cwb), temperatura média anual de 19,3°C e precipitação média anual de 1.411 mm. Nessa área houve plantio de milho nos 10 anos anteriores. De acordo com análise de fertilidade, realizada antes da instalação do experimento, o solo apresentava pH (H<sub>2</sub>O) 5,80; 4,9 mg dm<sup>-3</sup> de P (Mehlich I); 125 mg dm<sup>-3</sup> de K; 4,6 cmolc dm<sup>-3</sup> de Ca; 0,4 cmolc dm<sup>-3</sup> de Mg; 0,0 cmolc dm<sup>-3</sup> de Al; 4,0 cmolc dm<sup>-3</sup> de H+Al.

O experimento foi instalado em blocos casualizados, com quatro repetições, em esquema fatorial 4 x 3, sendo 4 doses de formononetina (produto comercial PHC-506): 0, 25, 50 e 100 g ha<sup>-1</sup> e 3 doses de fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 0, 50% e 100% da dose recomendada a partir da análise do solo. A formononetina foi aplicada nas sementes antes da semeadura. A parcela experimental foi formada por quatro linhas de plantio, espaçadas de 0,80 m e comprimento de 6 metros. Para coleta dos dados, apenas, as duas linhas centrais foram amostradas. A cultivar utilizada foi a GNZ 2004. Os tratos culturais e fitossanitários foram realizados conforme a necessidade da cultura. As doses de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> adotadas foram: 100 % da recomendação (140 kg ha<sup>-1</sup>), 50% da recomendação (70 kg ha<sup>-1</sup>) e 0 na forma de MAP na formulação (10-54-00). Antes da instalação do experimento realizou-se adubação de fundação, quando foram aplicados 40 Kg de N ha<sup>-1</sup> na forma de uréia, tomando-se o cuidado em descontar o N contido no MAP, e de 80 Kg de K<sub>2</sub>O na forma de KCl. Após 30 dias foi realizada a adubação de

cobertura nas seguintes doses: 135 Kg de N ha<sup>-1</sup> na forma de uréia, 90 Kg de K<sub>2</sub>O ha<sup>-1</sup> na forma de KCl e 60 Kg ha<sup>-1</sup> de S na forma de sulfogram (90% de S). A semeadura foi realizada no dia 26 de novembro de 2011.

## 2.2 Amostragem do solo

Amostras compostas por solo rizosférico de quatro plantas por parcela foram coletadas. Para isso, o sistema radicular de milho foi retirado e transferido para sacos plástico e agitado para o desprendimento das partículas de solo. Posteriormente todo o volume de solo obtido foi armazenado em sacos plástico e acondicionado sob refrigeração 4°C.

## 2.3 Contagem e isolamento de bactérias diazotróficas associativas

A contagem de bactérias diazotróficas associativas foi realizada por estimativa do número mais provável. Para isto, Amostras de solo foram submetidas à diluição seriada, 10 g de solo foram transferidos para erlenmeyers contendo 90 ml de solução salina (NaCl 0,85%), os quais foram agitados por 20 minutos a 120rpm (diluição 10<sup>-1</sup>). Desta diluição, 1 ml foi transferido para tubo de ensaios contendo 9 ml da solução salina, correspondendo a diluição 10<sup>-2</sup>, esse processo foi repetido até que se obtivesse a diluição de 10<sup>-7</sup>.

Dois diferentes meios de cultura que favorecem espécies-alvo de bactérias diazotróficas foram utilizados (Moreira et al., 2013). O meio FAM cuja espécie-alvo é o *Azospirillum amazonense* (Magalhães and Döbereiner 1984): 5 g Sacarose, 0,03 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,12 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1 g NaCl, 4,0 mL e EDTA (1,64%), 1,0 mL solução de vitaminas (10 mg biotina, 20 mg piridoxol-HCl), 2,0mL solução de micronutrientes (0,04 g CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 1,20 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,40 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1,00 g Na MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 1,175 g MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O em

1000ml com água destilada), 1000 mL de água destilada, 1,75g ágar, pH 6.0. O meio NFb cujas espécies-alvo são os *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* e *A. halopraeferans*) (Döbereiner et al., 1995): 5g ácido málico, 0,6 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1g NaCl, 0,02 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 2ml solução micronutrientes, 2ml de solução de azul de bromotimol 0,5% em 0,2N KOH, 4ml Fe EDTA (1,64%), 1ml solução de vitaminas, 1000 ml com água destilada, 1,75 g de Agar, pH para 6,5 ou 6,8.

Alíquotas de 0,1 ml da diluição 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-7</sup> foram inoculadas para cinco frascos de vidro, contendo 15 ml de ambos meios de cultura semissólidos. Os frascos foram incubados a 28°C por um período de até 15 dias, observando-se a formação (positivo) ou não (negativo) de película na superfície do meio de cultura. O número de frascos positivos e negativos foram quantificados e com auxílio de tabela própria foi determinado o NMP de bactérias diazotróficas associativas.

## **2.5 Isolamento e confirmação da capacidade fixadora de N dos isolados**

Uma porção do meio de cultura, juntamente com fragmentos da película, de cada frasco positivo, foi transferida para placa de petri contendo os meios de culturas FAM e NFb sólidos. Após crescimento das colônias procedeu-se novamente a re-inoculação em meios de culturas semissólidos para confirmação da capacidade de fixar N<sub>2</sub> por meio da formação de novas películas. Isolados puros foram obtidos, posteriormente, pela repetição sucessiva da re-inoculação dos isolados em meio de cultura batata e semissólido. Esse procedimento de purificação é necessário para determinar a caracterização cultural das colônias bacterianas.

### 3. RESULTADOS

Ocorrências de bactérias diazotróficas associativas, caracterizada pela formação de películas (Figura 1) na superfície dos meios de culturas, foram observadas em todos os tratamentos para os dois meios utilizados (FAM e NFb).

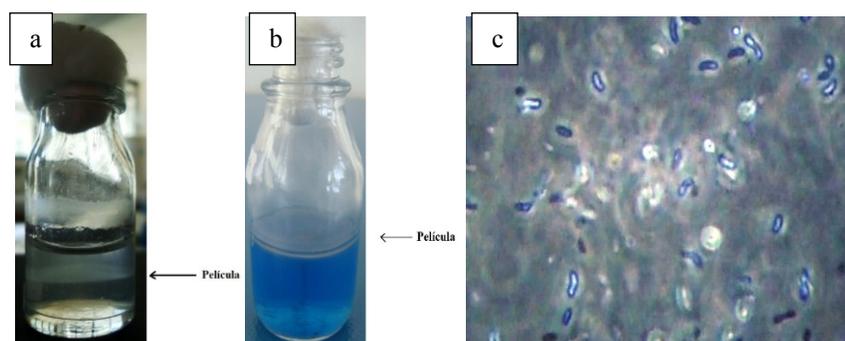


Figura 1 Bactérias diazotróficas associativas crescendo em meio semissólido (a) meio FAM - seta indicando película inicial, em fase de migração para a superfície do meio; (b) meio NFb - seta indicando a película na superfície do meio. (c) Bactérias diazotróficas vista ao microscópio óptico em aumento de 1000x.

As densidades de bactérias diazotróficas associativas em ambos os meios de culturas não foram afetadas significativamente pelos níveis de P ou de PHC-506 (Tabela 1 e Tabela 2). Os número dessas bactérias variaram de  $4,5 \times 10^2$  a  $5,7 \times 10^3$  no meio FAM, e de  $3,6 \times 10^3$  a  $4,8 \times 10^4$  no meio NFb, ambos foram considerados baixos. Valores na faixa de  $10^6 - 10^7$  células por  $g^{-1}$  de solo tem sido normalmente relatados (Döbereiner et al., 1995; Moreira et al. 2010). O número de bactérias diazotróficas no meio FAM foi superior ao observado por Lange e Moreira (2002). Estes autores avaliaram a ocorrência de *A. amazonense* em diferentes espécies vegetais, e observaram NMP de  $5 \times 10^2$  bactéria  $g^{-1}$  solo rizosférico de milho.

Tabela 1 - Resumo das análises de variância para Log de NMP de bactérias diazotróficas associativas em dois meios de culturas inoculados com solo rizosférico de milho cultivado em diferentes doses de PHC-506 associada a três níveis de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Fonte de Variação	GL	QM	
		FAM	NFb
P	2	0,1109 ns	0,2833 ns
PHC-506	3	0,2106 ns	0,2635 ns
Bloco	3	0,6790 ns	0,5072 ns
P x PHC-506	6	3292 ns	4338 ns
Erro	33	20,82	0,3429
CV		19,37	15,73

ns - não significativo, respectivamente pelo teste F

A densidade média de bactérias foi mais elevada no meio NFb (~1,3 x 10<sup>4</sup> NMP g<sup>-1</sup> de solo) comparativamente ao meio FAM (~0,2 x 10<sup>4</sup> NMP g<sup>-1</sup> de solo) (Figura 2). A densidade mais baixa verificada no meio FAM pode ser devido a maior especificidade desse meio comparativamente ao meio NFb. De fato, enquanto o meio FAM tem como espécie-alvo principal o *Azospirillum amazonense*, o meio NFb possui quatro espécies-alvo: *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. irakense* e *A. halopraeferans* (Döbereiner et al., 1995; Moreira et al., 2013), embora outras espécies de diazotróficas possam também crescer em ambos os meios (Moreira et al., 2013).

Tabela 2 - NMP de bactérias diazotróficas associativas em dois meios de culturas inoculados com solo rizosférico de milho cultivado em diferentes doses de PHC-506 associada a três níveis de  $P_2O_5$ .

Fósforo (kg ha <sup>-1</sup> )	PHC-506 (g ha <sup>-1</sup> )	FAM	NFb
<b>NNP de Bactérias g<sup>-1</sup> de solo</b>			
0	0	1,3 x 10 <sup>3</sup> ns	1,4 x 10 <sup>4</sup> ns
	25	1,7 x 10 <sup>3</sup> ns	4,1 x 10 <sup>3</sup> ns
	50	1,3 x 10 <sup>3</sup> ns	4,8 x 10 <sup>4</sup> ns
	100	1,1 x 10 <sup>3</sup> ns	4,6 x 10 <sup>3</sup> ns
70	0	1,2 x 10 <sup>3</sup> ns	9,1 x 10 <sup>3</sup> ns
	25	4,5 x 10 <sup>2</sup> ns	9,0 x 10 <sup>3</sup> ns
	50	5,7 x 10 <sup>3</sup> ns	1,3 x 10 <sup>4</sup> ns
	100	6,0 x 10 <sup>2</sup> ns	7,8 x 10 <sup>3</sup> ns
140	0	4,5 x 10 <sup>2</sup> ns	7,8 x 10 <sup>3</sup> ns
	25	2,7 x 10 <sup>3</sup> ns	3,6 x 10 <sup>3</sup> ns
	50	1,8 x 10 <sup>3</sup> ns	8,4 x 10 <sup>3</sup> ns
	100	2,2 x 10 <sup>3</sup> ns	2,8 x 10 <sup>4</sup> ns

ns - não significativo, respectivamente pelo teste F

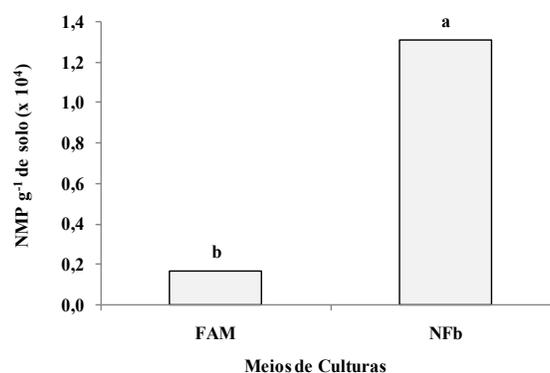


Figura 2 Densidade média de bactérias diazotróficas associativas (Número Mais Provável) em dois meios de culturas (FAM e NFb) inoculados com solo rizosférico de milho cultivado em diferentes doses de PHC-506 associada a três níveis de  $P_2O_5$ . Letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

As bactérias associativas fixadoras de N colonizam o interior ou a superfície do tecido vegetal, folhas, caules, colmos e raízes (Moreira et al., 2013). No presente estudo foi estimada a densidade das bactérias do solo da rizosfera do milho, portanto, é provável que isolamentos diretamente a partir das raízes apresentem população mais elevada. Os isolados obtidos neste estudo serão avaliados posteriormente para sua caracterização cultural e testes bioquímicos. Testes adicionais podem ampliar a possibilidade de uso de estirpes de diazotróficas associativas como promotora do crescimento vegetal. De fato, diversos estudos têm demonstrado a capacidade dessas bactérias em sintetizar fitormônios (Auxinas, giberelinas e citocininas) e compostos de baixa massa molecular capazes de quelatar íons de ferro, denominados de sideróforos. Outra característica importante também observada é a capacidade de solubilização de fosfatos (Moreira et al., 2013).

#### **4. CONCLUSÃO**

A formononetina não afeta a densidade de bactérias diazotróficas associativas em milho cultivado sob diferentes doses de fósforo.

#### **AGRADECIMENTOS**

Trabalho realizado com recursos do edital MCT/CNPq/CT-AGRO N° 69/2009: Microorganismos Facilitadores. Agradecimentos à FAPEMIG pelo apoio no congresso ao primeiro autor

### Referencias Bibliográficas

- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí, RJ : EMBRAPA-CNPAB, 1995, 60p
- EVANS, H.J.; BURRIS, R.H. Highlights in Biological Nitrogen Fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J eds. Biological Nitrogen Fixation. New York: Chapman and Hall, 1992, p.1-42.
- LANGE, A.; MOREIRA, F. M. S. Detecção de *Azospirillum Amazonense* em raízes e rizosfera de orchidaceae de outras famílias vegetais. R. Bras. Ci. Solo, 26:529-533, 2002
- MAGALHAES, F. M. M.; MOREIRA, F. M. S.; BALDANI, J. I.; SOUTO, S. M.; KUYKENDALL, J. R.; DOBERERINER, J. . A new acid tolerant *Azospirillum* species. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Brasil, v. 55, p. 417-430, 1983.
- MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F.; SILVA K. Bactérias associativas: fixadoras de nitrogênio atmosférico. In: Moreira, F. M. S. et al. **O ecossistema solo**. Lavras: UFLA, 2013. p. 341-350.
- MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K; NÓBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, v. 1, p. 74-99, 2010.

- MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2 ed. UFLA, Lavras, 2006, 729 p.
- NAIR, M. G.; SAFIR, G. N.; SIQUEIRA, J. O. Isolation and identification of vesicular- arbuscular mycorrhiza stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. Applied and Environmental Microbiology, v.57, p.434-439, 1991.
- NOVAIS, C.B.; SIQUEIRA, J.O. Aplicação de formononetina na colonização e esporulação de fungos micorrízicos em braquiária. Pesq. agropec. bras., 44: 496-502. 2009
- ROMERO, A.G.F. Avaliação agrônômica de formulações de isoflavonóide estimulante da micorrização de milho (*Zea mays* L.). 1999. 40p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- ROMERO, A. G. F.; SIQUEIRA, J. O. Atividade de flavonóides sobre esporos do fungo micorrízico *Gigaspora gigantea* in vitro. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 31(7):517-522, 1996.
- 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 TM) on corn and soybean in Brazil. In: THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MANAGEMENT OF MYCORRIZAS IN AGRICULTURE, HORTICULTURE AND FORESTRY, 1992, University of Western Australia, 1992.

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *The New Phytologist*, v.118, p.87-93, 1991.

**(VERSÃO PRELIMINAR)**