



**AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DE  
FORMULAÇÕES DE ISOFLAVONÓIDE  
ESTIMULANTE DA MICORRIZAÇÃO NO  
MILHO (*Zea mays* L.)**

**AMALIA GISELA FERSULA ROMERO**

**1999**

RECEIVED  
OFFICE OF THE  
SECRETARY OF THE ARMY

1. [illegible]  
2. [illegible]  
3. [illegible]

[illegible]  
[illegible]  
[illegible]  
[illegible]

48119  
33706 MFN

AMALIA GISELA FERSULA ROMERO

BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA  
UFLA

**AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DE FORMULAÇÕES DE  
ISOFLAVONÓIDE ESTIMULANTE DA MICORRIZAÇÃO NO  
MILHO (*Zea mays* L.).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientador:

Prof. José Oswaldo Siqueira

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

1999

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

**Fersula Romero, Amalia Gisela**

**Avaliação agronômica de formulação de isoflavonóide estimulante da  
micorrização no milho (*Zea mays* L.) / Amalia Gisela Fersula Romero. – Lavras :  
UFLA, 1999.**

**40 p. : il.**

**Orientador: José Oswaldo Siqueira.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

**1. Isoflavonóide. 2. Micorriza. 3. Milho. 4. Avaliação agronômica. 5.  
Formulação de isoflavonóide. 6. Formononetina 7. Simbiose. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título**

**CDD-631.46**

**-589.20452482**

**AMALIA GISELA FERSULA ROMERO**

**AVALIAÇÃO AGRONÔMICA DE FORMULAÇÕES DE  
ISOFLAVONÓIDE ESTIMULANTE DA MICORRIZAÇÃO NO  
MILHO (*Zea mays* L.).**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 09 de setembro de 1999

Prof. Fátima M. Souza Moreira

UFLA

Prof. Janice Guedes de Carvalho

UFLA

  
Prof. José Oswaldo Siqueira  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL

*A meu filho Edward Hildemaro Starzec Fersula e  
meu esposa Rubens Corradini Filho*

---

*OFERECO*

*A minha avó Otilia Julia Rea de Romero "yayita",  
In memoriam*

*A meus pais Eva Altagracia Romero Rea e  
Vicenzo Fersula Marzano,  
a minha tia e madrinha Amalia E. Romero Rea e  
a meus irmãos*

---

*DEDICO*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente a cada momento da minha vida.

Ao Professor José Oswaldo Siqueira, pela sua capacidade, paciência, colaboração e disposição para me orientar, por ser incentivo de superação, como também pela confiança e apoio. Minha sincera e total gratidão e admiração.

Ao professor José Maria de Lima pelo convívio, apoio técnico e coordenação das ações acadêmicas.

Aos amigos, colegas, servidores e demais professores do Departamento de Ciência do Solo, em especial ao Manoel Aparecido da Silva, pela colaboração na montagem e avaliações do experimento, como pelo convívio, total apoio e amizade ao longo deste período.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

À VAMTech L.L.C. Inc. pelo fornecimento das formulações sintéticas da formononetina e apoio financeiro para a realização deste estudo.

Aos professores Augusto Ramalho de Moraes e Mário Javier Ferrua Vivano pelas colaborações nas análises estatísticas.

Ao professor Magno Patto Ramalho e sua equipe, pelo seu incentivo e apoio durante a realização deste estudo.

Ao professor Renzo Garcia Vom Pinho pela doação das sementes e informações sobre a cultura do milho.

Aos amigos, em especial a Valeri Gabriela Schurter (*in memoriam*), Lea Rosa Schurter, Isabel Trannin, Maria Gabriela Roca Magallanes e seus familiares, Henrique Pouyu Rojas e Rogério Mellone, pelo apoio, incentivo, convívio e amizade, principalmente nas horas mais difíceis.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 As micorrizas arbusculares.....	3
2.2 Os compostos fenólicos.....	5
2.3 A cultura do milho.....	8
2.4 MAs no milho.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1 Caracterização do experimento.....	12
3.2 Avaliações.....	14
3.3 Análises estatísticas.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÕES.....	33
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

## RESUMO

FERSULA ROMERO, Amalia Gisela. **Avaliação Agronômica de Formulações de Isoflavonoide Estimulante da Micorrização no Milho (*Zea mays* L).** Lavras: UFLA, 1999.40p (Dissertação - Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas).

As micorrizas arbusculares são simbioses formadas por fungos da ordem Glomales com a maioria das espécies vegetais, tendo como benefício principal para estas maior absorção de nutrientes do solo, principalmente do fósforo. Dada a importância deste nutriente para as culturas, e os problemas de disponibilidade no solo, esta simbiose torna-se indispensável para as plantas em solos tropicais. Embora presentes na maioria dos solos e ecossistemas é necessário maximizar a atuação destes fungos nos agroecossistemas para aumentar seus benefícios para a nutrição, desenvolvimento e produção das plantas. Como a inoculação em larga escala é ainda difícil de ser praticada, a aplicação de substâncias estimulantes da micorrização, como é o caso da formononetina (7-hidroxi, 4'-metoxi isoflavona) sintética surge como uma alternativa promissora. O presente estudo tem por finalidade avaliar em condições de campo os efeitos de aplicação das formulações de formononetina (Myconate™ e Mycoform™) no desenvolvimento, nutrição e produtividade do milho. O estudo foi desenvolvido num Latossolo Roxo, de textura argilosa, na Universidade Federal de Lavras, em período compreendido entre outubro de 1998 e maio de 1999. Empregou-se milho (*Zea mays* L.), híbrido (Cargill) C333-B. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados (DBC), com 4 repetições e um total de 9 tratamentos, constando de um controle sem estimulantes e aplicações das formulações estimulantes separadamente por ocasião do plantio, na semente ou no sulco de plantio, além da mistura das duas formulações. Cada parcela foi constituída de quatro linhas de 7,5 m, espaçadas em 0,80m. Todas as plantas receberam adubação com N, K e Zn, de acordo com a recomendação analítica. As plantas apresentaram bom desenvolvimento, sendo a altura de plantas no segundo estágio fenológico (8 folhas) influenciada pela aplicação das formulações. Os teores foliares de nutrientes encontravam-se na faixa adequada, exceto os de Ca e Mg e não foram influenciados pelos tratamentos. Tanto Myconate™ como Mycoform™ aumentaram a produção de grãos com efeitos variando de 12 a 28% sobre o controle. A produtividade superou os 8.000 kg.ha<sup>-1</sup> e os estimulantes da micorrização causaram acréscimos significativos de 720 a 2.256 kg.ha<sup>-1</sup>. O uso dos estimulantes mostrou ser economicamente viável, representando ganhos líquidos para o produtor de até R\$ 255,90.ha<sup>-1</sup> (US\$ 135,00).

---

Comitê Orientador: José Oswaldo Siqueira – UFLA (Orientador) e Fatima Maria de Souza Moreira – UFLA

## ABSTRACT

FERSULA ROMERO, Amalia Gisela. **Agronomic Evaluation of Formulations of Mycorrhiza Stimulating Isoflavonoid in Corn (*Zea mays* L.)**. Lavras:UFLA, 1999. 40p (Dissertation - Master in Soil Science and Plant Nutrition)

The arbuscular mycorrhizae (AM) are root symbiosis formed by the Glomalian fungi with majority of plant species in which they have as major benefit enhancement of soil nutrient uptake, mainly phosphorus. Considering the importance of this nutrient to crop species and problems regarding P-availability in the soil, this symbiosis is very important for plant growth in tropical soils. Although the AM fungi are present in most soils and ecosystems around the world, it is necessary to maximize the activity of these fungi in agroecosystems in order to increase fungal benefits to plant nutrition, growth and productivity. Because large-scale inoculation is difficult to be practiced, application of AM-stimulating compounds such, as formononetin (4' methoxy, 7-hydroxy isoflavone) is a promising alternative. In the present study the effects of formononetin formulated products (Myconate™ and Mycoform™) on corn (*Zea mays* L.) development, mineral nutrition and grain productivity were evaluated in a field test. The study was developed in clayed oxisol (Dusky Red Latosol) at the campus of Federal University of Lavras, from October 1998 to May 1999. A hybrid (Cargill) C333-B was used in a completely randomized block design with four replicates and nine treatments. The treatments consisted of a control with no formononetin products and different rates of Myconate™ and Mycoform™ applied either on the seed, planting furrow and a mixture of both products. Experimental plots were composed of four 7.5m lines with interrow spacing of 0.80m. Plants were fertilized with N, K and Zn, according to crop recommendation. Plants exhibited good development, being plant height at the second phenological stage (8 leaf) affected by application of the AM-stimulants. Leaf nutrient contents were at adequate levels, except for Ca and Mg, and were not affected by treatments. Corn productivity was over 8,000kg.ha<sup>-1</sup> and both products enhanced grain yield with effects varying from 12 to 28% over the control. Yield effects ranged from 700 to 2,256kg.ha<sup>-1</sup>. The results showed that field application of these products is technically and economically feasible, representing addition to net income up to US\$ 135.00 ha<sup>-1</sup>.

---

Graduate Committee: José Oswaldo Siqueira- UFLA (Major Professor) and Fátima Maria de Souza Moreira-UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

Fungos da classe Zigomicota, ordem Glomales, associam-se com a maioria das espécies vegetais formando uma simbiose denominada micorriza arbuscular (MA), que é de grande importância para as plantas especialmente aquelas em ecossistemas sob estresse. Os efeitos desta associação para as plantas resultam da maior capacidade de absorção e utilização de nutrientes e de mecanismos diversos que favorecem as relações hídricas e diminuem danos causados por outros estresses abióticos e bióticos

Esta simbiose tem sido objeto de estudos e interesse acadêmico desde o final do século passado, mas somente nas últimas décadas o reconhecimento da importância funcional e ecológica tornou-se bastante evidente. Nos trópicos as MAs ocupam posição de destaque para o crescimento vegetal devido às condições estressantes de solo, clima e incidência de pragas e doenças. Apesar do enorme potencial destas, em larga escala ainda não é possível fazer uso das MAs devido à falta de inoculante aceito comercialmente e tecnologias apropriadas para aplicação destas nos agrossistemas. A impossibilidade de cultivar os fungos que formam esta simbioses na ausência de células vegetais vivas é a principal limitação para estudos básicos e aplicados sobre as MAs.

O estabelecimento da simbiose micorrízica depende de uma série de eventos para que ocorra a total e íntima relação entre o fungo e a planta. Estes ocorrem a partir do contato entre os propágulos do fungo (esporos, células auxiliares e hifas em raízes colonizadas) e as raízes das plantas, havendo em seguida eventos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos específicos que podem ser regulados por ambos simbioses e afetados por fatores bióticos e abióticos. Para a maximização dos benefícios obtidos por esta simbiose, é necessário

otimizar as condições que favorecem as MAs. Dentre estas destaca-se a elevada quantidade de inóculo no solo, condição que é limitada na maioria dos solos agrícolas, onde densidade de inóculo é baixa.

Em termos tecnológicos, a questão principal é como melhorar a colonização micorrízica das plantas. Isto pode ser conseguido através da inoculação de sementes e mudas, infestação de solos e substrato, o que tem como obstáculo principal a falta de inoculante. Ainda assim, pode-se multiplicar o fungo em planta hospedeira e preparar algum tipo de inóculo comercial que pode ser aplicado em plantas que passam por fase de mudas. Estas, ao serem transplantadas para o campo sobrevivem melhor e serão mais produtivas. Este procedimento, entretanto, não é prático para culturas anuais em que as MAs são também importantes. Neste caso, resta apenas manejar a população dos fungos micorrízicos indígenas, que é difícil de ser praticada. A descoberta, no início desta década, de substâncias produzidas em maiores quantidades em plantas estressadas pela deficiência de P e que são ativas sobre os fungos MAs abriu novas perspectivas para a exploração destes simbiontes na agricultura. Estas substâncias são isoflavonóides, sendo o mais ativo e melhor estudado a formononetina (7-hidroxi, 4'-metoxi isoflavona).

As aplicações destas substâncias, processos de síntese e formulações, são objeto de várias patentes nos Estados Unidos e outros países, todas baseadas no uso de formononetina sintética no solo ou nas sementes para acelerar e aumentar a colonização micorrízica pelos fungos indígenas, maximizando os efeitos destes para as culturas e a produtividade. Por se tratar de uma substância orgânica muito pouco solúvel em água, para melhorar sua eficácia esta é atualmente formulada na forma de sal de K ou embebida em polímeros orgânicos. No presente estudo avaliaram-se em condições de campo, os efeitos da aplicação de formulações comerciais de formononetina na produtividade do milho.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. As Micorrizas Arbusculares

As micorrizas são parte importante dos ecossistemas, permitindo o fornecimento de fotossintatos aos fungos, que os utilizam como fonte de energia e em contrapartida transferem à planta nutrientes minerais absorvidos do solo, principalmente o fósforo (Lopes, Siqueira e Zambolin, 1983), que pela sua pouca mobilidade no solo fica menos acessível a esta. A troca de materiais entre os simbiossiontes ocorre em estruturas especializadas, conhecidas como arbusculos, formadas pelo fungo nas células corticais da raiz, originados da intensa ramificação dicotômica das hifas intracelulares, envolvidas por invaginações da membrana plasmática de células hospedeiras, sem destruí-las ou causar-lhes dano algum. (Gerdemann, 1968, Siqueira e Saggin-Junior, 1995).

Além da melhor nutrição, outros efeitos são atribuídos a esta relação como o favorecimento da relação hídrica, aumento da adaptabilidade das plantas às condições adversas pela diminuição dos danos causados por estresses bióticos (Leyval, Turnau e Haselwandter, 1997, Nelsen, 1987; Safir, Boyer e Gerdemann, 1972; Siqueira, Safir e Nair 1991a; Siqueira e Saggin-Junior, 1995; Siqueira, 1994; Siqueira et al., 1999; Sylvia e Williams, 1992 e Rabin e Pacovsky, 1985), tais como: nematóides, ataque de patógenos ao sistema radicular, controle do parasitismo e resistência a doenças e abióticos como: pH, Al, Mn, metais pesados (menor absorção ou translocação, reduzindo a toxidez), salinidade, uso de pesticidas, entre outros. Estes benefícios resultam num maior crescimento das plantas e podem ser denominados efetividade das MAs, que aumentarão com a maior dependência micorrízica do hospedeiro e maior nível de estresse (Siqueira e Saggin-Junior, 1995)

Para que ocorra a simbiose micorrízica é necessário que haja colonização das raízes pelos propágulos do fungo micorrízico no solo, levando os simbiossiontes a estabelecerem uma estreita sintonia morfológica, fisiológica, bioquímica e funcional e que por sua vez, são regulados pelo genoma do fungo e da planta, bem como por condições ambientais, como exsudados radiculares, interferência de outros microrganismos, quantidade de inóculo e fatores abióticos como cultivo do solo, fertilidade, regime hídrico, uso de pesticidas, manejo do solo e concentração de metais pesados no solo (Siqueira, 1994, Siqueira e Franco, 1988; Siqueira e Saggin-Junior, 1995). Para o estabelecimento da simbiose é necessário principalmente uma alta densidade de inóculo presente no solo. Segundo Wilson (1984), com o aumento do nível de inóculo a colonização será mais rápida e o comprimento de raiz colonizada aumenta. A colonização é ao mesmo tempo favorecida geralmente em sistemas de cultivo pouco perturbados, em solos de baixa fertilidade (Smith e Read, 1997; Siqueira, 1994) e solos com níveis de P disponíveis em torno de 12µg por g de solo (Siqueira e Saggin-Junior, 1995); será reduzida com condições diferentes destas, havendo a necessidade de elevar a densidade de propágulos e maximizar a atividade dos presentes no solo.

Os fungos MAs são de ocorrência generalizada nos ecossistemas, sendo geralmente encontrados em todo solo, mas não em quantidade suficiente para garantir a colonização nos estádios iniciais das culturas anuais e assim beneficiá-las, o que de fato apresenta enorme potencial para o desenvolvimento das mudas. Embora existam práticas agronômicas para manejar os fungos MAs, as repostas ao manejo dos fungos indígenas são imprevisíveis. A micorrização das mudas pode ser eficiente, como se verificou para o cafeeiro (Siqueira et al., 1998), contudo, este procedimento não é prático para culturas anuais, nas quais a associação com MAs oferecem inúmeros benefícios

## 2.2. Os Compostos Fenólicos

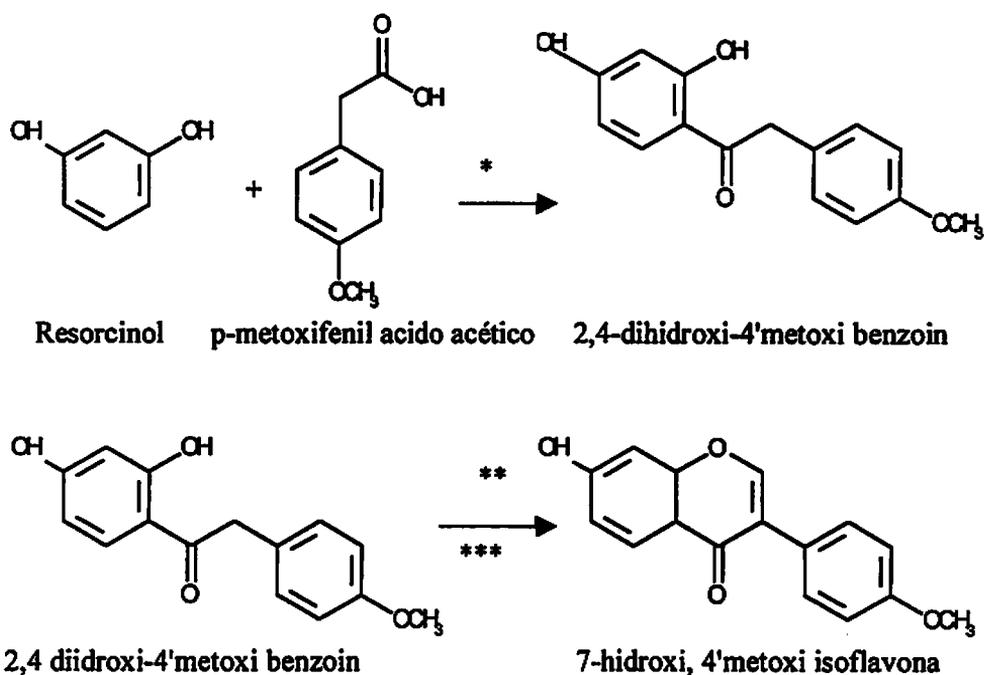
Os compostos fenólicos são substâncias constituídas por um anel aromático (C<sub>6</sub>) ligados a um ou mais grupos de hidroxilas (Dey e Harbone, 1997), produzidos por plantas através da rota metabólica da fenilalanina-amoniliase e com várias funções definidas no sistema solo-planta-microrganismo, conforme discutido por Siqueira et al. (1991). Estas funções incluem órgãos de armazenamento e elementos estruturais anatômicos e morfológicos, parte integral das estruturas da parede celular (suporte mecânico e barreiras contra invasão microbiana); atuam como repelentes (junto a vários compostos contendo nitrogênio tóxico); contribuem para mecanismos de resistência a doenças em plantas, como atraentes (especialmente antocianinas, junto com flavonas e flavonóis, contribuindo com a coloração de flores e frutos), influenciam na competição entre plantas (alelopatia); podem agir como compostos venenosos, alucinógenos ou com valores farmacológicos e na forma de exsudados radiculares (flavonóides) podem atuar como toxinas ou como sinais moleculares em sistemas simbióticos entre plantas e nas relações plantas-microrganismos (Siqueira et al., 1991; Lynn e Chang, 1990; Hungria, 1994; Dey e Harbone, 1997; Taiz e Zeigern, 1991). Os flavonóides podem atuar nas simbioses MAs como estimuladores do crescimento de hifas na fase de preinfecção ou como indutores do apressório e/ou formação de arbúsculo e esporulação (Siqueira et al., 1991; Nair, Safir e Siqueira 1991)

Os flavonóides são compostos fenólicos constituídos por 15 carbonos (dois anéis aromáticos conectados por três carbonos) derivados de duas rotas metabólicas diferentes (Siqueira et al., 1991 e Taiz e Zeigern, 1991). Estes compostos são produzidos pelas plantas e acumulados nas raízes ou liberados na forma de exsudados. Nair, Safir e Siqueira (1991) isolaram de raízes de trevo (*Trifolium repens* L. cv. Ladino) sob estresse de fósforo, a biochanina A (5,7-dihidroxi, 4'-metoxi isoflavona) e a formononetina (7-hidroxi, 4'-metoxi

isoflavona), os quais foram ativos sobre as FMAs *in vitro*. Estes e outros flavonóides foram produzidos sinteticamente e submetidos a vários estudos (Fries et al., 1997; Vierheilig et al., 1998), permitindo concluir que os flavonóides exsudados pelas raízes, desempenham um papel importante na comunicação e sinalização que ocorre durante estádios de precolonização dos FMAs. Mais especificamente em estudos realizados *in vitro* verificou-se que a formononetina atua como fator químico ativo capaz de estimular o crescimento assimbiótico de esporos de FMAs (Nair, Safir e Siqueira, 1991; Baptista e Siqueira, 1994 e Fersula Romero e Siqueira, 1996); em estudos realizados em casa de vegetação verificou-se o estímulo para uma rápida colonização em milho (*Zea mays* L.)(Fries et al., 1997), sugerindo que isto ocorreria quando na baixa disponibilidade de P pela diminuição da atividade da enzima peroxidase, facilitando a invasão do fungo nas raízes da planta hospedeira (Fries, 1995 e Fries, Pacovsky e Safir, 1998); também verificou-se o aumento da colonização, na soja (*Glycine max* L.), no milho (Silva-Junior e Siqueira, 1997; Silva-Junior e Siqueira, 1998) e aumento no crescimento de plantas de trevo branco (*Trifolium repens* L.) (Siqueira, Safir e Nair, 1991b), sugerindo que o estímulo ao crescimento do fungo MA, além de aumentar a área de contato do fungo com o hospedeiro, acelera o processo de colonização; exerceu também um efeito protetor nas plantas de milho e sorgo (*Sorghum bicolor*) sob estresse de herbicidas (Siqueira, Safir e Nair, 1991a) e diminuiu os efeitos prejudiciais de metais pesados no milho (Siqueira et al., 1999). Efeitos estes conseguidos via estímulo da micorrização e que dependem do hospedeiro, da eficiência do fungo, do potencial de inóculo e condições de crescimento. É necessário complementar estes estudos com outros a campo para definir o uso agrônomico destas substâncias como estimulantes da micorrização.

Com o intuito de empregar estes compostos como uma alternativa para maximizar a micorrização de fungos nativos e conseqüentemente os benefícios

de esta associação em áreas de cultivos, vêm se realizando estudos tentando verificar a viabilidade agrônômica desta tecnologia. Em estudo de campo com aplicação da formononetina sintética (Rhizotropin™ RhizoTech, Inc), foi verificado um aumento na produtividade de 24% para milho e 52% para a soja (Siqueira et al., 1992). A formononetina tem baixa solubilidade em água, o que dificulta sua aplicação. Entretanto, pesquisadores da VAMTech, L.L.C. aperfeiçoaram a rota de síntese (Figura 1) e desenvolveram novas formulações denominadas Myconate™ e Mycoform™ mais apropriadas à aplicação em larga escala no solo e nas sementes, conforme discutido por Nair et al. (1999). Segundo estes autores, formulações vêm sendo testadas em várias partes do mundo como na Índia e Estados Unidos e para várias culturas, com resultados muito promissores como tecnologia para aumentar a contribuição dos fungos MAs na produção agrícola mundial.



\*Acilação Friedel Crafts

\*\*BF<sub>3</sub>Et<sub>2</sub>O: Borontrifluoride Dietileter

\*\*\*N,N'dimetil (clorometileno) amônio clorado

FIGURA 1. Sínteses da formononetina (7-hidroxi, 4'metoxi isoflavona).

Fonte: Nair et al., 1999

### 2.3. A cultura do milho.

O milho é uma das culturas de grande importância econômica no país, sendo assim cultivada em grandes áreas. Esta cultura é muito usada como base da alimentação animal e também direta e indiretamente na dieta humana.

Anualmente são cultivados no mundo cerca de 132 milhões de hectares para uma produção de grãos de aproximadamente 500 milhões de toneladas (Fancelli e Dourado-Neto, 1997). Em 1996 o Brasil produziu 32 milhões de toneladas de grãos numa área cultivada de 13,7 milhões de hectares, representando 26% da área cultivada no Brasil e aproximadamente 42% do total dos grãos produzidos no país, segundo Agriannual (citado por Coelho, 1997). Embora sendo um dos maiores produtores de milho do mundo e existindo produtores altamente tecnificados em algumas regiões, a produtividade média brasileira é muito baixa, situando-se ao redor de  $2.300 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ , superada até por outros países do terceiro mundo que usam nível de tecnologia inferior (Büll, 1993).

A extração média de nutrientes pela cultura varia de acordo com a produtividade. Segundo dados citados por Coelho e França (1995), a extração varia em  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de 77 a 217 para N, de 9 a 42 para P, de 83 a 157 para K, de 10 a 32 para Ca e de 10 a 33  $\text{kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  para Mg, para uma produtividade de 3,65 a  $10,15 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}$ . Isto corresponde à exportação de 80% a 90% de P, 75% de N, 60% de S, 50% de Mg, 20 a 30% de K, e 10 a 15% de Ca. Embora as exigências de P sejam menores que as de N, as doses recomendadas de P são de 60 a  $110 \text{ kg de } \text{P}_2\text{O}_5\cdot\text{ha}^{-1}$ , consideradas altas, devido à fixação deste elemento no solo por adsorção e precipitação, o que resulta em baixo aproveitamento de P pela planta (Coelho e França, 1995).

#### **2.4. MAs no milho**

A formação das micorrizas é um mecanismo importante para a nutrição fosfatada das culturas nos solos tropicais (Smith e Read, 1997; Paul e Clark, 1996 e Siqueira, 1994). Para favorecer o estabelecimento da relação simbiótica, a quantidade de P no solo deve estar abaixo do ótimo para aquela cultura, podendo se beneficiar desta; segundo Siqueira e Saggin-Junior (1995), a colonização das MAs no milho diminui linearmente à medida que a

porcentagem de P no tecido é maior que 0,14%. A adição de grandes quantidades de fertilizantes fosfatados no solo pode inibir o desenvolvimento das MAs (Siqueira, 1990). Os benefícios dos FMAs para o crescimento de plantas varia de 5 a 290% em cultivos aráveis de acordo com o nível de P no solo (Siqueira e Saggin-Junior, 1995). Mesmo sendo o milho uma cultura não muito dependente das MAs, ele se beneficia da simbiose se a concentração de P for inferior a  $0,22\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de solução. Nesta condição estima-se que o efeito destas é equivalente a  $30\text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$  de P. As MAs podem reduzir em 34% o requerimento externo de P provocado pela inoculação com *Glomus macrocarpum*. Considerando-se estes aspectos, é de grande interesse explorar as micorrizas nesta cultura. Como a inoculação do milho não é economicamente viável, o uso de flavonóides parece muito promissor no Brasil.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Caracterização do experimento

O estudo constou de um experimento realizado a campo, em uma das áreas experimentais da Universidade Federal de Lavras, no período compreendido entre outubro de 1998 e maio de 1999. O solo é um Latossolo Roxo, textura argilosa, com as seguintes características: pH(água)= 5,4; V%= 45; matéria orgânica= 30g.kg<sup>-1</sup>; P=8,9 mg dm<sup>-3</sup> e K=74 mg dm<sup>-3</sup> (extraídos por Mehlich e determinados por colorimétrica e fotometria de chama, respectivamente); 1,7; 0,5 e 0,0 cmol<sub>c</sub>.dm<sup>-3</sup> de Ca, Mg e Al, respectivamente (extraídos por KCl 1N e determinados por titulometria). Antes do plantio, extração e contagem de esporos de fungos MAs revelaram densidade média de 155 esporos por cada 50 cm<sup>3</sup> de solo, sendo identificadas as espécies *Scutellospora heterogama* (Nicholson e Gedermann, Walker e Sanders) *Scutellospora* sp., *Acaulospora* sp e *Gigaspora margarita* (Becker e Hall). O solo recebeu aração e gradagem antes do sulcamento para estabelecer e identificar os blocos e parcelas, com distribuição dos blocos ao longo dos sulcos. Foram coletadas amostras de solo por parcela para serem submetidas à análise de fertilidade.

Foram testados nove tratamentos (Tabela 1), em delineamento experimental com blocos casualizados (DBC), com quatro repetições. As parcelas experimentais foram constituídas por quatro linhas de 7,5 metros de comprimento, com espaçamento entre linhas de 0,80m. Apenas as duas linhas centrais foram amostradas e colhidas. Empregou-se milho (*Zea mays* L.) Cargill C333B, híbrido simples modificado. Este híbrido é recomendado para esta região e possui características de tolerância, segundo Cargill [199\_], a moléstias

foliares (*Puccinia*, *Physopella*, *Helminthosporium* e *Phaeosphaeria*), referências de produção na região de 11.431 kg ha<sup>-1</sup> com uso de alta tecnologia (Vom Pinho, 1999) e em ensaio nacional de milho da EMBRAPA 1997/98 cultivado na UFLA, Lavras-MG, com produtividade de 9.954 kg.ha<sup>-1</sup> (Corrêa, 1998). Foram semeadas 10 sementes por metro linear, com desbaste posterior, deixando-se 5 plantas por metro linear.

Os tratamentos foram aplicados antes da semeadura, sendo as taxas de aplicação (Tabela 1) definidas conforme indicações do fabricante e resultados de ensaios já realizados (Informações técnicas da VAMTech, L.L.C.-Okemos, MI).

TABELA 1. Tratamentos e taxa de aplicação de Myconate e Mycoform no sulco e na semente.

Tratamentos/Identificação	Quantidade de Produto	
	g.kg <sup>-1</sup> de semente	g.ha <sup>-1</sup>
1-Controle sem estimulante	0	0
2-Mycoform na semente (Fsem)	4,41	88,2*
3-Myconate na semente (Nsem)	5,38	107,6*
4-Myconate no sulco (Nsul)	0	75,4
5-Mycoform no sulco (Fsul)	0	61,8
6-Mycoform na semente + Myconate no sulco (Fsem+Nsul)	4,41	88,2+75,4
7-Myconate na semente + Myconate no sulco (Nsem+Nsul)	5,38	107,6+75,4
8-Mycoform na semente + Mycoform no sulco (Fsem+Fsul)	4,41	88,2+61,8
9-Myconate na semente + Mycoform no sulco (Nsem+Fsul)	5,38	107,6+61,8

\* considerou-se gasto de 20 kg de semente por hectare.

As formulações utilizadas são marcas comerciais com as seguintes características: Mycoform™, líquido branco espesso, embebido em polímero, de peso molecular 268, insolúvel em água e totalmente solúvel em dimetil sulfoxido, parcialmente solúvel em metanol, clorofórmio e etil acetato; e Myconate™, pó esverdeado, sal de potássio de 4'- metoxi, 7-hidroxi isoflavona, peso molecular 306, solúvel em água (1g em 3 ml de água) (VAMTech, L.L.C. [1998?]).

Na semeadura que ocorreu na primeira quinzena de novembro de 1998, as quantidades pesadas foram misturadas com as formulações, sendo adicionados 15 ml de água a 2,81 g de Myconate e misturados com 522g de sementes. Para Mycoform aplicaram-se 17,71 ml em outras 522g de sementes. Logo em seguida as sementes foram distribuídas de acordo com os tratamentos (Nsem, Fsem ou sem estimulante na semente), a quantidade de 10 por metro linear (para "stand" final por metro de 5 plantas), e nas linhas externas da parcela (bordaduras) as sementes que não receberam nenhum tratamento. Para aplicação no sulco foi preparada uma solução composta por 1,085g de Myconate e 6,8 ml de Mycoform separadamente, cada uma destas dissolvidas em 48 litros de água e distribuídos em 24 sulcos de 7,5m de acordo com cada tratamento, sendo que nos tratamentos onde não foi adicionado nenhuma solução no sulco estes foram irrigados cada um com dois litros de água

Baseando-se em resultados de ensaios anteriores (J. O. Siqueira, resultados não publicados), optou-se por não aplicar P, pois o solo já possuía um teor médio deste nutriente. Para os demais nutrientes, seguiu-se a análise do solo e recomendação técnica para a cultura (Raij et al., 1997 e CFSEMG, 1989). As plantas receberam adubação total de 90:0:90 de N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O kg.ha<sup>-1</sup>, sendo aplicados 20 kg.ha<sup>-1</sup> de N na forma de Sulfato de Amônia, 60 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de Cloreto de Potássio e 2 kg.ha<sup>-1</sup> de Zn na forma de Sulfato de Zinco imediatamente após germinação. No estágio 2 (plantas apresentando 8 folhas-32

dias após a emergência), aplicaram-se 70 kg.ha<sup>-1</sup> de N na forma de Sulfato de Amônia e 30 kg.ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O na forma de Cloreto em cobertura.

### 3.2. Avaliações

No estágio fenológico 2 da cultura (planta apresentando 8 folhas- 30 dias após emergência-DAE) avaliou-se a colonização de raízes pelos FMAs. Para isto coletaram-se amostras de raízes finas no sulco, em 8 plantas por parcela. Um grama de raízes foi lavada e colocada em capsulas plásticas, identificadas, clarificadas através de uma solução de KOH 5% p/v por 30 min a 90°C, em seguida lavadas com água corrente e agitadas por 3 a 4 min em HCl 1%. Após a retirada deste último foram coradas com azul tripan em lactoglicerol 0,05% (água: glicerol: ácido láctico, 1:1:1), por 10 min a 90°C. Para estimar a porcentagem de raiz colonizada foi utilizado o método de intercessão descrito por Giovanetti e Mosse (1980) e observação em microscópio estereoscópico (ampliação de 10 a 40 vezes). Após esta contagem retiraram-se 30 segmentos (de cada uma das amostras) de aproximadamente 1cm, os quais foram montados em uma lâmina com glicerina, dispostos paralelamente e cobertos com lamínulas (24x50mm) para observação em microscópio ótico no aumento (200x). Avaliou-se um total de 27mm de raiz por lâmina (parcela) para colonização arbuscular nos segmentos, conforme McGonigle et al. (1990); o número de pontos de entrada (primários ou secundários) segundo Wilson (1984) e a densidade de arbúsculos. Neste mesmo estágio (planta com 10 folhas-40 DAE) avaliou-se o crescimento das plantas através de medidas de altura, avaliando 6 plantas por parcela.

Durante o estágio fenológico 4 (emissão do pendão-60 DAE) foi avaliado o estado nutricional, baseado na análise foliar, para isto foram amostradas 10 plantas por parcela quando houve aparecimento da inflorescência feminina, coletando a folha oposta e abaixo da espiga (Malavolta, Vitti e

Oliveira, 1997). As determinações de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn e Zn na folha foram determinadas segundo a metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997). Os extratos de matéria seca foram obtidos por digestão nitroperclórica, exceto para o nutriente B, cuja extração foi por via seca. P e B foram determinados por colorimetria, sendo B extraído por água quente e determinado por curcumina; Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrofotometria de absorção atômica; K por fotometria de chama e S por turbidimetria. Os teores de N foram determinados pelo método de Kjeldahl.

Neste mesmo estágio (emissão do pendão-65 DAE) coletaram-se raízes para a 2ª avaliação da colonização micorrizica, sendo as amostras processadas de modo idêntico ao descrito para a primeira amostragem.

Após completar o ciclo da cultura foi avaliado o número de plantas colhidas por parcela (15m) ou "stand final", número de espigas, sendo estas colhidas e avaliado o comprimento das mesmas, peso de 100 (cem) sementes e produção de grãos por parcela. Também coletou-se uma amostra de solo para avaliar a densidade de esporos presentes no solo de 50 cm<sup>3</sup>. A extração destes foi feita por peneiramento via úmida (Gerdemann e Nicholson, 1963) em peneiras de malha de 0,710 e 0,053mm, seguida de centrifugação em água durante 3 min a 3000rpm e em sacarose 50% por 2 min a 2000rpm. Após a separação, os esporos foram lavados em água e contados em placa de petri de ranhuras circulares com o auxílio do microscópio estereoscópico (40x).

### 3.3. Análises Estatísticas

As variáveis avaliadas foram submetidas a análises de variância (ANAVAs) e teste de médias pelo teste de Duncan ao nível de 5%, utilizando o programa estatístico SANEST (Zonta, Machado e Silveira-Junior, 1984). Com a finalidade de se obter homocedasticidade, os dados referentes a contagens (densidades de arbúsculos e pontos de entrada) foram transformados em raiz de

$x + 0,5$  e a porcentagem de colonização transformada em arco seno da raiz de  $x/100$ . Visando melhor avaliação do efeito dos tratamentos no milho, realizaram-se análises das correlações entre características da planta pelo método paramétrico de Pearson, conforme o programa estatístico SAEG (Universidade Federal de Viçosa).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A 1ª avaliação da micorrização, através da determinação da colonização micorrízica, colonização arbuscular, densidade arbuscular e número de pontos de entrada, não revelou diferenças significativas para os tratamentos estudados (Tabela 2). Este resultado pode ser atribuído à elevada colonização observada no tratamento controle. Aparentemente a densidade de esporos no solo de 3,1 esporos.cm<sup>-3</sup> de solo foi suficiente para garantir elevada colonização. Provavelmente os efeitos dos tratamentos poderiam ser detectados se avaliados numa época anterior a esta, como estudos realizados por Silva-Junior e Siqueira (1997) e Siqueira et al. (1991), que verificaram que a formononetina acelera a colonização, sendo que este estímulo varia em função da infectividade do solo, do parâmetro considerado e época de avaliação. Apesar da ausência do efeito significativo nestas variáveis, verificou-se que a aplicação de Myconate no sulco e Myconate na semente favoreceram em até 23% a colonização micorrízica, em até 19% a colonização arbuscular e em até 81% a densidade de arbúsculos. Como estas estruturas estão diretamente envolvidas na transferência principalmente de P para a planta (Clarkson, 1985), Mycoform na semente +Mycoform no sulco aumentou 4 vezes mais a densidade de pontos de entrada, sendo isto de grande importância para o maior desenvolvimento da planta (Smith e Read, 1997), conforme será discutido mais adiante. Em outros estudos com formononetina verificou-se que esta acelera a micorrização (Siqueira, Safir e Nair, 1991b) e beneficia a planta. Siqueira et al. (1992) também verificaram que o uso da formononetina (Rhizotropin™) não influenciou significativamente os parâmetros da colonização, porém houve efeitos significativos na produção de grãos de milho e soja.

**TABELA 2** Valores médios das variáveis de micorrização avaliadas no milho, no estágio fenológico 2 (1ª avaliação da colonização).

Tratamentos	Colonização micorrízica (%)	Colonização arbúscular (%)	Densidade arbúscular (n/27mm*)	Pontos de entrada (n/27mm*)
Controle	47	56	134	2
Fsem	53	62	224	5
Nsem	47	67	174	3
Nsul	58	51	205	7
Fsul	57	56	192	6
Fsem+Nsul	49	55	170	5
Nsem+Nsul	54	61	138	5
Fsem+Fsul	45	57	243	9
Nsem+Fsul	48	52	155	4
ANAVA(F)	ns	ns	ns	ns

\* comprimento observado de um total de 30 segmentos com 0,9mm cada um.

ns= não significativo com  $P \leq 0,05$

Verificou-se que os tratamentos favoreceram ( $P \leq 0,05$ ) a altura das plantas, com Mycoform no sulco para um aumento de 25% e com Myconate na semente ou no sulco e Mycoform na semente +Mycoform no sulco para um aumento de 20 a 16% (Figura 2). Todos os tratamentos com uso de estimulante da micorrização beneficiaram o crescimento das plantas, porém com efeitos diferenciados e destaque para Mycoform no sulco, que superou os 20% do aumento em relação ao tratamento controle.

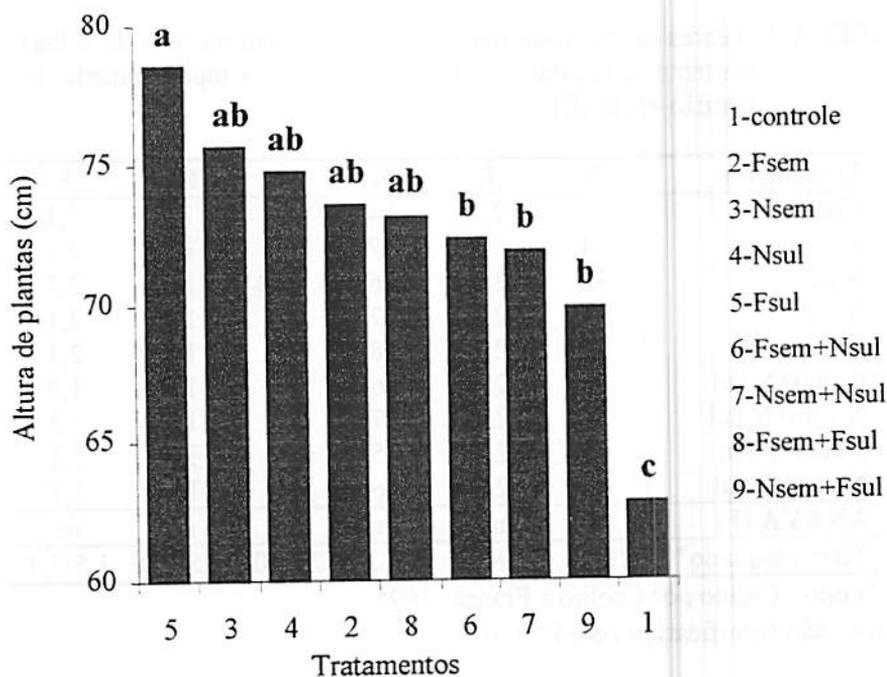


FIGURA 2. Altura de plantas de milho no estágio fenológico 2.

Os tratamentos identificados com letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

A análise foliar realizada no estágio fenológico 4 da cultura (aparecimento do pendão-60 DAE) revelou teores de nutrientes na faixa adequada para o milho (Tabelas 3 e 4), exceto para Ca e Mg, que se encontravam em concentrações deficientes na folha.

**TABELA 3. Teores de macronutrientes ( $\text{g.kg}^{-1}$  de matéria seca de folha) presentes no milho no estágio fenológico 4 (aparecimento do pendão-60 DAE).**

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg	S
Controle	32	2,7	24	9	1,0	2,1
F sem	34	2,8	27	9	1,3	2,1
N sem	32	2,8	26	9	1,2	2,2
N sul	31	2,7	27	9	1,1	2,1
F sul	32	2,5	28	9	1,3	2,1
F sem+N sul	32	2,6	26	9	1,2	1,9
N sem+N sul	31	2,7	27	9	1,1	2,5
F sem+F sul	31	2,7	25	9	1,3	2,2
N sem+F sul	33	2,7	26	10	1,3	1,8
ANAVA (F)	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Teor adequado*	28-33	1,9-3,5	18-30	23-40	1,5-4,0	1,5-2,1

\*Fonte: Citado por Coelho e França, 1995.

ns= não significativo com  $P \leq 0,05$

**TABELA 4. Teores de micronutrientes ( $\text{mg.kg}^{-1}$  matéria seca da folha) presentes no milho no estágio fenológico 4 (aparecimento do pendão-60 DAE).**

Tratamentos	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Controle	19,2	13,8	201,1	35,2	16,0
F sem	20,8	13,7	165,4	34,3	16,1
N sem	18,9	13,5	155,6	30,5	16,3
N sul	19,2	13,0	184,2	34,9	16,0
F sul	18,6	12,8	163,6	34,5	16,1
F sem+N sul	17,8	12,5	157,0	35,6	16,3
N sem+N sul	20,5	13,2	190,4	36,8	15,6
F sem+F sul	19,7	13,8	167,8	31,9	16,6
N sem+F sul	19,2	12,7	213,6	32,1	16,8
ANAVA (F)	ns	ns	ns	ns	ns
Teor adequado*	15-20	6-20	50-250	42-150	15-50

\*Fonte: Citado por Coelho e França, 1995

ns= não significativo com  $P \leq 0,05$

A deficiência de Ca e Mg é devida à baixa saturação de bases (45%) no solo na época da semeadura e a não aplicação de calcário devida à ausência de Al no solo ou fornecimento do Ca e Mg através de formulações nas adubações, persistindo, assim, um baixo nível destes no solo e consequentemente a deficiência antes mencionada. O comportamento semelhante quanto ao estado nutricional entre as plantas dos diferentes tratamentos pode ser devido à alta colonização micorrízica destas, atingidas no tratamento controle. Isto foi favorecido pelos baixos níveis de P no solo, a não aplicação de defensivos na cultura e elevada densidade de esporos no solo. Também a aplicação parcelada dos nutrientes contribuiu para o bom desenvolvimento das micorrizas pelos fungos indígenas. Entretanto, considerando que pode haver uma redução dos teores de nutrientes nas plantas micorrizadas devido ao efeito de diluição (Siqueira e Franco, 1988), pode-se inferir que a maior altura das plantas com a formononetina implicaria em diferença quanto aos teores de nutrientes nas plantas, o que não ocorreu. Isto indica que, no caso, isto quer dizer que a absorção de nutrientes por plantas tratadas com formulações de formononetina foi maior e que as plantas do tratamento controle absorveram menos nutrientes. Assim, a aplicação dos produtos estimulou a micorrização e absorção dos nutrientes.

A avaliação da micorrização feita no estágio fenológico 4 (aparecimento do pendão-65 DAE) revelou também ausência de efeito significativo dos tratamentos em todos os parâmetros avaliados (Tabela 5). Estes resultados eram de certo modo esperados devido à alta colonização alcançada já na primeira avaliação. Embora sem efeito significativo entre os tratamentos, nota-se que algumas variáveis foram favorecidas pelos tratamentos. Por exemplo, a aplicação de Myconate na semente favoreceu a colonização micorrízica em 20%, a colonização arbuscular em 49%, a densidade arbuscular em 67% e o número de pontos de entrada em 40%. Efeitos semelhantes a estes

já foram verificados em estudo realizado a campo por Siqueira et al. (1992) e outro realizados em casa de vegetação sob condições controladas, em que existe menos variabilidade, encontraram efeitos significativos para formononetina.

TABELA 5 Valores médios das variáveis de micorrização avaliadas no milho, no estágio fenológico 4 (2ª avaliação).

Tratamentos	Colonização micorrízica	Colonização arbuscular	Densidade arbuscular	Pontos de entrada
	%	%	(n/27mm)	(n/27mm*)
Controle	59	45	137	10
Fsem	64	49	208	7
Nsem	71	67	229	14
Nsul	65	54	185	10
Fsul	68	50	203	9
Fsem+Nsul	67	59	250	12
Nsem+Nsul	63	70	223	10
Fsem+Fsul	66	50	158	11
Nsem+Fsul	71	46	133	9
ANAVA(F)	ns	ns	ns	ns

\*comprimento observado de um total de 30 segmentos com 0,9mm cada um

ns= não significativo com  $P \leq 0,05$

Os tratamentos não exerceram efeitos significativos no número de plantas colhidas, número e comprimento de espigas e peso de 100 sementes (Tabela 6). Verifica-se, no entanto, tendência de maior número de espigas colhidas com o tratamento Myconate na semente. A produtividade foi estimulada significativamente ( $P \leq 0,05$ ) pela aplicação de formulações, obtendo

um aumento na produção de grãos de 28% com Mycoform na semente +Mycoform no sulco, 21% com Myconate no sulco, 20% com Myconate na semente, 16% com Myconate na semente +Mycoform no sulco e 14% com Mycoform no sulco (Tabela 6).

TABELA 6. Valores médios das variáveis de produção avaliadas no milho.

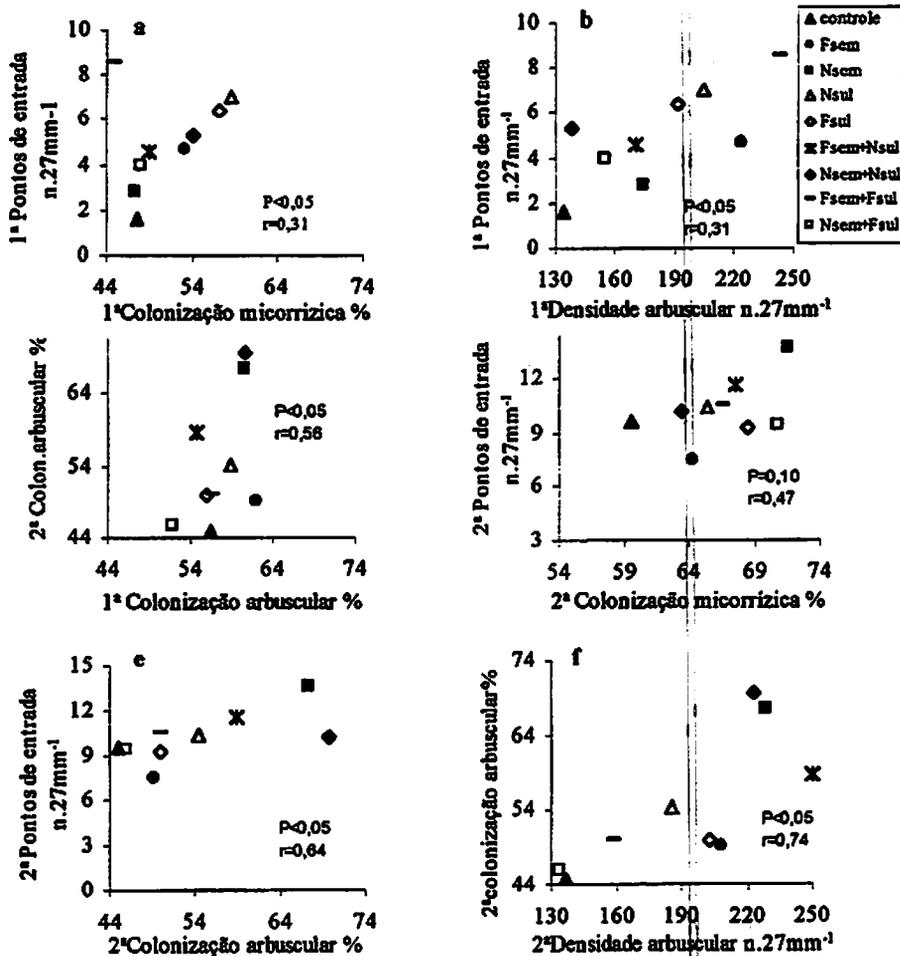
Tratamentos	Plantas colhidas	Peso 100 sementes	Comprim espigas	Número espigas	Produção	Aumento produção
	n°.15m <sup>-1</sup>	g	cm	n°.15m <sup>-1</sup>	kg.parc <sup>-1</sup>	%
Controle	61	32,44	15,7	72	9,8c	0
Fsem	58	32,97	15,6	72	10,7bc	9
Nsem	62	33,12	16,1	82	11,8ab	20
Nsul	68	32,89	16,7	78	11,9ab	21
Fsul	72	32,21	15,7	73	11,2b	14
Fsem+Nsul	65	33,07	16,6	74	11,0bc	12
Nsem+Nsul	62	32,51	15,8	72	10,8bc	10
Fsem+Fsul	67	32,20	16,9	77	12,5a	28
Nsem+Fsul	66	32,07	15,9	71	11,4ab	16
ANAVA (F)	ns	ns	ns	ns	P≤0,05	

As médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% pelo teste de Duncan.

ns= não significativo com P≤ 0,05

Como em vários estudos realizados com milho em casa de vegetação verificou-se efeito da formononetina na micorrização (Siqueira, Safir e Nair, 1991a; Silva-Junior e Siqueira, 1997 e Siqueira et al., 1999), procurou-se estabelecer relações entre os efeitos dos produtos e variáveis da micorrização através de análises de correlação entre estas. Na 1ª avaliação da micorrização

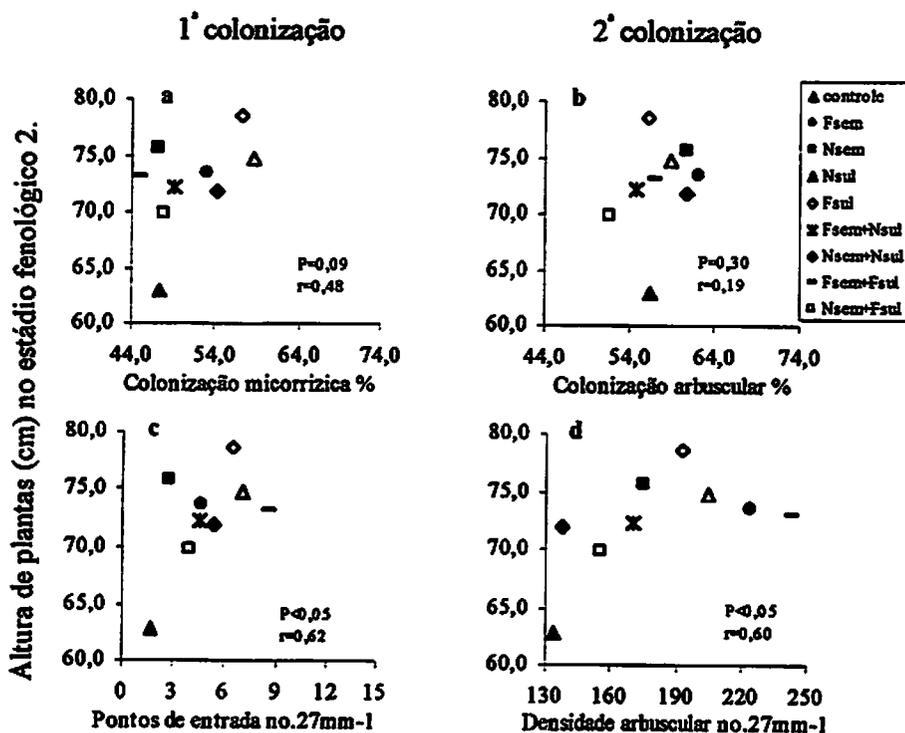
houve correlação entre o número de pontos de entrada e a densidade de arbúsculos, sendo estes parâmetros máximos no tratamento Mycoform na semente +Mycoform no sulco (Figura 3), confirmando os estudos em condições controladas (Nair, Safir e Siqueira, 1991; Siqueira, Safir e Nair, 1991a; Silva-Junior e Siqueira, 1997), nos quais estas substâncias estimularam o fungo a colonizar as raízes e formar arbúsculos, o que pode ter significado fisiológico para a planta. Houve também correlação do número de pontos de entrada com a colonização micorrízica, porém com ajuste muito baixo e tendência de melhor comportamento para os tratamentos Myconate no sulco e Mycoform no sulco. A colonização arbuscular nas duas épocas avaliadas correlacionam-se entre si, sendo favorecidas pela formulação Myconate na semente e Myconate na semente +Myconate no sulco. Já na 2ª avaliação da micorrização não se verificou correlação entre número de pontos de entrada e a colonização micorrízica. Contudo, verificou-se correlação entre pontos de entrada e colonização arbuscular, apresentando valores elevados nos tratamentos Myconate na semente e Myconate na semente +Myconate no sulco.(Figura 3). Estes resultados indicam benefícios destes produtos para a micorrização do milho.



**FIGURA 3** Correlação entre as variáveis da micorrização no milho sob o efeito de diferentes tratamentos com estimulantes da micorrização.

A altura de plantas não se correlacionou positivamente com a colonização, porém correlacionou-se com o número de pontos de entrada e densidade de arbúsculos (Figura 4). Verifica-se que altura e número de pontos de entrada foram favorecidas nos tratamentos Mycoform no sulco, Myconate no

sulco e Mycoform na semente +Mycoform no sulco. A tendência de superioridade destes tratamentos é confirmada para Mycoform no sulco, Myconate no sulco, e Mycoform na semente +Mycoform no sulco, que também elevaram a densidade de arbúsculos. Por ser o arbúsculo a estrutura principal na relação simbiótica (Smith e Read, 1997), uma maior densidade de arbúsculos pode implicar em maiores benefícios para a planta, justificando algumas das correlações aqui observadas. Portanto, observa-se alguma relação entre alguns parâmetros da colonização com o crescimento das plantas no estágio fenológico 2 do milho, sendo estes parâmetros de certo modo influenciados pelos produtos aplicados.



**FIGURA 4.** Correlação entre altura de plantas de milho e variáveis da micorrização avaliadas em duas épocas diferentes.

A produção de grãos não apresentou correlação com a colonização, porém correlacionou-se com número de pontos de entrada e densidade arbuscular na 1ª avaliação (Figura 5). Nesta época destacaram-se os tratamentos Mycoform na semente +Mycoform no sulco, Myconate no sulco e Myconate na semente +Mycoform no sulco. Já na segunda avaliação, a colonização micorrízica correlacionou-se positivamente com a produção. A relação entre a produção de grãos e os parâmetros de colonização faz sentido, pois o maior número de pontos de entrada na primeira época favoreceu a colonização, que pode ter favorecido a produção. Nota-se que as plantas que não receberam os estimulantes apresentaram a mais baixa colonização e foram as menos produtivas (Figura 5).

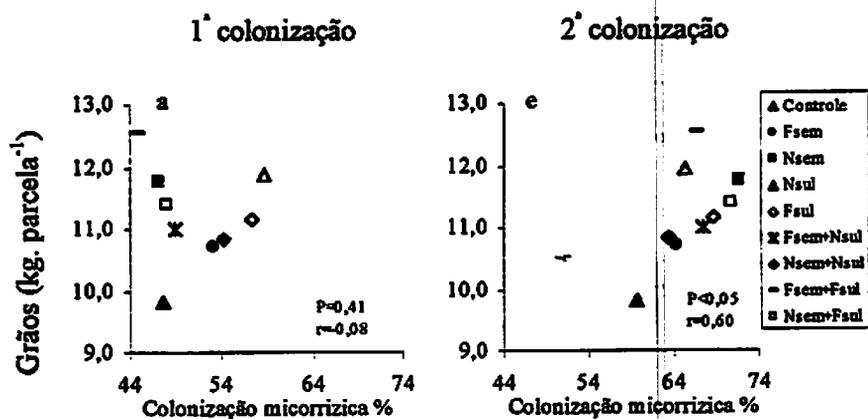
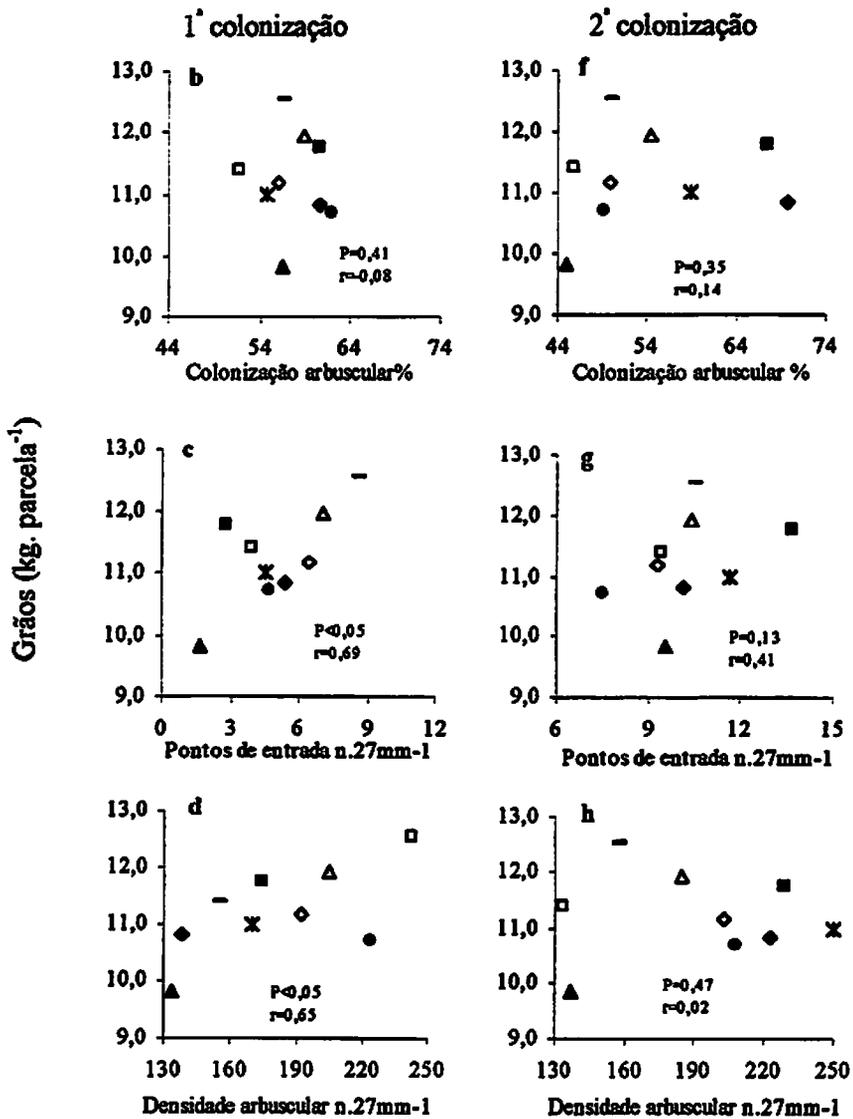
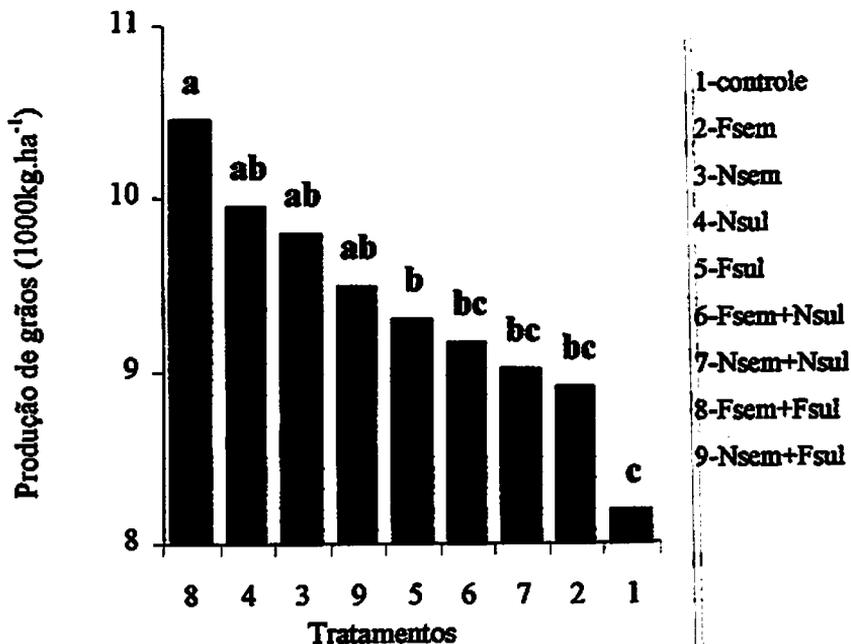


FIGURA 5. Correlação de produção de grãos com as variáveis da micorrização (continua).

FIGURA 5. Cont.



Os dados de produção de grãos por parcela convertidos em produtividade por hectare, encontram-se na Figura 6. Verifica-se que os ganhos de produtividade são evidentes.



**FIGURA 6.** Produção estimada de grãos por hectare. Os tratamentos identificados com letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5%.

Estes representam aumentos de 2.256kg com Mycoform na semente +Mycoform no sulco, 1.754kg com Myconate no sulco, 1.607kg com Myconate na semente, 1.297kg com Myconate na semente +Mycoform no sulco e 1.109kg com Mycoform no sulco por hectare (Tabela 7). A maior eficácia dos tratamentos contendo apenas a formulação Myconate quando comparados com os que contêm apenas a formulação Mycoform deve-se à melhor solubilidade se considerada a taxa aplicada destas, isto se observa, por exemplo, quando aplicado Mycoform na semente +Mycoform no sulco, comparado com o tratamento Myconate na semente ou Myconate no sulco, e o ganho em produtividade que estes tratamentos atingiram. A aplicação dos produtos

estimulantes da micorrização favoreceu o crescimento das plantas no estágio 2 e a produção de grãos com incrementos de até 37,6 sacas.ha<sup>-1</sup> e receita bruta adicional correspondente a R\$ 338,40.ha<sup>-1</sup>. Dentre os tratamentos que se diferenciaram do controle considerando a aplicação de Myconate no sulco, tem-se uma taxa de retorno máxima de 23,3 kg de milho para cada grama de produto aplicado, sendo esta taxa de retorno menor para os outros tratamentos também com efeitos significativos (Tabela 7). No caso do tratamento Myconate no sulco, considerando o custo de US\$ 0,30.g<sup>-1</sup> do produto tem-se uma conversão de 77kg de milho para cada US\$ aplicado.

**TABELA 7. Produtividade média e ganhos de produção do milho em resposta a tratamentos com estimulantes da micorrização.**

Tratamentos	Ganho de produção		Taxa de retorno	Receita bruta adicional	Custo do produto	Receita líquida
	kg.ha <sup>-1</sup>	Sc*.ha <sup>-1</sup>	Kg.g <sup>-1</sup>	R\$.ha <sup>-1</sup>	R\$.ha <sup>-1</sup>	R\$.ha <sup>-1</sup>
Controle	0	0	0	0	0	0
Fsem	720	12,0	8,2	108,00	48,51	59,49
Nsem	1.607	26,8	14,9	241,20	59,18	182,02
Nsul	1.754	29,2	23,3	262,80	41,47	221,33
Fsul	1.109	18,5	17,9	166,50	33,99	132,51
Fsem+Nsul	962	16,0	5,9	144,00	89,98	54,02
Nsem+Nsul	822	13,7	4,5	123,30	100,65	22,65
Fsem+Fsul	2.256	37,6	15,0	338,40	82,50	255,90
Nsem+Fsul	1.297	21,6	7,6	194,40	93,17	101,23

\*sacas de 60 kg a R\$ 9,00 por saca em 08/1999

A viabilidade econômica do uso das formulações de formononetina dependerá também do custo do produto formulado para o produtor. A

VAMTech, que produz a formononetina sintética, oferece o produto formulado para o distribuidor (no atacado, para grandes quantidades) por US\$ 300,00 o kg. Considerando a taxa de aplicação (Tabela 1), de Myconate na semente de  $107,6\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$  e no sulco de  $75,4\text{ g}\cdot\text{ha}^{-1}$ , como também de Mycoform na semente ( $88,2\text{g}\text{ ha}^{-1}$ ) e no sulco ( $61,8\text{g}\text{ ha}^{-1}$ ) e taxa de conversão cambial de US\$ 1= R\$ 1,85, o valor gasto com estes estimulantes varia de R\$ 33,99 para Mycoform no sulco a 100,65 para Myconate na semente +Myconate no sulco, por hectare (Tabela 7). Portanto, a receita líquida potencial é de R\$ 255,90 para Mycoform na semente +Mycoform no sulco, de R\$ 221,33 para Myconate no sulco, de R\$ 182,00 para Myconate na semente, de R\$ 132,51 para Mycoform no sulco e de R\$ 101,23 para Myconate na semente +Mycoform no sulco. Receitas entre R\$ 255,90 e 132,51 são certamente suficientes para cobrir as despesas com distribuição, vendas no varejo e aplicação na lavoura, as quais ainda não podem ser calculadas com precisão. Estes resultados indicam que a aplicação destes produtos é técnica e economicamente viável e que o mesmo apresenta enorme potencial econômico.

Deve-se salientar ainda que não foi realizada adubação com P na cultura, ainda assim a produtividade desta foi elevada e situou-se na média esperada para esta cultivar na região, quando utilizada alta tecnologia. A não aplicação de P é ainda uma vantagem econômica adicional. Se baseado em recomendação, para solo com teor médio de P, seriam aplicados 60 kg de  $\text{P}_2\text{O}_5$  (Raij et al., 1997; Coelho e França, 1995; CFSEMG, 1989), o que certamente seria necessário para alcançar produtividades semelhantes às obtidas aqui com as formulações de formononetina. Este procedimento gera um custo de R\$ 56,00, usando como fonte o Superfosfato simples (16% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) a um custo de R\$ 15,00 a saca de 50kg

Considerando uma área cultivada de 13,7 milhões de hectares e aplicação média de  $75,4\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$ , tem-se um mercado potencial estimado em 1,0

milhão de kg de Myconate (aplicado no sulco) e um negócio de US\$ 300 milhões, se aplicado em toda área cultivada com esta cultura no país. Se o produto tiver aceitação em 10% da área plantada isto representa agronegócio de US\$ 3,0 milhões.ano<sup>-1</sup>, portanto um mercado atrativo para empresas do setor de agrotecnologia. Os resultados obtidos para Myconate aplicado na semente indicam retornos semelhantes ao obtido no sulco e por ser mais facilmente aplicado, oferece maiores possibilidades de aplicação comercial.

Os resultados indicam que os isoflavonóides formulados (Myconate e Mycoform) representam uma tecnologia com fundamentação biológica (natural), portanto ambientalmente saudável, representando um custo entre 4 a 11 sacas de milho por hectare, dependendo do modo a ser aplicado. Mesmo com a taxa US/R\$ atualmente desfavorável, a aplicação de Myconate ou Mycoform é técnica e economicamente viável na cultura do milho.

## 5 CONCLUSÕES

Myconate e Mycoform beneficiaram o desenvolvimento e produtividade do milho com aumento de produção variando de 14 a 28%, dependendo da forma de aplicação.

A aplicação de 75,4 g ha<sup>-1</sup> no sulco ou de 107,6 g ha<sup>-1</sup> na semente de Myconate é viável economicamente, o que não ocorre quando estes são combinados.

A pesar da taxa cambial desfavorável, estes produtos representam receita líquida de R\$ 255,00 a 132,00 por hectare e tem custo estimado de 4 a 11 sacas por hectare.

Estes produtos tem grande mercado potencial no país, sendo este estimado em US\$ 3,0 milhões se empregado em apenas 10% da área cultivada com milho.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAPTISTA, M. J.; SIQUEIRA, J. O. Efeito de flavonóides na germinação de esporos e no crescimento assimbiótico do fungo micorrizico arbuscular *Gigaspora gigantea*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Campinas, v.6, n.2, p 127-34, dez. 1994.
- BÜLL, L. T. Nutrição mineral do milho. In BÜLL, L. T.; CANTARELLA, H. *Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: POTAFOS, 1993. 301p.
- CARGILL. sementes híbridas. *Soluções tecnológicas®*. Andará. [1997?] "folder"
- CLARKSON, A. T. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annual Review of Plant Physiology*. Palo Alto, v.36, p77-115, 1985.
- COELHO A. M. Critérios de seleção de máquinas e implementos agrícolas para a cultura do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. (coord.), *Tecnologia da produção de milho*. Piracicaba: Publique, 1997 p. 1-9.
- COELHO A. M.; FRANÇA, G. E. Seja o doutor do seu milho. Nutrição e adubação. *Informações Agronômicas*, Piracicaba: POTAFOS n.71, p.1-9 set. 1995.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 4ª aproximação*. Lavras, 1989. 176p.

**CORRÊA, L. A. (coord.) Ensaios nacionais de cultivares de milho; superprecoce, precoce, normal 1997/1998. Sete Lagoas: EMBRAPA, 1998. p.iir. (EMBRAPA-CNPMS, documentos, 13).**

**DEY, P. M.; HARBONE, J. B. Plant biochemistry. London: Academic Press. 1997. 554p.**

**FANCELLI, L. A.; DOURADO-NETO, D. Fenologia do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. (Coord.) Tecnologia da produção de milho. Piracicaba: Publique, 1997 p. 131-156.**

**FERSULA ROMERO, A. G.; SIQUEIRA, J. O. Atividade de flavonóides sobre esporos do fungo micorrízico *Gigaspora gigantea* in vitro. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, v.31, n.7, p.517-522, jul. 1996.**

**FRIES, L. L. M. Physiological alterations in mycorrhizal plants as affected by phenolic compounds. East Lansing. Michigan State University, 1995. 135p. (Tese Doutorado em Philosophy).**

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

**FRIES, L. L. M.; PACOVSKY, R. S.; SAFIR, G. R.; SIQUEIRA, J. O. Plant growth and arbuscular mycorrhizal fungal colonization affected by exogenously applied phenolic compounds. *Journal of Chemical Ecology*, East Lansing, v. 23 n.7. p1755-1767, Mar. 1997.**

**GERDEMANN, J. W. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant grow. *Annual Review of Plant Physiology*, Palo Alto, v.6, p. 397-418, 1968.**

- GERDEMANN, J. W.; NICHOLSON, T. H.** Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v.46, n.2, p.235-244, Feb. 1963.
- GIOVANETTI, M.; MOSSE, B.** An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist*, Cambridge, v.84, n.3, p.482-500, 1980.
- HUNGRIA, M.** Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.18, n.3, p.339-364, set./dez. 1994.
- LEYVAL, C.; TURNAU, K.; HASELWANDTER, K.** Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza*, Berlin, v.7, n.3, p.139-153, Sept. 1997.
- LOPES, E. S.; SIQUEIRA, J. O.; ZAMBOLIM, L.** Caracterização das micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento de plantas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.7, n.1, p.1-19, jan./mar. 1983.
- LYNN, D. G.; CHANG, M.** Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Palo Alto, v.41, p.497-526, 1990.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A.** Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319p.
- McGONIGLE, T. P.; MILLER, M. H.; EVANS, D. G.; FAIRCHILD, G. L.; SWAN, J. A.** A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *The New Phytologist*. Cambridge, v.115, n.3, p.495-501, July 1990.

- NAIR, M. G.; BALASUBRAMANIAN, S.; KELLY, J. F.; SCHUTZKI, R. E. WENZL, P.; CHÁVEZ, A. L.** Natural products as potential soil amendments for crop improvement. In: **SIQUEIRA, J. O. (ed.) Inter-relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas.** Lavras, 1999. No prelo.
- 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.
- NELSEN, C. E.** The water relations of vesicular-arbuscular mycorrhizal system. In: **SAFIR, G. R. (ed.) Ecophysiology of VA mycorrhizal Plants.** Boca Raton, Florida: CRC. Press. 1987.p.71-91.
- PAUL, E. A.; CLARK, F. E.** Soil microbiology and biochemistry. California: Academic Press.1996. 340p.
- RABIN, L. B.; PACOVSKY, R. S.** Reduced larva growth of two lepdoptera (Noctuidae) on excised leaves of soybean infected with a mycorrhizal fungus. **Journal of Economic Entomology, Annapolis,** v.78, n.6, p.1358-1363, Dec. 1985.
- RAIJ, B. VAN.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C.** Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo. Campinas: Instituto Agronômico, 1997. 285p. (Boletim 100).
- SAFIR, G. R.; BOYER, J. S.; GERDEMANN, J. W.** Nutrient status and mycorrhizal enhancement of water transport in soybean. **Plant Physiology,** Lancaster, v.49, n.5, p.700-703, May 1972.
- SILVA-JUNIOR, J. P.; SIQUEIRA, J. O.** Aplicação de formononetina sintética ao solo como estimulante da formação de micorriza no milho e soja. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, Campinas,** v.9, n.1, p.35-41, jan. 1997.

- SILVA-JUNIOR, J. P.; SIQUEIRA, J. O.** Colonização micorrízica e crescimento da soja com diferentes fungos e aplicação do isoflavonóide formononetina. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.33, n.6, p. 953-959, jun. 1998.
- SIQUEIRA, J. O.** Eficiência de fertilizantes fosfatados em associações micorrízicas. In: **ENCONTRO NACIONAL DE ROCHA FOSFÁTICA**, 5, 1990, São Paulo. Anais... São Paulo: IBRAFOS, 1990, p.165- 193.
- SIQUEIRA, J. O.** Micorrizas arbusculares. In: **ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M.** (eds.) **Microrganismos de Importância Agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.151-194.
- SIQUEIRA, J. O.; BROWN, D. G.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G.** Field application of the VA-Micorrhiza stimulating isoflavonoid formononetin (Rhizotropin™) on corn and soybean in Brazil. In: **THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MANAGEMENT OF MYCORRHIZAS IN AGRICULTURE, HORTICULTURE AND FORESTRY. Proceedings of...** Perth: University of Western Australia, 1992. 132 p.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A.** **Biotecnologia do solo: Fundamentos e Perspectivas**. Lavras: FAEPE, 1988. 235p.
- SIQUEIRA, J. O.; NAIR, M. G.; HAMMERSCHMIDT, R.; SAFIR, G. R.** Significance of phenolic compounds in plant-soil-microbial systems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Boca Raton, v.10, n.1, p.63-121, 1991.
- SIQUEIRA, J. O.; PEREIRA, M. A. M.; SIMÃO, J. B. P.; MOREIRA, F. M.** Efeitos da Formononetina (7 hidroxí, 4'metoxi isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, v.23, n.3, p.561-567, jul./set. 1999.

**SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G.** VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. *Plant and Soil*, The Hague, v.134, n.2, p.233-242, July 1991a.

**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*, Cambridge, v.118, n.1, p.87-93, May 1991b.

**SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.** The importance of mycorrhizae association in natural low-fertility soils. In: **MACHADO, A.T.; MAGNAVACA, R.; PANDEY, S.; FERREIRA DA SILVA, A.** (eds.) *Simpósio internacional sobre estresse ambiental: O milho em perspectiva*. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1995. p.239-280.

**SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN-JUNIOR, O. J.; FLORES, AYLAS, W. W.; GUIMARÃES, P. T. G.** Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. *Mycorrhiza*, Berlin, v.7, n.6, p.293-300, May 1998.

**SMITH, S. E.; READ, D. J.** *Mycorrhizal symbioses*. California: Academic Press. 1997. 604p.

**SYLVIA, D. M.; WILLIAMS, S. E.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae and environmental stresses. In: **BETHLEFALVAY, G. J.; LINDERMAN, R. G.** *Mycorrhizae in sustainable agriculture*. Madison: American Society of Agronomy, 1992. p.101-124.

**TAIZ, L.; ZEIGERN, E.** *Plant physiology*. Cummings: Redwood City. 1991. 559p.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA- Sistema para Análise Estatística (SAEG): guia de uso resumido.** Viçosa: Fundação Arthur Bernardes/ Divisão de informática, s.d., n.p.

VAMTech L. L. C. Mycoform™ e Mycoform™ . Okemos, [1998?]. folder.

VIERHEILIG, H.; BAGO, B.; ALBRECHT, C.; POULIN, M. J.; PICHE, Y. Flavonoids and arbuscular-mycorrhizal fungi. In: MANTHEY; BUSLIG (eds.) Flavonoids in living system. New York: Plenum Press. 1998. p.9-33.

VOM PINHO, R. G. (coord.) Resultados de demonstração de híbridos comerciais, 1998/99 Lavras: UFLA, 1999 p. irr.

WILSON, J. M. Comparative development of infection by three vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *The New Phytologist*. Cambridge, v.97, n.3 p.413-426, July 1984.

ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A.; SILVEIRA-JUNIOR, P. Sistema de Análise Estatística para Microcomputadores (SANEST). Pelotas: Universidade Federal de Pelotas Departamento de Matemática e Estatística, 1984. 151p.