

**FOSFITO NO CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO
FOSFATADA E ASPECTOS DA INDUÇÃO DE
RESISTÊNCIA EM MILHO**

FABRÍCIO WILLIAM DE ÁVILA

2009

FABRÍCIO WILLIAM DE ÁVILA

**FOSFITO NO CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO FOSFATADA E
ASPECTOS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo, para a
obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Valdemar Faquin

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

Ávila, Fabrício William de.

Fosfito no crescimento, nutrição fosfatada e aspectos da indução de resistência em milho / Fabrício William de Ávila. – Lavras : UFLA, 2009.

74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Valdemar Faquin.

Bibliografia.

1. Fósforo. 2. Cinética. 3. Lignina. 4. *Zea mays*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.15895

FABRÍCIO WILLIAM DE ÁVILA

**FOSFITO NO CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO FOSFATADA E
ASPECTOS DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo, para a
obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2009

Profa. Dra. Janice Guedes de Carvalho UFLA

Prof. Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende UFLA

Prof. Dr. Valdemar Faquin
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

*A Deus, por me dar forças
para vencer mais essa etapa,*

DEDICO.

*Aos meus pais, Lourenço e Maria
e minha irmã, Andreza, pelo
apoio, incentivo e carinho,*

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Mário Lúcio Vilela de Resende e à profa. Janice Guedes de Carvalho, pelos conselhos e sugestões na correção do presente trabalho.

Ao Dr. Pedro Martins Ribeiro Júnior, pela realização das análises de peroxidases, lignina e fenóis totais.

Ao Dr. Luiz Bottino, representante da empresa Quimifol, por ter cedido o ácido fosforoso utilizado nos experimentos.

À doutoranda Sheila Isabel do Carmo Pinto, pela colaboração no ensaio de avaliação dos parâmetros cinéticos.

Aos funcionários do Departamento de Ciência do Solo, em especial ao Roberto, pela orientação no desenvolvimento do trabalho.

A todos os meus familiares, em especial à tia Maria Beatriz de Ávila Miranda e ao tio José Carlos Sinisgali Miranda, pelo incentivo em todos os momentos.

Aos meus amigos, pelos melhores momentos durante o curso.

Aos inesquecíveis amigos de república, prof. Josinaldo Lopes Araújo e Dr. José Zilton Santos, pelo apoio, convívio e espírito de equipe.

A todos que, de uma forma ou de outra, ajudaram na construção deste trabalho.

Um agradecimento especial ao prof. Valdemar Faquin, pela paciência, apoio, confiança, orientação e, acima de tudo, pelos valiosos ensinamentos, tanto na vida profissional quanto pessoal.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 A cultura do milho.....	4
2.2 Fósforo.....	5
2.3 Fosfito na agricultura.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Local de condução do experimento.....	13
3.2 Obtenção do fosfito de potássio.....	13
3.3 Condução do experimento.....	13
3.4 Variáveis analisadas.....	16
3.4.1 Nutrição e crescimento.....	16
3.4.1.1 Área foliar.....	16
3.4.1.2 Massa seca e razão entre raiz e parte aérea.....	16
3.4.1.3 Teores e acúmulo de macros e micronutrientes.....	16
3.4.1.4 Eficiência de absorção, utilização e translocação de fósforo.....	17
3.4.1.5 Teores do P-orgânico, P-inorgânico e P-total solúveis em ácido.....	17
3.4.1.6 Atividade de fosfatases ácidas (AFA, EC 3.1.3.2).....	17
3.4.1.7 Leitura SPAD.....	18
3.4.2 Parâmetros cinéticos de absorção de fosfato.....	18
3.4.3 Aspectos relacionados com a indução de resistência: proteínas e fenóis totais, peroxidases e lignina.....	22

3.4.3.1 Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e da atividade de peroxidases.....	22
3.4.3.1.1 Proteínas totais.....	23
3.4.3.1.2 Atividade de guaiacol peroxidases (POXs, EC 1.11.1.7).....	23
3.4.3.2 Preparo de tecidos foliares para a avaliação de lignina e de fenóis totais solúveis.....	23
3.4.3.2.1 Determinação de lignina solúvel em ácido.....	24
3.4.3.2.2 Determinação de fenóis totais solúveis em ácido.....	25
3.5 Análise estatística.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1 Nutrição fosfatada e crescimento das plantas.....	26
4.2 Parâmetros cinéticos de absorção de fosfato.....	47
4.3 Aspectos relacionados com a indução de resistência.....	56
5 CONCLUSÕES.....	61
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

RESUMO

ÁVILA, Fabrício William de. **Fosfito no crescimento, nutrição fosfatada e aspectos da indução de resistência em milho**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

No presente trabalho foi avaliado o efeito do fornecimento de fosfito sobre o crescimento, nutrição fosfatada e aspectos da indução de resistência em milho. Um experimento em delineamento inteiramente casualizado foi conduzido em solução nutritiva, sob condições de casa de vegetação, onde foram combinadas duas concentrações de P ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$ = baixo fósforo e 20 mg L^{-1} = fósforo adequado) e duas formas de fornecimento de P [uma totalmente na forma de fosfato (Pi) e outra com 1/4 do Pi substituído por fosfito (Phi)]. O experimento foi conduzido com 20 repetições, totalizando 80 parcelas experimentais, sendo cada parcela constituída por uma planta em cada vaso. Dessas repetições, oito de cada tratamento foram destinadas à análise dos parâmetros cinéticos de absorção do ^{31}P na forma de Pi. Para tanto, um ensaio foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em que foram empregados dois tratamentos na solução de cinética (25 mg L^{-1} de P fornecidos totalmente na forma de Pi e 50 mg L^{-1} de P sendo, 25 mg L^{-1} fornecidos na forma de Pi e 25 mg L^{-1} fornecidos na forma de Phi) combinada com os quatro tratamentos a que foram submetidas as plantas, durante o cultivo. Em relação às outras plantas, em seis repetições de cada tratamento foram analisadas as seguintes variáveis: leitura SPAD, área foliar, atividade de fosfatase ácida (AFA), peso de massa seca de parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), acúmulo de P na MSPA, MSR e MST, relação MSR:MSPA, índices de eficiência de utilização (EUP), absorção (EAP) e translocação (ETP) de P e os teores de P-total, P-inorgânico e P-orgânico solúveis em ácido. Nas outras seis repetições restantes foi avaliada a atividade de peroxidases (POXs) e realizada a quantificação dos teores de fenóis totais e lignina. Para as plantas cultivadas em baixo suprimento de P, a substituição de 1/4 do Pi por Phi aumentou consideravelmente os sintomas de deficiência de P. Esse fato foi evidenciado tanto visualmente quanto pela redução de área foliar, menor peso de MSR, MSPA e MST, decréscimo do acúmulo de P nesses tecidos, baixa EUP e elevação da AFA. Já nas plantas cultivadas em adequada concentração de P, o Phi pouco influenciou no crescimento e na nutrição fosfatada dessas, tendo sido constatada somente redução nos teores foliares de P-inorgânico solúveis em

¹Orientador: Prof. Dr. Valdemar Faquin – DCS/UFLA

ácido e menor acúmulo de P na MSPA. Em relação aos parâmetros cinéticos, os valores de K_m para o P_i , independente dos tratamentos de cultivo, foram incrementados pela presença de Phi na solução de cinética, mostrando que o Phi inibe competitivamente a absorção de P_i no milho. Já a V_{max} foi influenciada somente pelas concentrações de P utilizadas no cultivo das plantas, aumentando sobremaneira nos tratamentos com baixo suprimento de P. Foi observado também que a substituição de 1/4 de P_i por Phi na adubação fosfatada promoveu a elevação dos teores de lignina nos tecidos foliares da planta. O mesmo efeito foi evidenciado para atividade de POXs, no caso de plantas supridas adequadamente em P. Esse comportamento torna evidente o efeito eliciador do fosfito sobre os mecanismos de defesa em milho.

ABSTRACT

ÁVILA, Fabrício William de. **Phosphite on the growth, phosphate nutrition and aspects of the induction of resistance in maize**. 2009. 74p. Dissertation (Master in Soil Science) – Federal University of Lavras, Lavras².

The present work was intended to evaluate the effect of supplying of phosphite on the growth, phosphate nutrition and aspects of the induction of resistance in maize. An experiment in a completely randomized design was conducted in nutrient solution under greenhouse conditions, where two concentrations of P (1.6 mg L^{-1} = low phosphorus and 20 mg L^{-1} = adequate phosphorus) were combined with two forms of P supply [one completely in the form of phosphate (Pi) and another with $1/4^{\text{th}}$ of Pi replaced by phosphite (Phi)]. The experiment was conducted with 20 replicates, amounting to 80 experimental plots, being each plot consisting of one plant in each pot. Out of those replicates, eight from each treatment were intended to the investigation of the kinetic parameters of uptake of ^{31}P in the form of Pi. So, a trial was conducted in a completely randomized design, where two treatments were employed in the kinetic solution (25 mg L^{-1} of P supplied wholly in the form of Pi and 50 mg L^{-1} of P, being 25 mg L^{-1} given as Pi and 25 mg L^{-1} supplied as Phi) combined with the four treatments which were submitted to the plants throughout the cultivation. As regards the other plants, in six replicates of each treatment the following variables were studied: SPAD reading, leaf area, acidic phosphatase activity (AFA), weight of the dry matter of shoot (MSPA), root (MSR) and total (MST), P accumulation in the MSPA, MSR and MST, MSR:MSPA ratio, rates of efficiency of utilization (EUP), uptake (EAP) and translocation (ETP) of P and the contents of total P, inorganic P and organic P soluble in acid. In the other six remaining replicates, the activity of peroxidases (POXs) was evaluated and the quantification of the contents of total phenols and lignin accomplished. For the plants grown in low concentration of P, the replacement of $1/4^{\text{th}}$ of Pi by Phi promoted a marked increased in the symptoms of P deficiency. That fact was stressed both visually and by the reduction of the leaf area, decreased weight of MSR, MSPA e MST, decrease of P accumulation in those tissues, low EUP and increase of AFA. However, in the plants grown at adequate concentration of P, Phi little influenced the growth and phosphate nutrition of these, where only reduction in the leaf contents of inorganic P soluble in acid and decreased accumulation of P in MSPA was found. In relation to the kinetic parameters, the values of Km for Pi, independent of the growing treatments were increased by

²Adviser: Prof. Dr. Valdemar Faquin – DCS/UFLA

the presence of Phi in the kinetic solution, showing that Phi inhibit competitively uptake of Pi in maize. But, Vmax was influenced only by the concentrations of P submitted in the cultivation of the plants, greatly increasing in the treatments with low P supply. It was also found that the replacement of 1/4th of Pi by Phi in phosphate fertilization promoted the rise of the lignin contents in the leaf tissues of the plant. The same effect was stressed for activity of POXs in the case of plants adequately supplied in P. That behavior makes clear the elicitor effect of phosphite on the defense mechanisms in maize.

1 INTRODUÇÃO

A deficiência de fósforo (P) é apontada como um dos principais fatores que limitam a produção das culturas em solos tropicais. Mesmo quando fornecido com os fertilizantes, a maior parte do P adicionado é adsorvida em colóides do solo, tornando-se, com o tempo, não-disponível e interferindo negativamente na produção vegetal (Araújo & Machado, 2006).

O P participa de vários processos metabólicos da planta, como transferência de energia, síntese de ácidos nucleicos e glicose, respiração, síntese e estabilidade de membrana, ativação e desativação de enzimas, reações redox, metabolismo de carboidratos e fixação de N₂ (Mengel & Kirby, 2001; Araújo & Machado, 2006).

É amplamente aceito que o fosfato é a única forma de fósforo utilizada pelos vegetais para o seu crescimento e desenvolvimento adequado. Contudo, outra forma de fósforo conhecida por fosfito está sendo amplamente comercializada como fungicida ou como uma fonte superior de P para a nutrição das plantas (Smillie et al., 1989; McDonald et al., 2001; Schroetter et al., 2006).

As pesquisas já realizadas indicam, conclusivamente, que o fosfito é eficiente no controle de diversas doenças, principalmente aquelas causadas por organismos conhecidos por “pseudofungos”, classificados taxonomicamente no filo Oomycota, como, por exemplo, *Phytophthora* sp., *Plasmopara* sp., *Bremia* sp. e *Pythium* sp. (Fenn & Coffey, 1989; Guest et al., 1991; Grant et al., 1992; Griffith et al., 1993; Jackson et al., 2000; Johnson et al., 2004; Sala et al., 2004; Shearer et al., 2007).

Segundo dados disponíveis na literatura, o fosfito pode agir de duas maneiras no controle de doenças de plantas. A primeira é uma ação tóxica direta sobre o patógeno, reduzindo o crescimento micelial, o que foi comprovado por

diversos trabalhos. A segunda é de um modo indireto, no qual o fosfito induz à ativação dos mecanismos de defesa da planta (Nemestothy & Guest, 1990; Jackson et al., 2000). Essa indução de resistência está relacionada com algumas alterações fisiológicas e bioquímicas. A suposição mais aceita é a de que o fosfito intensifica a biossíntese do aminoácido aromático fenilalanina, que é precursor da classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em vegetais, incluindo fitoalexinas, ligninas, antocianinas, cumarinas e flavonoides (Taiz & Zeiger, 2004). Vários trabalhos citam o efeito do fosfito na indução de resistência, porém, poucos comprovam essa ação (Ribeiro Júnior et al., 2006).

Com relação ao uso de fosfito como fonte nutricional de P, o número de trabalhos publicados é restrito, e trabalhos nacionais são quase que inexistentes (Araújo, 2008). No entanto, a utilização de fertilizantes fosfatados à base de fosfito tem se intensificado nos últimos anos. O problema com relação a isso é que não há evidências quanto ao potencial desses fertilizantes para ser utilizado como fonte de P pelos vegetais. Ao contrário, há indicações de que o fosfito não é metabolizado pelas plantas, causando efeitos depressivos sobre seu crescimento (Förster et al., 1998; Ticconi et al., 2001; Schroetter et al., 2006). Outros trabalhos, porém, têm mostrado que esse efeito depressivo é manifestado apenas quando as plantas são cultivadas sob baixo suprimento de P, na forma de fosfato. Nesse caso, tudo indica que o fosfito promove a inibição da expressão de genes relacionados com a ativação dos mecanismos de superação da deficiência de P, como aumento da atividade de fosfatases, síntese de transportadores de alta afinidade para o P e alongação do sistema radicular (Varadarajam et al., 2002; Singh et al., 2003; Lee & Tsai, 2005; Araújo, 2008; Thao et al., 2008).

Assim, com base nesses trabalhos, é evidente que o fosfito não é fonte nutricional de P para as plantas. No entanto, produtores de vários países têm confirmado ganhos de produtividade com a utilização desses fertilizantes como

fonte complementar ou suplementar da adubação fosfatada, o que tem justificado seu uso. As possíveis causas desse comportamento são desconhecidas. As suposições estão relacionadas com alterações fisiológicas e bioquímicas, como a indução de resistência, alterações hormonais e, até mesmo, uma possível influência do fosfito na absorção e no metabolismo do fosfato.

Nesse contexto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do fornecimento de fosfito como parte da adubação fosfatada sobre o crescimento, a nutrição fosfatada e os aspectos da indução de resistência em milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.), pertencente à família Poaceae, é cultivado na América há, aproximadamente, 4.600 anos. Devido à composição química, ao valor nutritivo e ao potencial produtivo, essa cultura desempenha papel fundamental na economia de vários países, sendo a terceira mais cultivada no mundo, ao lado do arroz e do trigo (Carvalho, 2008).

Os Estados Unidos se destacam como o maior produtor desse cereal, respondendo por cerca de 42% da produção mundial. O Brasil é o terceiro maior produtor de milho, atrás apenas dos Estados Unidos e da China. A safra nacional do grão, prevista para o ano agrícola de 2008/2009, é em torno de 53,76 milhões de toneladas, ocupando uma área de, aproximadamente, 14,36 milhões de hectares. Esta é a segunda maior área cultivada do país, atrás apenas da que é ocupada pelo cultivo da soja. Por isso, trata-se de cultura de grande importância econômica e social, apresentando participação significativa no PIB nacional (Anuário da Agricultura Brasileira - Agrianual, 2009).

Entre as principais qualidades do milho destaca-se a sua importância nutricional, sendo considerado uma rica fonte de carboidratos. Tem importância na dieta humana, especialmente para a população de baixa renda dos países da América Central e do Sul, sendo consumido diretamente ou após processamento. No entanto, é na produção animal que o grão exerce papel essencial, sendo o principal componente das rações. Estima-se que cerca de 70% da produção mundial de milho seja destinada à alimentação de aves, suínos e bovinos (Shelton et al., 2002; Marques et al., 2007). Desse modo, o agronegócio do milho interfere diretamente na produção de carne e vice-versa. Ressalta-se, ainda, a grande utilização do milho no sistema de rotação de culturas, exercendo

papel técnico importante na viabilidade e na sustentabilidade do cultivo de outras culturas.

2.2 Fósforo

A baixa disponibilidade de fósforo (P) apresentada nos solos predominantes das regiões tropicais é, sem dúvida, o fator nutricional que mais limita a produção agrícola no Brasil (Sousa et al., 2004). Essa baixa disponibilidade, na maioria das vezes, não está associada à ausência do nutriente, mas, é devido à sua forte interação com a fase sólida do solo, sendo fixado nas argilas ou formando compostos de baixa solubilidade (Novais & Smith, 1999). Segundo Siqueira et al. (2004), em média, menos de 25% do P fornecido nas adubações é aproveitado pelas plantas, sendo o restante retido nas partículas minerais do solo ou precipitado com o ferro e o alumínio. Esse fato exige que as adubações fosfatadas sejam feitas em dosagem muito acima da necessidade das culturas, elevando consideravelmente os custos de produção (Motta et al., 2002; Sousa et al., 2004; Novais et al., 2007).

Além disso, a concentração de P na célula vegetal é da ordem de 100 vezes maior em relação à solução do solo (Novais et al., 2007). Assim, a passagem do P para o simplasma celular é realizada contra um elevado gradiente de concentração, exigindo alta demanda de energia para a geração de um forte potencial eletroquímico. Essa energia é oriunda da bomba de extrusão de prótons através da membrana plasmática gerada pelas ATPases (Faquin, 2005; Araújo & Machado, 2006).

Nesse contexto, associado com a lenta taxa de difusão do P na solução do solo (Novais & Smith, 1999), as plantas, ao longo da evolução, desenvolveram eficientes mecanismos para a aquisição do P (Helyar, 1998; Gahoonia & Nielsen, 2004). Dentre esses, destacam-se a morfologia e a fisiologia do sistema radicular, a solubilização de fosfatos por meio de

exsudatos, as associações com fungos micorrízicos e os eficientes mecanismos de absorção (Theodoru & Plaxton, 1993; Raghothama, 1999; Nagahashi & Douds, 2000; Moreira & Siqueira, 2006).

Os mecanismos de absorção de P têm sido bastante explorados nesses últimos anos, especialmente nos programas de melhoramento. É conhecido que a absorção de P através da membrana celular é mediada por transportadores, que podem ser de alta e de baixa afinidade, o primeiro operando em sistemas que apresentam baixas concentrações do nutriente e o segundo, em concentrações maiores (Epstein & Bloom, 2006). Até o presente, pouco se conhece sobre os transportadores de baixa afinidade. No entanto, diante das baixas concentrações de P usualmente presentes na solução do solo, mesmo em condições de solos férteis, os transportadores de alta afinidade são os que predominam no transporte do P (Araújo & Machado, 2006).

Em geral, o transporte de P através do sistema de alta afinidade obedece ao modelo cinético da atividade enzimática de Michaelis-Menten. Assim, a absorção de P é influenciada pelos parâmetros cinéticos que compreendem a velocidade máxima de absorção (V_{max}), a afinidade dos transportadores pelo P (K_m) e a concentração de P na solução do solo junto às raízes onde o influxo para de ocorrer (C_{min}). Desse modo, cultivares eficientes na absorção de P tendem a apresentar valores altos de V_{max} e baixos para K_m e C_{min} .

Danova-Alt et al. (2008), avaliando os parâmetros cinéticos de absorção do ^{31}P em células de tabaco (*Nicotiana tabacum*), verificaram que, sob baixa concentração de P na solução, o comportamento da absorção do nutriente se ajustou perfeitamente ao modelo de Michaelis-Menten, não tendo o mesmo sido verificado para maiores concentrações de P.

Após ser absorvido, o P é rapidamente incorporado a compostos orgânicos, formando, basicamente, hexose-fosfato e uridina-difosfato, em que, a partir dos quais, irá exercer suas funções. A constituição de ácidos nucleicos,

ATP, enzimas e membranas celulares e a participação em vários processos metabólicos, como transferência de energia, ativação de enzimas, reações redox e metabolismos de carboidratos, são alguns exemplos das funções essenciais do P (Vance et al., 2003; Araújo & Machado, 2006).

Devido a essas funções vitais na planta e associado à sua baixa disponibilidade nos solos, os processos de absorção, armazenamento e assimilação do P são rigorosamente regulados por uma rede integrada de diferentes mecanismos sinalizadores (Raghothama, 1999; Ticconi et al., 2001; Franco-Zorrilla et al., 2004). O princípio molecular desses mecanismos ainda é pouco conhecido. No entanto, são responsáveis diretos pela homeostase da concentração de P existente entre o apoplasma, o citoplasma e o vacúolo celular. Nesse caso, a concentração de P na parte aérea é o centro de controle para essas integradas sinalizações por toda a planta (Lefebvre & Glass, 1982). De acordo com Raghothama (2000), a taxa de absorção de P por unidade de raiz é regulada por dois mecanismos de sinalizadores: um em âmbito celular e outro por meio de múltiplos órgãos que, certamente, estão envolvidos com a parte aérea.

Provavelmente, esses mecanismos de sinalizadores são os responsáveis pela indução de alguns genes da família *Pht1*, em plantas sob deficiência de P (Rausch & Bucher, 2002). A expressão desses genes resulta em uma série de alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que elevam a eficiência na aquisição e na utilização de P pelas plantas, processo esse conhecido como mecanismo de superação da deficiência de P. Como resultado, uma maior quantidade de fotoassimilados é translocada para as raízes, elevando sobremaneira a densidade do sistema radicular, com intensa modificação na arquitetura radicular, aumento e alongamento de pelos radiculares, raízes laterais e proteoides. Além da morfologia radicular, outras alterações importantes são observadas, como elevação na síntese de transportadores de alta afinidade para o P (incrementando sobremaneira a V_{max}); aumento na atividade de fosfatases,

fosfodiesterases, quinases e nucleases, entre outras enzimas; acúmulo de antocianina; maior liberação de exsudatos radiculares e modificações químicas na interface solo-raiz; intensificação na associação com fungos micorrízicos; modificações nos mecanismos de translocação e reutilização de P; alterações na homeostase da concentração de P nos compartimentos celulares e alterações no metabolismo de carboidratos e no crescimento da planta como um todo (Green, 1994; Muchhal et al., 1996; Plaxton, 1996; Helyar, 1998; Raghothama, 1999; Raghothama, 2000; Abel et al., 2000; Ticconi et al., 2001; Alves et al., 2002; Smith, 2002; Varadarajan et al., 2002; Vance et al., 2003; Taiz & Zeiger, 2004; Moor et al., 2005; Araújo & Machado, 2006; Lai et al., 2007; Shachman & Shin, 2007).

2.3 Fosfito na agricultura

É amplamente aceito que o fosfato (H_2PO_4^- e HPO_4^{2-}) é a única forma de P utilizada pelas plantas para seu crescimento e desenvolvimento adequado. Contudo, recentemente, outra forma de P, conhecida como fosfito (H_2PO_3^- , HPO_3^{2-}), está sendo amplamente comercializada como fungicida ou fertilizante fosfatado, sendo considerado um insumo de função mista (Smillie et al., 1989; McDonald et al., 2001; Schroetter et al., 2006; Orbović et al., 2008). No entanto, até o presente, não se conhecem ao certo os reais benefícios que o fosfito pode proporcionar às plantas e qual o seu reflexo na produtividade das culturas.

Na década de 1930, alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar algumas formas de P a serem utilizadas como fertilizantes. Nesses estudos, o fosfito foi considerado uma forma ineficiente de P para as plantas, além de sua conversão a fosfato ser lenta no solo, o que não justificou sua utilização na agricultura (MacIntire et al., 1950; Guest et al., 1991). Nesses trabalhos, constatou-se que o fornecimento de fosfito como suplemento de P em algumas culturas testadas resultou em menor crescimento destas em relação às

que receberam somente fosfato. De posse desses resultados, juntamente com o fato de que o fosfito é uma fonte de P mais cara em relação às tradicionais, o seu uso na produção agrícola foi temporariamente descartado.

No entanto, na década de 1970, foi demonstrado que o etil-fosfonato, produto da reação do fosfito com o etanol, apresentava bons resultados no controle de diversos patógenos de plantas. A partir desses resultados, o produto fosetil-Al passou a ser largamente comercializado como fungicida, com a marca registrada Aliette®. O fosetil-Al possui três íons etil-fosfonatos que são ionicamente ligados a um íon de alumínio (McDonald et al., 2001).

Porém, posteriormente, foi verificado que o fosfito liberado na planta por hidrólise do etil-fosfonato era o responsável pelas propriedades fungicidas do fosetil-Al. Assim, quando a patente do fosetil-Al foi expirada, várias indústrias iniciaram a produção de fungicidas à base de fosfito, pela simples reação do ácido fosforoso com hidróxidos de potássio, cálcio, zinco e cobre, entre outros. Os sais formados a partir de tais reações liberam ânions fosfito na planta e, teoricamente, possuem a mesma eficiência do fosetil-Al no controle de doenças (Fenn & Coffey, 1985; Guest et al., 1991; Grant et al., 1992; Griffith et al., 1993; Schroetter et al., 2006; Araújo, 2008).

Entretanto, na década de 1990, Lovatt (1990), citado por Schroetter et al. (2006), verificou que a deficiência de P em citrus causou alterações no metabolismo do nitrogênio. Por meio da aplicação de fosfito de potássio, o autor observou o restabelecimento do metabolismo normal das plantas, assim como no seu crescimento. Posteriormente, o mesmo autor mostrou que a produção de abacate foi elevada quando o fosfito foi aplicado via foliar. A partir de então, o fosfito passou a ser divulgado como um insumo de ação mista, o qual continha propriedades fungicidas e nutricionais, mais especificamente uma fonte superior de P às plantas. Dessa forma, além de fungicida, os sais de fosfito sob diversos nomes comerciais passaram a ser amplamente comercializados na categoria de

fertilizantes foliares, fertirrigação e alguns para fornecimento diretamente ao solo (Lovatt & Mikkelsen, 2006).

Com relação ao uso do fosfito como fungicida, os trabalhos já realizados indicam, conclusivamente, que o fosfito é eficiente no controle de diversas doenças de plantas, principalmente aquelas causadas por organismos conhecidos por “pseudofungos”, classificados taxonomicamente no filo Oomycota, como, por exemplo, *Phytophthora* sp., *Plasmopara* sp., *Bremia* sp. e *Pythium* sp. (Fenn & Coffey, 1989; Smillie et al., 1989; Guest et al., 1991; Grant et al., 1992; Griffith et al., 1993; Foster et al., 1998; Jackson et al., 2000; Wilkinson et al., 2001; Johnson et al., 2004; Sala et al., 2004; Brackmann et al., 2005; Daniel & Guest, 2006; Ribeiro Júnior et al., 2006; Lovatt & Mikkelsen, 2006; Shearer et al., 2007).

Segundo dados encontrados na literatura, o efeito do fosfito no controle de doenças de plantas baseia-se em dois mecanismos de ação. O primeiro é uma ação tóxica direta sobre o patógeno, reduzindo o crescimento micelial, que foi comprovado por diversos trabalhos (Niere et al., 1994; Darakis et al., 1997; Stehmann & Grant, 2000; Wilkinson et al., 2001). O segundo é de um modo indireto, no qual o fosfito induz à ativação dos mecanismos de defesa da planta (Nemestothy & Guest, 1990; Saindrenat et al., 1990; Jackson et al., 2000; Daniel & Guest, 2006). Esses mecanismos de defesa estão relacionados com a elevação das atividades de inúmeras enzimas que dão origem à síntese de diversos metabólitos secundários, antimicrobianos, produzidos pelas plantas em resposta a estresses abióticos e bióticos (Pascholati & Leite, 1995). Entre esses mecanismos, destacam-se a elevação das atividades de peroxidases, polifenoloxidasas, quitinases e β -1,3-glucanases, entre outras, promovendo o aumento de compostos fenólicos, fitoalexinas, antocianinas, ácido ascórbico e síntese de lignina, além do aumento de outros processos enzimáticos e não enzimáticos relacionados com o sistema antioxidativo das plantas (Cavalcant et

al., 2006; Moor et al., 2009).

Quanto ao efeito nutricional, a utilização de fosfito como fonte de P é questionada. São poucos os trabalhos publicados e nacionais, até o presente, são quase inexistentes (Araújo, 2008). No entanto, esses trabalhos têm demonstrado, de forma inequívoca, que o P, na forma de fosfito, não é metabolizado pelas plantas e as mesmas não conseguem oxidar o fosfito a fosfato para ser metabolizado como tal. Ainda, em condições de deficiência do nutriente, têm sido verificados efeitos depressivos do fosfito sobre o desenvolvimento e o crescimento vegetal, o mesmo não ocorrendo em plantas supridas adequadamente em fosfato (Carswell et al., 1997; Förster et al., 1998; Ticconi et al., 2001; Varadarajan et al., 2002; Lee & Tsai, 2005; Schroetter et al., 2006; Araújo, 2008; Orbović et al., 2008; Thao et al., 2008).

O princípio desse comportamento não está esclarecido, no entanto, há grande indício de que a presença do fosfito no tecido vegetal inibe a expressão de genes que são induzidos pela deficiência de P, responsáveis pela ativação dos mecanismos de superação a essa deficiência. Varadarajan et al. (2002) verificaram que a aplicação foliar de fosfito em tomateiro deficiente em fosfato promoveu reduções consideráveis no comprimento de raízes, na síntese de transportadores de membrana de alta afinidade para o fosfato e na atividade da fosfatase ácida. Resultados parecidos foram obtidos por Ticconi et al. (2001), em *Arabidopsis* sp., por Lee & Tsai (2005), em *Ulva lactuca* e por Schroetter et al. (2006), em milho. Estes últimos autores também observaram que o fosfito possui alta mobilidade no floema e é facilmente absorvido tanto pela raiz quanto pela folha. Além disso, foi verificada alta acumulação de fosfito nas espigas em desenvolvimento, evidenciando a estabilidade desse ânion no tecido vegetal.

Os parâmetros cinéticos de absorção de P também são alterados pelo fosfito. Carswell et al. (1997), trabalhando com *Brassica napus*, verificaram que os valores de Vmax e Km para o P, respectivamente reduziram e aumentaram

com a adição de fosfito no meio de cultivo. Desse modo, parece que existe uma interação antagônica entre os ânions fosfato e fosfito.

Assim, fica evidente que as plantas não se beneficiam do P fornecido na forma de fosfito. No entanto, produtores de vários países utilizam formulações contendo fosfito como uma fonte superior de P para as plantas, fornecidas de forma complementar ou suplementar à adubação fosfatada. Talvez, os efeitos benéficos observados por esses produtores em plantas nutridas adequadamente em P estejam relacionados com as alterações fisiológicas e bioquímicas que o fosfito promove, conforme já comentado ou, até mesmo, devido a uma possível influência do fosfito na absorção e no metabolismo do fosfato. Alguns autores, porém, acreditam que esses efeitos positivos estejam simplesmente relacionados com o controle de patógenos e que, mesmo não apresentando sintomatologia, a presença desses em pequenas proporções pode ser suficiente para reduzir a produção e a qualidade dos produtos (MacDonald et al., 2001).

O fosfito poderia, naturalmente, ser uma fonte de P para as plantas após sua oxidação a fosfato, realizada por bactérias presentes no solo (Carswell et al., 1996; Förster et al., 1998). Contudo, esse procedimento não seria uma forma eficiente de fornecer P ao solo na quantidade requerida pelas plantas.

Desse modo, esse desconhecimento existente quanto ao princípio de ação dos fertilizantes à base de fosfito dá suporte para a sua crescente comercialização como fonte nutricional de P. Nesse contexto, atualmente, há grande necessidade de gerar informações científicas no intuito de definir o “verdadeiro” papel do fosfito na produção vegetal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução do experimento

O presente trabalho foi conduzido em vasos com solução nutritiva, sob condições de casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. O câmpus da UFLA está situado à altitude média de 918 m, nas coordenadas: latitude 21°14'S e longitude 45°00'W GRW. As médias anuais de temperatura do ar, máxima e mínima, são, respectivamente, de 26,1° e 14,4°C, e a temperatura média anual é de 19,4°C. O clima regional é do tipo Cwa, mas apresenta características de Cwb, com duas estações distintas: seca (abril a setembro) e chuvosa (outubro a março), segundo a classificação de Koppen (1970).

3.2 Obtenção do fosfito de potássio

O fosfito utilizado no experimento foi obtido a partir da reação do ácido fosforoso (H_3PO_3) com o hidróxido de potássio (KOH), produzindo-se o fosfito de potássio (KH_2PO_3). O H_3PO_3 foi previamente padronizado com o hidróxido de sódio (NaOH), determinando-se assim a sua concentração exata.

3.3 Condução do experimento

As sementes de milho (*Zea mays* L.), híbrido simples GNZ 2004, foram germinadas em papel germitest, em câmara de germinação. Cinco dias após a germinação, as mudas foram transferidas para bandejas de plástico contendo 36 litros de solução nutritiva a 1/5 de sua força iônica original, sem os tratamentos, até adaptação à solução. A solução nutritiva empregada foi modificada da proposta por Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) que, em 100 % de sua força iônica, sem os tratamentos, continha: 0,5 mmol L⁻¹ N-NH₄⁺; 7 mmol L⁻¹ N-NO₃⁻;

0,64 mmol L⁻¹ P; 3,0 mmol L⁻¹ K; 2 mmol L⁻¹ Ca; 1 mmol L⁻¹ Mg; 1 mmol L⁻¹ S; 70 µmol L⁻¹ Fe-EDTA; 46,30 µmol L⁻¹ B; 9,11 µmol L⁻¹ Mn; 2 µmol L⁻¹ Zn; 0,5 µmol L⁻¹ Cu e 0,1 µmol L⁻¹ Mo. Decorridos cinco dias, as plantas foram selecionadas conforme a uniformidade em tamanho e área foliar e transferidas definitivamente para vasos de plástico contendo três litros de solução nutritiva a 2/5 de sua força iônica original, com as devidas modificações para as concentrações de P referente aos respectivos tratamentos. A substituição da solução foi realizada duas vezes por semana; a cada substituição, a força iônica foi acrescida em 1/5, até atingir força iônica total, que ocorreu aos 11 dias após o transplante aos vasos definitivos. O volume de solução dos vasos foi completado diariamente com água deionizada e o pH corrigido para 5,5 (± 0,2), pela adição de NaOH ou HCl, 0,5 mol L⁻¹. A solução nutritiva foi aerada constantemente.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, no qual foram combinadas duas concentrações de P na solução nutritiva (1,6 mg L⁻¹ = baixa concentração de P e 20 mg L⁻¹ = adequada concentração de P) e duas formas de P [totalmente na forma de fosfato (Pi) e 3/4 fornecidos na forma de Pi + 1/4 fornecidos na forma de fosfito (Phi)], conforme descrito na Tabela 1. A parcela experimental foi constituída por uma planta em cada vaso, tendo, para cada tratamento, sido empregadas 20 repetições, totalizando 80 parcelas experimentais.

Passados 14 dias após a emergência (DAE), oito repetições de cada tratamento foram levadas para câmara de crescimento, onde permaneceram, por cinco dias, para adaptação ao ambiente controlado. Posteriormente, nessas plantas, foi realizada a análise quantitativa dos parâmetros cinéticos de absorção do ³¹P na forma de fosfato (H₂³¹PO₄⁻).

As outras doze repetições foram coletadas aos 21 DAE. Nesse dia, antes da colheita das plantas, foi realizada, em seis repetições de cada tratamento, a leitura SPAD no limbo foliar da primeira e da segunda folha totalmente

TABELA 1 Descrição dos tratamentos aplicados às plantas de milho.

Tratamentos
Plantas cultivadas sob concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi.
Plantas cultivadas sob concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P na solução nutritiva, sendo $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ (3/4) fornecido na forma de Pi e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (1/4) na forma de Phi.
Plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi.
Plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L^{-1} (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L^{-1} (1/4) na forma de Phi.

expandida a partir do ápice da planta (penúltima e última folhas a se tornarem totalmente expandidas).

Posteriormente, nessas mesmas plantas, o limbo foliar da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta foi coletado para avaliação da atividade de fosfatases ácidas e determinação dos teores de P-total (fósforo total), P-inorgânico (fósforo inorgânico) e P-orgânico (fósforo orgânico) solúveis em ácido perclórico. Logo depois, as plantas foram colhidas e separadas em raízes e parte aérea e todas as folhas foram destacadas do colmo para avaliação da área total de limbo foliar por planta. Posteriormente, foram determinados os pesos da massa seca de raiz e parte aérea e analisados os teores de macros e micronutrientes nesses tecidos.

Nas outras seis repetições restantes de cada tratamento, também no limbo foliar da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta, foram feitas amostragens do tecido vegetal para a avaliação da atividade de peroxidases e a quantificação dos teores de proteínas e fenóis totais e lignina.

Estas variáveis estão fortemente relacionadas com a indução de resistência das plantas.

3.4 Variáveis analisadas

3.4.1 Nutrição e crescimento

3.4.1.1 Área foliar

Logo após a colheita das seis repetições de cada tratamento, todas as folhas foram destacadas do colmo e a área total de todos os limbos foliares de cada planta foi determinada por meio do medidor de área foliar *Transparent Belt Conveyor* modelo LI-3050A LI-COR (inc. Lincoln, USA).

3.4.1.2 Massa seca e razão entre raiz e parte aérea

Nas seis repetições de cada tratamento, as raízes e a parte aérea das plantas foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação forçada de ar, a 65°-70°C, até atingirem peso constante. Procedeu-se, então, a determinação dos pesos da massa seca desses tecidos, utilizando-se balança semi-analítica. De posse dos resultados, obteve-se a relação entre os pesos da massa seca de raiz e da parte aérea.

3.4.1.3 Teores e acúmulo de macros e micronutrientes

As análises dos teores de macros e micronutrientes no tecido vegetal das seis repetições de cada tratamento foram realizadas conforme descrito por Malavolta et al. (1997). Para tanto, após a determinação do peso de massa seca, as raízes e a parte aérea das plantas foram moídas em moinho do tipo Willey e submetidas à digestão nitricoperclórica para posteriores análises dos macros e micronutrientes. As determinações dos teores de P foram realizadas por colorimetria; de K, por fotometria; de S, por turbidimetria e os de Ca, Mg, Mn, Cu, Zn e Fe por espectrofotometria de absorção atômica. Para a análise dos

teores de N, foi realizada a digestão sulfúrica do material vegetal e a quantificação do N feita pelo método semimicro Kjeldahl. O B foi extraído por incineração e seus teores determinados por colorimetria.

Relacionando-se os teores dos nutrientes com a massa seca produzida em cada parte, determinou-se o acúmulo desses nutrientes nas plantas.

3.4.1.4 Eficiência de absorção, utilização e translocação de fósforo

A eficiência de absorção de fósforo (EAP) foi determinada, de acordo com Swiader et al. (1994), pela fórmula:

$$EAP = (\text{acúmulo total do nutriente na planta})/(\text{massa seca de raízes})$$

A eficiência de utilização de fósforo (EUP) foi obtida conforme Siddiqi & Glass (1981) por meio da equação:

$$EUP = (\text{massa seca total})^2/(\text{acúmulo total de P})$$

A eficiência de translocação de fósforo (ETP) para a parte aérea foi calculada, de acordo com Li et al. (1991), pela fórmula:

$$ETP = (\text{acúmulo de P na parte aérea})/(\text{acúmulo total de P na planta})$$

3.4.1.5 Teores de P-orgânico, P-inorgânico e P-total solúveis em ácido

O fracionamento do P das seis repetições de cada tratamento foi realizado conforme Hogue et al. (1970), modificado por Fernandes et al. (2000). Para tanto, foram tomados 0,5 g de tecido foliar fresco do limbo foliar da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta e determinaram-se as seguintes frações de P solúveis em ácido perclórico: P-orgânico (fósforo orgânico), P-inorgânico (fósforo inorgânico) e P-total (fósforo total).

3.4.1.6 Atividade de fosfatases ácidas (AFA, EC 3.1.3.2)

A atividade *in vivo* de fosfatases ácidas das seis repetições de cada tratamento foi realizada no limbo foliar fresco da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta. Para tanto, aproximadamente 200 mg de discos foliares com 0,5 cm de diâmetro foram transferidos para tubos de ensaios envolvidos com papel alumínio e incubados, a 30°C, em banho-maria, com 8 mL de paranitrofenilfosfato a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão-acetato de sódio 0,1 mol L^{-1} , com pH ajustado para 5,0. Após 20 minutos de incubação, foram tomadas alíquotas de 5 mL do meio de reação, às quais foram adicionados 2 mL de NaOH 2,0 mol L^{-1} para, imediatamente, serem feitas as leituras por colorimetria, em espectrofotômetro a 410 nanômetros (Silva & Basso, 1993).

3.4.1.7 Leitura SPAD

A leitura SPAD das seis repetições de cada tratamento foi realizada nos limbos foliares da primeira e da segunda folha totalmente expandida a partir do ápice da planta, utilizando-se o aparelho Minolta SPAD-502 (Blackmer & Schepers, 1995).

3.4.2 Parâmetros cinéticos de absorção de fosfato

O objetivo central deste ensaio foi verificar se o fornecimento de fosfito na solução nutritiva pode exercer alguma influência nos parâmetros cinéticos de absorção de fosfato. Para tanto, foi realizado o estudo da cinética de absorção do ^{31}P na forma de fosfato (Pi , $\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$), por meio do método da depleção de Pi da solução, conforme descrito por Claassen & Barber (1974), utilizando plantas de milho intactas.

Conforme já enunciado, aos oito dias após a transferência para os vasos definitivos, oito repetições de cada tratamento foram transferidas para a câmara de crescimento, onde as plantas ficaram por cinco dias para adaptação ao ambiente controlado, ajustado para as seguintes condições: fotoperíodo de 16

horas, temperatura diurna e noturna, respectivamente, de 26° e 18°C, umidade relativa variando entre 60% e 80% e irradiação de 540 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nesse período, a solução nutritiva foi trocada normalmente duas vezes por semana, conforme os procedimentos adotados anteriormente, sendo o volume dos vasos completado diariamente com água deionizada e o pH corrigido para 5,5($\pm$ 0,2) pela adição de NaOH ou HCl, 0,5 mol L⁻¹.

Após esse período de adaptação das plantas, seis repetições de cada tratamento (totalizando 24 vasos) foram selecionadas quanto à uniformidade em tamanho e área foliar para posterior realização do ensaio de cinética. Este ensaio, que foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, constou do emprego de duas concentrações de P na solução de cinética [25 mg L⁻¹ de P fornecidos totalmente na forma de Pi e 50 mg L⁻¹ de P sendo, 25 mg L⁻¹ fornecidos na forma de Pi e 25 mg L⁻¹ fornecidos na forma de fosfito (Phi)] combinada com os quatro tratamentos que foram submetidos às plantas durante o cultivo (Tabela 2).

Para tanto, a 48 horas do início do ensaio de absorção de fosfato, procedeu-se à troca da solução por outra, com a força iônica reduzida a 1/10 da solução anterior, omitindo-se o P. A exclusão do P desta solução tem por finalidade elevar a capacidade das raízes em absorver o nutriente (Jungk & Barber, 1975).

Posteriormente, após 46 horas, a solução foi novamente renovada com outra, com composição e força iônica idêntica à anterior, mas, com omissão do Fe-EDTA e adicionando-se 20 μmol de P na forma de Pi. As plantas ficaram submetidas a essa solução por um período de duas horas, procedimento este necessário para que o sistema atingisse as condições de estado estacionário de absorção de fosfato, requerido para a aplicação do modelo cinético (Epstein & Hagen, 1952).

Ao término deste período, as plantas foram transferidas para outros

TABELA 2 Descrição do delineamento empregado no milho para a realização do ensaio de cinética de absorção de fosfato.

Solução de cinética	Tratamentos aplicados às plantas durante o cultivo
Concentração inicial de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de P fornecidos na forma de fosfato (Pi, $\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$).	Plantas cultivadas sob concentração de 1,6 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi.
	Plantas cultivadas sob concentração de 1,6 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L^{-1} (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L^{-1} (1/4), na forma de Phi.
	Plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi.
	Plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L^{-1} (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L^{-1} (1/4), na forma de Phi.
Concentração inicial de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de P, sendo 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ fornecidos na forma de Pi e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ fornecidos na forma de fosfito (Phi, $\text{H}_2^{31}\text{PO}_3^-$).	Plantas cultivadas sob concentração de 1,6 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi.
	Plantas cultivadas sob concentração de 1,6 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L^{-1} (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L^{-1} (1/4) na forma de Phi.
	Plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi.
	Plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L^{-1} (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L^{-1} (1/4) na forma de Phi.

vasos iguais aos anteriores, contendo a solução de absorção (ou solução de cinética) com composição e força iônica idênticas à anterior, excetuando-se as concentrações e as formas de P, que foram ajustadas conforme os tratamentos (Tabela 2). A partir de então, iniciou-se o estudo de cinética de absorção do $\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$ propriamente dita. Para tanto, durante um período de 14 horas, a intervalos de uma hora, alíquotas de 10 mL da solução foram amostradas para posterior análise da concentração do ânion Pi. A amostragem das alíquotas teve início no tempo zero, totalizando 15 amostragens para cada vaso.

Logo após o término do ensaio de cinética, o volume final da solução restante nos vasos foi quantificado. Nessa mesma ocasião, o sistema radicular das plantas foi separado da parte aérea e lavado em água corrente e destilada. Após secagem em papel toalha, o peso fresco das raízes foi determinado.

A dosagem do Pi nas alíquotas foi feita por colorimetria, utilizando-se o ácido ascórbico como agente redutor (Murphy & Riley, 1962). As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de marca Femto, modelo 600S, com lâmpada de tungstênio/halogênio e cubeta de quartzo, com dimensões de 1, 2,5 e 8 centímetros, respectivamente, de largura, altura e comprimento. Ensaio preliminares da quantificação da dosagem de Pi com essa metodologia foram realizados, com ênfase na precisão e na exatidão, obtendo-se um limite de detecção de, aproximadamente, $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ressalta-se, ainda, que a metodologia utilizada permite somente a quantificação do P na forma de Pi, não detectando de forma alguma a presença de P na forma de Phi.

De posse dos teores de P na solução de depleção em seus respectivos tempos de amostragem, bem como os dados relativos ao volume inicial e final de solução nos vasos e o peso fresco das raízes, foram determinados os valores dos parâmetros cinéticos Km e Vmax e obtida a curva de depleção do Pi, utilizando-se para isso o *software* Cinética 2.0 (Ruiz & Fernandes Filho, 1992). O valor da Cmin foi obtido a partir do cálculo da média dos valores de

concentração de Pi na solução de depleção, os quais apresentaram tendência de permanecer constantes nas amostragens finais da curva de depleção, conforme Faquin et al. (1990).

A determinação do influxo radicular líquido de Pi foi feita por meio da equação de Michaelis-Menten modificada, na qual se introduziu a Cmin na equação original: $\text{influxo líquido} = [V_{\text{max}} (C - C_{\text{min}})] / [K_m + (C - C_{\text{min}})]$, sendo que C = concentração do Pi na solução; Vmax = taxa máxima de absorção; Km = constante de Michaelis-Menten e Cmin = concentração de Pi na solução em que o influxo líquido se iguala a zero. Os valores de Vmax e influxo líquido foram expressos por unidade de peso fresco de raiz ($\mu\text{mol Pi g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

3.4.3 Aspectos relacionados com a indução de resistência: proteínas e fenóis totais, peroxidases e lignina

Em outras seis repetições de cada tratamento foram realizadas amostragens do limbo foliar da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta. Essas amostras foram envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e, após o congelamento, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer a -80°C , até o preparo do material para as análises bioquímicas. As análises, em triplicatas, foram realizadas no Laboratório de Fisiologia do Parasitismo, no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG.

3.4.3.1 Preparo de extratos foliares para a avaliação de proteínas totais e da atividade de peroxidases

Os tecidos foliares das seis repetições de cada tratamento foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, aproximadamente 1 g desse pó foi depositado em um tubo, ao qual se adicionou o tampão acetato de sódio 50 mmol L^{-1} , com o pH

ajustado para 5,2, contendo 0,1 mmol L⁻¹ de EDTA (foram adicionados 10 mL de tampão para cada grama de amostra) e homogeneizou-se por 10 segundos, em agitação. Após esse processo, a suspensão foi centrifugada, a 12.000 g, por 15 minutos com a temperatura ajustada em 2°C e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático (Ribeiro Júnior et al., 2006).

3.4.3.1.1 Proteínas totais

A concentração de proteína total das seis repetições de cada tratamento foi aferida conforme o método proposto por Bradford (1976), com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 595 nanômetros.

3.4.3.1.2 Atividade de guaiacol peroxidases (POXs, EC 1.11.1.7)

A atividade de guaiacol peroxidases das seis repetições de cada tratamento foi determinada pela adição de 20 µL do extrato enzimático em uma solução ajustada para 220 µL, contendo acetato de sódio 50 mmol L⁻¹, com o pH ajustado para 5,2, guaiacol 20 mmol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio 60 mmol L⁻¹ em microplaca de 96 cavidades, com capacidade de 350 µL por cavidade. Após incubação, a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida em um leitor EIA-compatível a 480 nanômetros (Urbanek et al., 1991). Uma unidade de atividade de POXs (UA) foi expressa como a variação na absorbância a 480 nanômetros por miligrama de proteína total por minuto (mg proteína min⁻¹).

3.4.3.2 Preparo de tecidos foliares para a avaliação de lignina e de fenóis solúveis totais

Os tecidos foliares das seis repetições de cada tratamento foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo, até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 12 horas. Uma

alíquota de 30 mg do material liofilizado foi transferida para microtubos de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida sob agitação, por 15 horas, em agitador rotativo, protegido da luz, à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 12.000 g, por 10 minutos. O sobrenadante (extrato metanólico) foi transferido para outros microtubos, com o qual se realizou a determinação de fenóis solúveis totais, enquanto o resíduo sólido foi utilizado para determinação de lignina, conforme descrito a seguir.

3.4.3.2.1 Determinação de lignina solúvel em ácido

Para a determinação da concentração de lignina solúvel em ácido das seis repetições de cada tratamento, foi adicionado ao resíduo sólido 1,5 mL de água ultrapura, no qual foi homogeneizado e centrifugado, a 12.000 g, por 5 minutos, a 2°C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo foi seco, a 65°C, por 15 horas. Posteriormente, acrescentou-se 1,5 mL de uma mistura de ácido tioglicólico e ácido clorídrico 2 mol L⁻¹ (1:10, v/v). Em seguida, agitaram-se suavemente os microtubos para hidratar o resíduo e estes foram colocados em banho-maria, por 4 horas, a 100°C.

Posteriormente, os microtubos foram centrifugados, a 12.000 g, por 10 minutos, a 2°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1,5 mL em água ultrapura e novamente centrifugado, a 12.000 g, por 10 minutos, a 2°C.

A seguir, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1,5 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹ e mantido em agitador rotativo, por 15 horas, à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada, a 12.000 g, por 10 minutos, a 2°C e o sobrenadante transferido para outro microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em câmara fria (2°C), por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico. Em seguida, a mistura foi centrifugada, a 12.000 g, por 10

minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 2 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹.

A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro, a 280 nanômetros e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em micrograma de lignina solúvel por miligrama de massa seca (adaptado de Doster & Bostock, 1988).

3.4.3.2.2 Determinação de fenóis totais solúveis em ácido

Para a determinação da concentração de fenóis totais solúveis das seis repetições de cada tratamento, alíquotas de 150 µL do extrato metanólico foram misturadas a 150 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N, por 5 minutos, homogeneizadas com 150 µL de Na₂CO₃ 1 mol L⁻¹, por 10 minutos e diluídas em 1 mL de água ultrapura, à temperatura ambiente, por uma hora.

Os valores de absorbância desta reação foram determinados a 725 nanômetros, em espectrofotômetro e calculados com base em curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente de micrograma de catecol por miligrama de massa seca (Spanos & Wrolstad, 1990).

3.5 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sisvar (Ferreira, 2000). Os dados experimentais foram submetidos à análise de variância, a 5% de probabilidade pelo teste de F. Quando houve efeito significativo dos tratamentos, as suas médias foram comparadas por meio do teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Pelo software SAEG versão 9.1 (Fundação Arthur Bernardes, 2007), foram realizadas análises de correlações de Pearson para algumas variáveis em estudo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Nutrição fosfatada e crescimento das plantas

O efeito do fosfito (Phi) sobre o crescimento do milho foi significativo somente nas plantas submetidas à baixa concentração de fósforo (P). Nessa concentração ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P), as análises de variância dos dados obtidos mostraram que a substituição de 1/4 do fosfato (Pi) por Phi (tratamento 1,2Pi+0,4Phi) promoveu reduções consideráveis na produção de massa seca de raízes, parte aérea e total. Em média, essas reduções foram, respectivamente, de 20%, 17% e 18%, quando comparadas à de plantas que receberam somente Pi como fonte de P (tratamento 1,6Pi) (Figura 1). Também na dose de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P, a área total de limbo foliar por planta foi reduzida em 20% no tratamento 1,2Pi+0,4Phi (Figura 2). Esses resultados deixam claro que o Phi não substituiu o Pi na nutrição de P dessas plantas. Associado a esse fato, o fosfito pode também ter exercido um efeito tóxico, conforme relatado por alguns autores, para plantas deficientes em P (Ticconi et al., 2001; Varadarajan et al., 2002; Lee & Tsai, 2005; Araújo, 2008; Orbović et al., 2008). Esse assunto será abordado com maior detalhe mais adiante.

Já para as plantas cultivadas em 20 mg L^{-1} de P, o fornecimento de 1/4 do P na forma de Phi (tratamento 15Pi+5Phi) não influenciou significativamente a produção de massa seca e área de limbo foliar por planta, quando comparadas às plantas cultivadas somente com Pi (tratamento 20Pi) (Figuras 1 e 2). Nesse caso, os 15 mg L^{-1} de P, fornecidos na forma de Pi no tratamento 15Pi+5Phi, foram suficientes para um adequado crescimento das plantas. Porém, observa-se que houve uma tendência de redução na produção de massa seca no tratamento 15Pi+5Phi em relação ao tratamento 20Pi, apesar de estatisticamente ter sido consideradas iguais (Tukey, $p \leq 0,05$).

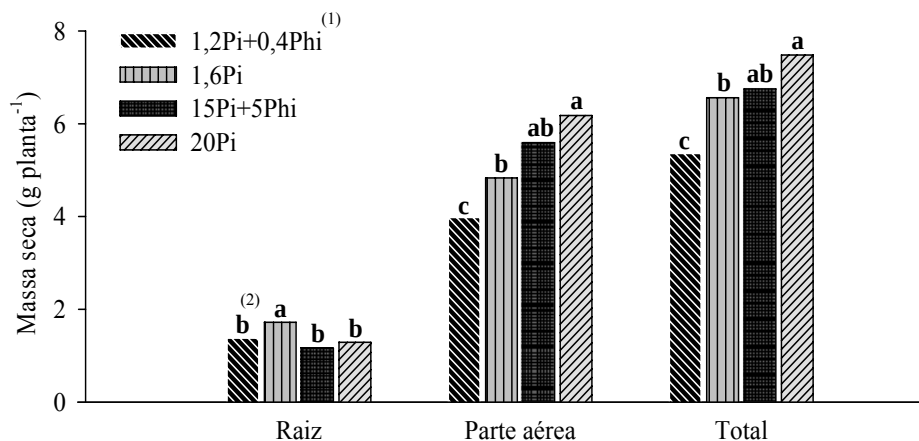


FIGURA 1 Massa seca de raiz, parte aérea e total por planta, em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo.

⁽¹⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

⁽²⁾ Dentro de raiz, parte aérea e total, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

O efeito negativo do Phi sobre as plantas cultivadas em 1,6 mg L⁻¹ pode ser verificado visualmente durante a condução do experimento, conforme apresentado na Figura 3. Observou-se que, em baixa concentração de P, os sintomas de deficiência do nutriente foram evidentes nas plantas submetidas ao tratamento 1,2Pi+0,4Phi, em relação ao tratamento 1,6Pi, indicando que o Phi não foi capaz de substituir o Pi na nutrição em P. Entre esses sintomas se destacaram os menores crescimentos da parte aérea e raiz, redução da área de limbo foliar e coloração arroxeada das folhas (acúmulo de antocianina), mais intensa na bainha foliar (parte da folha que sobrepõem o colmo da planta), conforme apresentado na Figura 3.

As causas dos sintomas da deficiência de P nas plantas já estão bem

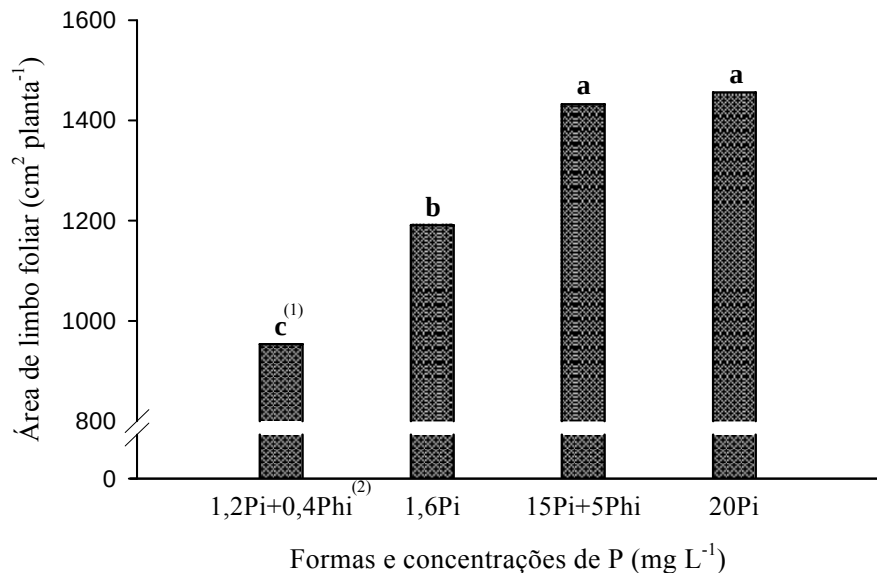


FIGURA 2 Área total de limbo foliar por planta em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo.

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

esclarecidas. O P participa de vários processos metabólicos dos vegetais, como transferência de energia, síntese de ácidos nucleicos, glicose, respiração, síntese e estabilidade de membranas, ativação e desativação de enzimas, reações redox e metabolismo de carboidratos, além de ser constituinte de importantes estruturas celulares, como os ácidos nucleicos e os fosfolipídios de membranas (Vance et al., 2003; Epstein & Bloom, 2006). Desse modo, a deficiência desse nutriente causa uma série de distúrbios bioquímicos e fisiológicos, culminando no menor crescimento e expansão foliar da planta.

Até o momento, são poucos os trabalhos existentes que relacionam o Phi

(a)



20Pi⁽¹⁾

15Pi+5Phi

1,6Pi

1,2Pi+0,4Phi

(b)



1,2Pi+0,4Phi

1,6Pi

15Pi+5Phi

20Pi

FIGURA 3 Aspectos da parte aérea (a) e raízes (b) do milho, aos 15 dias após a transplantio.

⁽¹⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

com a nutrição e o crescimento das plantas, em âmbito nacional, os trabalhos são quase que inexistentes.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram os encontrados por Schrötter et al. (2006) para o crescimento do milho. O mesmo tem sido observado para outras espécies vegetais, como em *Brassica nigra* (Carswell et al., 1996), tomate e pimentão cultivados em solução nutritiva (Förster et al., 1998), *Arabidopsis* spp. (Ticconi et al., 2001), mudas de tomate (Varadarajan et al., 2002), *Brassica napus* (Singh et al., 2003), *Ulva lactuca* (Lee & Tsai, 2005), *Brassica rapa* cultivada em solo e solução nutritiva (Thao et al., 2008) e feijoeiro cultivado em solução nutritiva (Araújo, 2008). Nesses trabalhos também foi constatado que o Phi não substituiu o Pi na nutrição fosfatada das plantas. Além disso, esses autores relataram que, em geral, a utilização do Phi como única fonte de P promoveu reduções significativas no crescimento das plantas, quando comparadas aos tratamentos que não receberam adubação com P ou receberam em quantidades insuficientes. Assim, foi sugerido um potencial efeito tóxico do fosfito em plantas cultivadas sob baixo suprimento de Pi. Porém, o mesmo não ocorre quando estas são submetidas a concentrações adequadas de Pi.

As causas desse efeito ainda não estão bem elucidadas. A hipótese mais aceita até o presente é que os vegetais não metabolizam o Phi, o qual, após absorvido, se mantém estável nos compartimentos celulares. Ainda de acordo com os autores, o Phi tem ação repressora nos mecanismos de superação da deficiência de P, como a elevação da taxa de crescimento do sistema radicular e da síntese de fosfatases, fosfodiesterases, nucleases e transportadores de membrana para o P de alta afinidade. O mais provável é que os mecanismos moleculares responsáveis pela sinalização da deficiência de P não discernem o Pi do Phi. Desse modo, não ocorre a expressão de genes responsáveis pela transcrição de proteínas correspondentes aos mecanismos de resposta à

deficiência de P. Conforme Singh et al. (2003), o efeito deletério do Phi não é específico, uma vez que, sob suprimento adequado de Pi, ele tem sido pouco pronunciado, o que reforça as hipóteses acima.

No entanto, recentemente, estudos realizados em células de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) *in vivo*, utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear do ^{31}P (RMN ^{31}P), permitiram, pela primeira vez, acompanhar a compartimentação intracelular do Phi (Danova-Alt et al., 2008). Esses estudos mostraram que grande parte do Phi celular se apresenta no vacúolo e no citoplasma, respectivamente, sob adequado e baixo suprimento de Pi. Também os autores observaram que um pequeno influxo de Pi pelas células foi suficiente para gerar o efluxo de Phi do citoplasma para o vacúolo e o apoplasma. Esses resultados demonstraram que o efeito depressivo do Phi nos tecidos vegetais pode não estar somente relacionado com a inibição da indução dos mecanismos de deficiência de P, pois, no caso de as plantas não apresentarem sintomas de toxidez de Phi quando bem nutridas em Pi, pode simplesmente ser explicado pela compartimentação de grande parte do Phi no vacúolo celular.

No gráfico da Figura 4 é mostrada a relação entre a produção de massa seca de raiz e a parte aérea do milho. Os resultados foram significativos somente entre baixa ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$) e adequada (20 mg L^{-1}) concentração de P. Observa-se que não houve diferenças entre os tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi, o mesmo ocorrendo entre os tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi, mostrando que a substituição de parte do Pi por Phi não influenciou nessa variável. Esses resultados contrariam os encontrados em outros trabalhos relacionados ao assunto, no qual se demonstrou que o fornecimento do Phi às plantas cultivadas sob baixa concentração de Pi, promove redução significativa na produção de massa seca de raiz, interferindo negativamente na relação entre a massa seca de raiz e parte aérea (Ticconi et al., 2001; Araújo, 2008; Orbović et al., 2008; Thao et al., 2008).

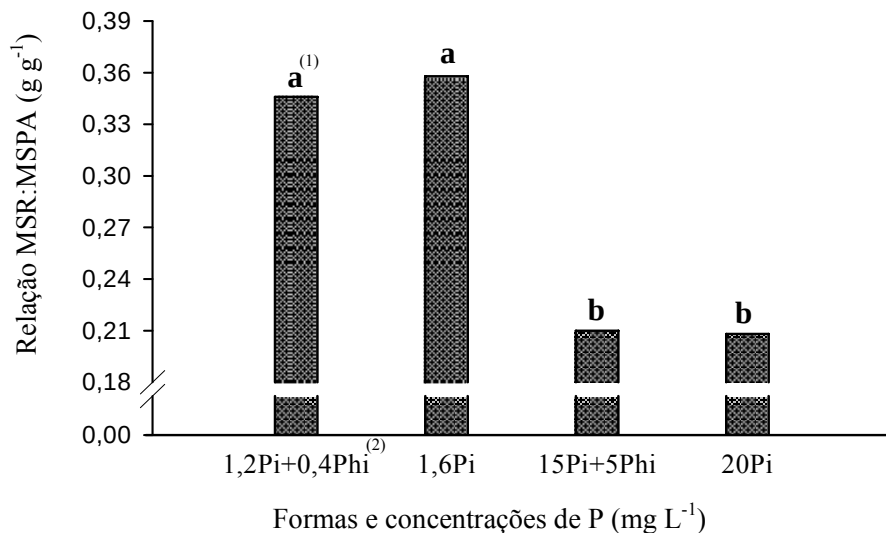


FIGURA 4 Relação entre a massa seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA) do milho, em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo.

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

A elevação na taxa de produção de massa seca de raiz, devido à baixa disponibilidade de P, constitui um dos mecanismos de superação de deficiência de P. Sob tal situação, as plantas promovem maior translocação de fotoassimilados para o sistema radicular, objetivando maior exploração do meio de cultivo. Por outro lado, o desenvolvimento vegetativo da parte aérea é reduzido, diminuindo-se a área fotossinteticamente ativa. Conforme já comentado, o Phi inibe os mecanismos que são ativados em condições de deficiência de P, interferindo negativamente na taxa de crescimento radicular e, consequentemente, reduzindo a relação entre massa seca de raiz e parte aérea. No entanto, outros fatores também estão relacionados com o aumento da

densidade radicular de plantas com deficiência de P. Conforme citado por Fernandes & Souza (2006), a absorção do P através das membranas celulares ocorre logo nas células epidérmicas ou nas primeiras camadas de células corticais, significando que seu percurso através das raízes, até a área vascular das plantas, ocorre quase que totalmente no simplasma. Assim, as raízes possuem “prioridade” na incorporação do P absorvido, conforme sua demanda metabólica em detrimento da parte aérea, o que justifica o crescimento proporcionalmente maior do sistema radicular em relação à parte aérea em condições de deficiência de P.

Quanto à nutrição fosfatada do milho, observou-se que o acúmulo de P na massa seca de raiz (MSR), parte aérea (MSPA) e total (MST) foi afetado significativamente pelos tratamentos (Figura 5). Na MSPA e MST, a ordem crescente do acúmulo de P em função dos tratamentos foi $1,2\text{Pi}+0,4\text{Phi}<1,6\text{Pi}<15\text{Pi}+5\text{Phi}<20\text{Pi}$, enquanto que, na MSR, o acúmulo de P em função dos tratamentos se apresentou na seguinte ordem $15\text{Pi}+5\text{Phi} = 20\text{Pi}<1,2\text{Pi}+0,4\text{Phi}<1,6\text{Pi}$. Ressalta-se que o valor do acúmulo do nutriente na planta é diretamente proporcional à produção de massa seca, o que justifica os resultados encontrados para o acúmulo de P neste trabalho, que foram maiores na MSPA e na MST nos tratamentos que receberam 20 mg L^{-1} e, na MSR, ao contrário dos anteriores, em que os maiores valores foram nos tratamentos com baixa dose de P ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$).

Entretanto, observa-se que, tanto na dose de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P (tratamentos $1,2\text{Pi}+0,4\text{Phi}$ e $1,6\text{Pi}$) quanto na 20 mg L^{-1} de P (tratamentos $15\text{Pi}+5\text{Phi}$ e 20Pi), a substituição de $1/4$ de Pi por Phi promoveu a redução do acúmulo de P na MSPA e MST. Ainda, em baixa concentração de P ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$), o tratamento que recebeu Phi também apresentou redução no acúmulo de P na MSR. Esse comportamento pode estar relacionado com os danos que o Phi

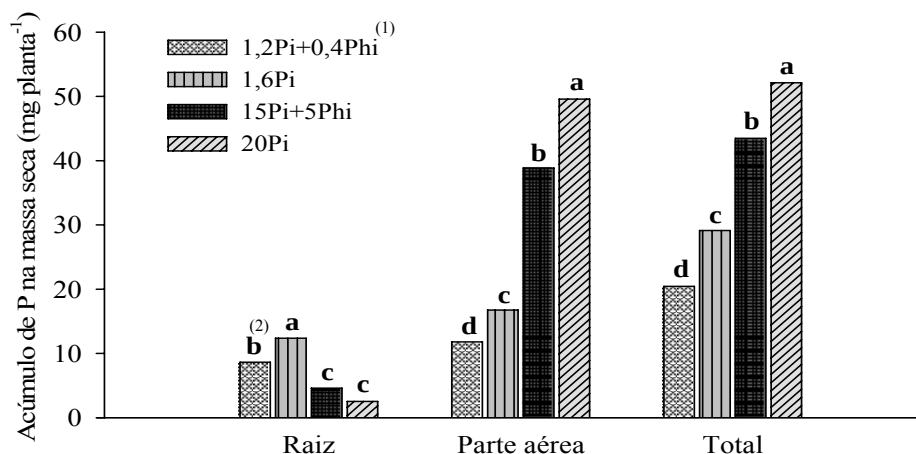


FIGURA 5 Acúmulo de P nas massas secas de raiz, parte aérea e total, em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo.

⁽¹⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

⁽²⁾ Dentro de raiz, parte aérea e total, médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

promove no sistema radicular das plantas, interferindo negativamente na absorção do P. Ressalta-se que o acúmulo de P neste trabalho se refere ao P total contido nos tecidos da planta, independente de sua forma (Pi, Phi e P-orgânico).

Os resultados obtidos em outras pesquisas que relacionam a aplicação de Phi e o acúmulo de P na planta são contrastantes. Schrötter et al. (2006), em trabalhos realizados com milho em vasos com solo, encontraram elevação no acúmulo de P na planta com a substituição do Pi por Phi na adubação fosfatada, mesmo ocorrendo redução na produção da MST. Segundo os autores, o Phi é facilmente absorvido pelas raízes e tem alta mobilidade nos vasos condutores. Entretanto, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho, Thao et al.

(2008), em estudos realizados com komatsuna (*Brassica rapa* var. peruviridis) cultivada em solução nutritiva, encontraram reduções sucessivas no acúmulo de P na MSPA e na MSR à medida que a proporção Phi:Pi foi se elevando, para uma mesma dose de P.

De posse dos resultados da produção de massa seca e acúmulo de P, foram calculados os índices de eficiência de utilização (EUP), absorção (EAP) e translocação (ETP) para o nutriente (Figuras 6 e 7).

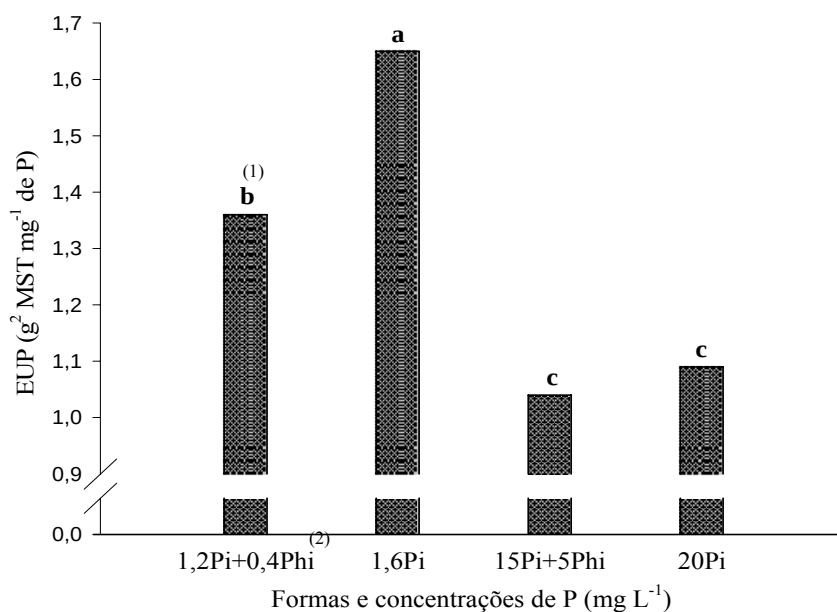


FIGURA 6 Eficiência de utilização de P (EUP) pelo milho, em função das concentrações e formas de P fornecidas na solução de cultivo. EUP = (g² de massa seca total da planta/mg de P acumulado na planta).

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

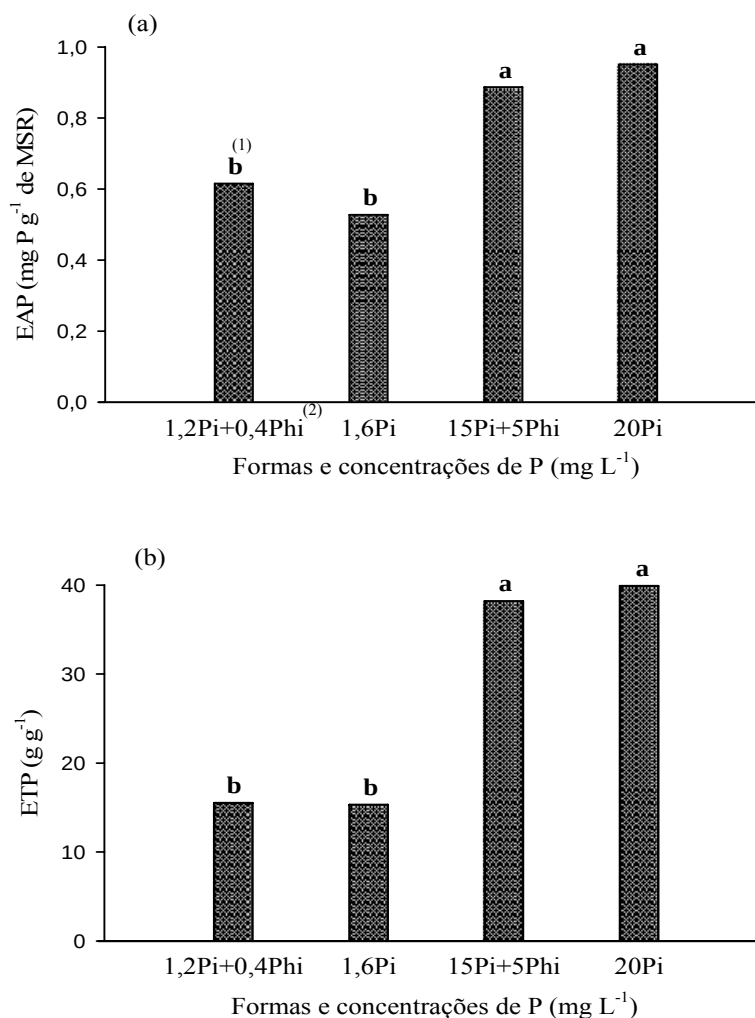


FIGURA 7 Eficiência de absorção (EAP) (a) e translocação de P (b) pelo milho, em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo. EAP = (mg de P na massa seca total/g de massa seca de raiz); ETP = (g de P na parte aérea/g de P na massa seca total).

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

As plantas cultivadas sob deficiência de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi) apresentaram os maiores índices de EUP em relação às cultivadas com adequado fornecimento de P (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi). Esse comportamento tem sido observado em outros trabalhos (Furlani et al., 1990; Machado et al., 2001), pois, conforme já comentado, a planta deficiente em P induz a expressão de genes responsáveis pela transcrição de proteínas relacionadas com os mecanismos de superação a essa deficiência, cujo objetivo central é elevar a eficiência nutricional do P. Em relação ao efeito do Phi, observa-se que, sob baixa concentração de P ($1,6 \text{ mg L}^{-1}$), a substituição de 1/4 de Pi por Phi (tratamento 1,2Pi+0,4Phi) promoveu redução na EUP (Figura 6) que foi, aproximadamente, 18% menor em relação às plantas que receberam somente Pi como fonte de P (tratamento 1,6Pi). Esse resultado teve como reflexo a menor produção de biomassa, conforme observado no tratamento 1,2Pi+0,4Phi (Figuras 1 e 3).

No entanto, os índices de EAP e ETP, ao contrário da EUP, foram maiores nos tratamentos supridos adequadamente em P (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi). Nesse caso, analisando-se as equações utilizadas nesse trabalho para o cálculo da EAP ($\text{EAP} = \text{acúmulo de P na massa seca total} / \text{massa seca de raiz}$) e ETP ($\text{ETP} = \text{acúmulo de P na massa seca de parte aérea} / \text{acúmulo de P na massa seca total}$), verifica-se que esse comportamento está diretamente relacionado com o maior acúmulo de P nas massas secas da parte aérea e total apresentado nos tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi (Figura 5). Contudo, a substituição de parte do Pi por Phi não influenciou os valores da EAP e ETP, observados tanto nos tratamentos com baixo (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi) quanto com adequado (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi) suprimento de P (Figura 7).

O gráfico da Figura 8 mostra os resultados dos teores das frações de P solúveis em ácido perclórico (P-total, P-orgânico e P-inorgânico) analisados no limbo foliar da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta.

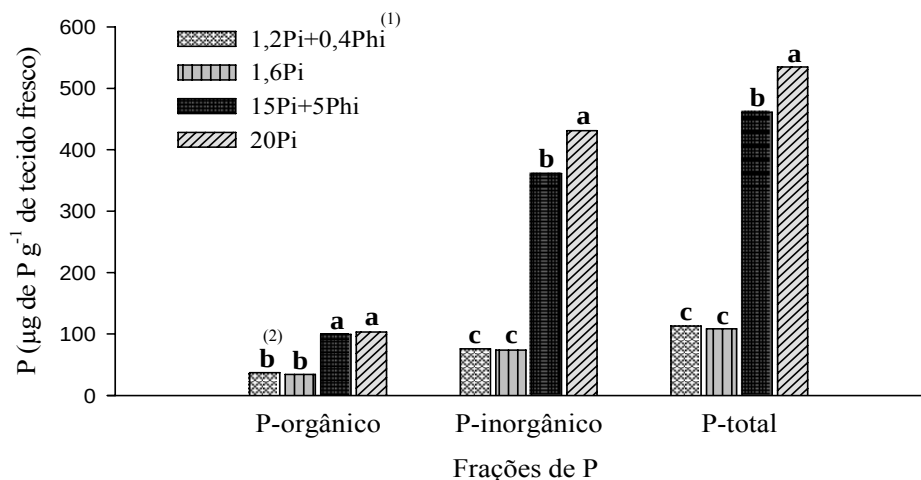


FIGURA 8 Frações de fósforo solúveis em ácido perclórico no limbo da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice, em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo.

⁽¹⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

⁽²⁾ Dentro de cada fração de P (P-orgânico, P-inorgânico e P-total) médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

Observa-se, como já era esperado, que os maiores valores para essas variáveis foram obtidos com adequado suprimento de P (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi) em relação aos tratamentos que foram submetidos à baixa concentração do nutriente (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi). Porém, essa diferença foi bem maior para o P-inorgânico e P-total em relação ao P-orgânico. Em condições de baixo suprimento de P, em média, o P-inorgânico contribuiu com 64% do P-total. Em contrapartida, sob suprimento adequado de P, este valor subiu para 79%. Outros trabalhos têm mostrado resultados semelhantes (Caradus et al., 1998; Fernandes et al., 2000). Isso ocorre porque, sob baixo suprimento de P, o Pi absorvido é incorporado rapidamente a compostos orgânicos. Já em condições

de suprimento adequado de P, a maior parte do P-inorgânico absorvido fica armazenada nos compartimentos celulares, constituindo o “consumo de luxo” (Faquin, 2005). Quanto ao efeito do Phi, este promoveu reduções nos teores de P-inorgânico e P-total dos tratamentos conduzidos com suprimento adequado de P. O tratamento 15Pi+5Phi obteve redução de, aproximadamente, 17% no teor de P-inorgânico, em relação ao tratamento 20Pi.

Ressalta-se que, provavelmente, o mais correto seria chamar o P-total de P-orgânico + P-inorgânico + Phi-solúvel em ácido e o P-orgânico de P-orgânico + Phi-solúvel em ácido, uma vez que o Phi não consegue ser contabilizado na análise de P-inorgânico realizada pelo método colorimétrico. Já na análise do P-total, o Phi é oxidado a Pi por meio do extrato originado de uma digestão nítrico-perclórica a cerca de 200°C. Neste trabalho, não foi realizada análise de Phi no tecido vegetal, porém, certamente, seria de grande importância a separação do Phi das outras frações solúveis em ácido, de forma a não ser confundido com o P-orgânico, o qual é obtido apenas por diferença entre o P-total e o P-inorgânico. Também, a realização da quantificação de Phi nos tecidos da planta permitiria verificar a sua estabilidade e uma eventual ocorrência de oxidação de Phi a Pi ou, até mesmo, se o Phi estaria sendo metabolizado pela planta. Em estudos analíticos de fertilizantes, é comum a realização de análises de Phi por meio de sua oxidação a Pi para posterior quantificação por colorimetria. Porém, no caso de tecidos vegetais, durante a extração do P-inorgânico para posterior análise, mesmo que seja extraído em água, compostos orgânicos solúveis também são extraídos. Nesse caso, ao oxidar o Phi a Pi, o P-orgânico também é transformado a Pi, o que irá superestimar o valor de Phi. Assim, para material vegetal, os métodos seguros de quantificação de Phi até o presente são os que o quantificam de forma direta, sem que ocorra a formação de Pi. Entre essas metodologias, a mais utilizada é a cromatografia iônica (Jackson

et al., 2000; Schroetter et al., 2006; Thao et al., 2008). A voltametria parece ser um método promissor (Ito et al., 2002).

O gráfico da Figura 9 demonstra os resultados para a atividade de fosfatases ácidas (AFA, EC 3.1.3.2) *in vivo* nos tecidos do limbo da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice do milho, em função dos tratamentos fornecidos na solução nutritiva.

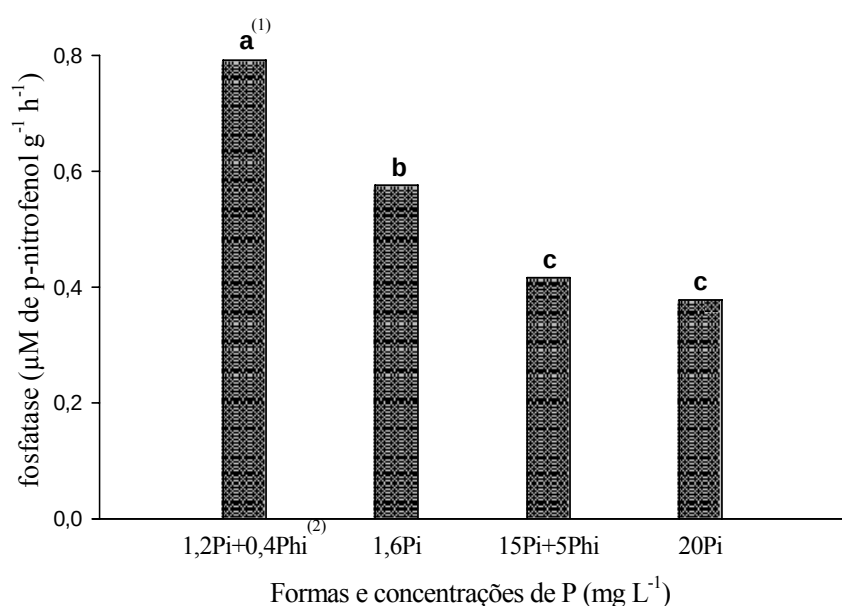


FIGURA 9 Atividade de fosfatases ácidas (AFA) *in vivo* nos tecidos do limbo da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice do milho, em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo. Atividade de fosfatases ácidas = [(μM de p-nitrofenol)/(g de massa fresca hora⁻¹)].

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

Observa-se que os maiores valores da AFA foram obtidos nos tratamentos submetidos ao baixo suprimento de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi), em relação aos tratamentos que receberam adequadamente o nutriente (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi). Dentre os tratamentos com baixa dose de P, o que teve parte do Pi substituído pelo Phi (tratamento 1,2Pi+0,4Phi) apresentou maior AFA em comparação ao submetido somente ao Pi (tratamento 1,6Pi). Conforme já comentado nesse trabalho, à medida que a deficiência de P se torna mais severa na planta, a AFA tende a se elevar, constituindo um dos mecanismos de superação de deficiência de P (Ticconi et al., 2001; Lee & Tsai, 2005).

Dessa maneira, a AFA, neste trabalho, corrobora a informação de que o Phi não nutriu a planta em P, tendo o tratamento 1,2Pi+0,4Phi apresentado maior severidade nos sintomas de deficiência de P em relação ao tratamento 1,6Pi (Figura 3), bem como para a produção de massa seca e área foliar (Figuras 1 e 2), acúmulo de P (Figura 5) e EUP (Figura 6). Porém, esses resultados para a AFA discordam dos relatos de outros trabalhos em que, em condição de baixo suprimento de P, a adição de fosfito tende a inibir a indução dos mecanismos de superação de P, entre eles, a atividade da fosfatase ácida (Singh et al., 2003; Araújo, 2008). É importante ressaltar que, neste trabalho, foi avaliada apenas a substituição de 1/4 do Pi pelo Phi. Nesse caso, proporcionalmente, a concentração de Pi na solução de cultivo foi maior que a de Phi, o que pode ter inibido parte dos efeitos tóxicos do fosfito na planta. Conforme já comentado, um pequeno influxo de Pi para o interior das células já é suficiente para gerar o efluxo do Phi do citoplasma para o vacúolo e o apoplasto (Danova-Alt et al., 2008). Ainda destaca-se que a análise da AFA neste trabalho foi feita somente nos tecidos foliares. Porém, caso tivesse sido realizada a AFA nos tecidos do sistema radicular, talvez o resultado fosse diferente, já que, sob baixo suprimento de P, a massa seca de raiz foi significativamente reduzida no

tratamento com Phi, sendo o aumento da massa radicular também um dos mecanismos de superação de deficiência de P.

O estudo dos coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis analisadas confirma, em grande parte, os resultados discutidos anteriormente (Tabela 3). Verifica-se que a MSR não se correlacionou com a MSPA e MST. No entanto, houve forte correlação positiva da MSR com a EUP, P acumulado na MSR e relação MSR:MSPA. Em função dessa boa correlação observada entre a MSR e o P acumulado na MSR, sugere-se que o comportamento das raízes observado neste experimento teve forte influência dos tratamentos. No geral, as variáveis MSR (com exceção das correlações entre MSR com a MST e MSPA), P acumulado na MSR, EUP (com exceção da correlação entre EUP e MST) e AFA se correlacionaram positivamente entre si e negativamente com as demais variáveis. Já a MSPA e o P acumulado na MSPA se correlacionaram positivamente entre si, negativamente com a MSR (com exceção da correlação entre MSPA e MSR), P acumulado na MSR, EUP e AFA e positivamente com as demais variáveis.

Observa-se que essas correlações estão de acordo com o comportamento verificado das variáveis aos respectivos tratamentos a que foram submetidas as plantas. Os valores das variáveis MSPA, MST, P acumulado na MSPA e MST, área do limbo foliar, EAP, ETP e P-orgânico, P-inorgânico e P-total solúveis, em geral, foram reduzidos nos tratamentos submetidos ao baixo suprimento de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi), enquanto os valores das variáveis MSR, P acumulado na MSR, relação MSR:MSPA, EUP e AFA se elevaram nesses tratamentos. As possíveis causas para esses resultados já foram comentadas anteriormente. Observa-se também que a AFA teve boa correlação com o P-acumulado na MSPA e com o P inorgânico solúvel, reforçando as sugestões sobre o potencial da AFA para o diagnóstico da nutrição fosfatada das plantas (Araújo, 2008).

TABELA 3 Coeficientes de correlação de Pearson entre a massa seca de raiz (MSR) e parte aérea (MSPA), P acumulado na MSR e MSPA, eficiência de utilização de P (EUP) e atividade de fosfatase ácida (AFA) com as demais variáveis analisadas para o crescimento e a nutrição fosfatada do milho.

Variáveis	MSR	MSPA	P acumulado na MSR	P acumulado na MSPA	EUP	AFA
MST	0,05 ^{ns}	0,97***	-0,45*	0,79***	-0,23 ^{ns}	-0,74***
Área do limbo foliar	-0,41*	0,90***	-0,60**	0,86***	-0,46*	-0,89***
Relação MSR:MSPA	0,80***	-0,78***	0,80***	-0,89***	0,75***	0,78***
P acumulado na MST	-0,44*	0,94***	-0,67**	0,98***	-0,77***	-0,80***
EAP	-0,66**	0,84***	-0,70***	0,97***	-0,83***	-0,78***
ETP	-0,69***	0,73***	-0,97***	0,91***	-0,71***	-0,74***
P-orgânico solúvel	-0,59**	0,65**	-0,73***	0,83***	-0,76***	-0,55**
P-inorgânico solúvel	-0,56**	0,87***	-0,81***	0,99***	-0,78***	-0,79***
P-total solúvel	-0,58**	0,83***	-0,82***	0,88***	-0,69***	-0,73***
AFA	0,36*	-0,80***	0,58**	-0,78***	0,47*	-
EUP	0,78***	-0,45*	0,67**	-0,76***	-	-
P acumulado na MSPA	-0,50**	0,91***	-0,79***	-	-	-
P acumulado na MSR	0,76***	-0,58**	-	-	-	-
MSPA	-0,28 ^{ns}	-	-	-	-	-

*, ** e *** Valores significativos, respectivamente, a 5%, 1% e 0,1% de probabilidade.

^{ns} Não significativo, a 5% de probabilidade.

Neste trabalho, quanto aos aspectos nutricionais das plantas, foi dada ênfase à nutrição fosfatada. No entanto, o efeito dos tratamentos sobre os outros nutrientes também foi analisado. Os dados da Tabela 4 mostram o acúmulo dos nutrientes na MSR e MSPA em função dos tratamentos. Observa-se que, tanto na baixa dose de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi) quanto na adequada (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi), a substituição de 1/4 do Pi por Phi reduziu fortemente o acúmulo de S e elevou o de Zn na MSPA. Sugere-se que o ânion Phi pode ter competido fortemente com o SO_4^{2-} e reduzido a interação antagônica existente entre Pi e Zn.

Com relação aos tratamentos submetidos à baixa dose de P, o Phi também promoveu redução no acúmulo de N na MSPA. Nesse caso, esse resultado deve estar relacionado à menor produção de MSPA. Entretanto, foi na MSR e nos tratamentos com suprimento adequado de P que se verificou um maior efeito do Phi sobre o acúmulo de nutrientes. Observa-se que o tratamento 15Pi+5Phi obteve o maior acúmulo de Ca, Fe, Mn, Zn e Cu na MSR. Como já demonstrado, não houve diferença significativa na MSR em relação aos tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi (Figura 1). Assim, parece que o Phi favorece a absorção de Ca e de micronutrientes catiônicos. Os estudos que relacionam os aspectos nutricionais e a aplicação de Phi em seres vivos ainda são restritos. Lee & Tsai (2005), avaliando o efeito do Phi em alface-do-mar (*Ulva lactuca*) cultivada em solução nutritiva, não encontraram respostas para os teores de N. Orbović et al. (2008) também não encontraram efeito do fosfito sobre os teores de Ca, Mg, K na massa seca de mudas de citrus cultivadas em solução nutritiva. Entretanto, esses autores não avaliaram o acúmulo dos nutrientes na planta, o que torna difícil fazer inferências sobre a absorção dos mesmos, pois, quando o crescimento da planta é reduzido, pode ocorrer o “efeito de concentração” para alguns nutrientes, que é a elevação de seus teores nos tecidos, mesmo sendo absorvido em menor quantidade pela planta (Faquin, 2005).

TABELA 4 Acúmulo dos nutrientes na MSPA e MSR do milho.

Nutrientes	Tratamentos ⁽¹⁾			
	1,2Pi+0,4Phi	1,6 Pi	15Pi+5Phi	20 Pi
Parte aérea				
----- mg planta ⁻¹ -----				
N	180,18 c ⁽²⁾	221,24 b	268,73 a	296,88 a
P	11,8 d	16,76 c	38,86 b	49,58 a
K	98,79 b	89,22 b	146,54 a	145,16 a
Ca	17,01 c	19,61 bc	23,51 ab	28,78 a
MG	12,01 b	13,64 b	16,77 a	17,69 a
S	10,34 d	14,38 b	10,62 d	18,40 a
----- µg planta ⁻¹ -----				
Fe	592,66 a	570,32 a	663,57 a	715,22 a
Mn	768,74 b	763,19 b	1313,55 a	1348,04 a
Zn	303,73 c	263,52 d	429,60 a	376,41 b
Cu	39,67 a	47,96 a	46,13 a	48,83 a
B	95,36 b	89,08 b	151,66 a	163,55 a
Raiz				
----- mg planta ⁻¹ -----				
N	42,57 a	49,38 a	42,83 a	42,34 a
P	8,64 b	12,36 a	4,61 c	2,54 c
K	40,48 a	34,31 a	32,25 a	32,12 a
Ca	2,16 c	1,80 c	7,18 a	5,12 b
MG	3,35 b	3,93 b	5,26 a	5,34 a
S	4,10 a	3,85 ab	3,03 b	4,27 a
----- µg planta ⁻¹ -----				
Fe	2464,44 c	2687,18 c	4368,05 a	3590,34 b
Mn	349,91 c	203,85 c	1686,57 a	1018,45 b
Zn	84,28 c	74,95 c	222,94 a	187,95 b
Cu	46,48 c	48,34 c	176,84 a	125,70 b
B	31,51 ab	33,87 a	20,94 b	24,61 ab

⁽¹⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

⁽²⁾ Médias seguidas de letras iguais na linha não diferem entre si (Tukey, 5%).

O gráfico da Figura 10 demonstra os valores da leitura SPAD realizada nos limbos foliares da primeira e da segunda folha totalmente expandida a partir do ápice do milho, em função dos tratamentos. Observa-se que tanto na baixa dose de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi) quanto na adequada (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi), os tratamentos com Phi não alteraram essa variável. A leitura SPAD, que constitui numa estimativa do teor de clorofila na folha, possui relação direta com o teor foliar de N, com a vantagem de não ser influenciado pelo “consumo de luxo” desse nutriente sob a forma de nitrato (Blackmer & Schepers, 1995).

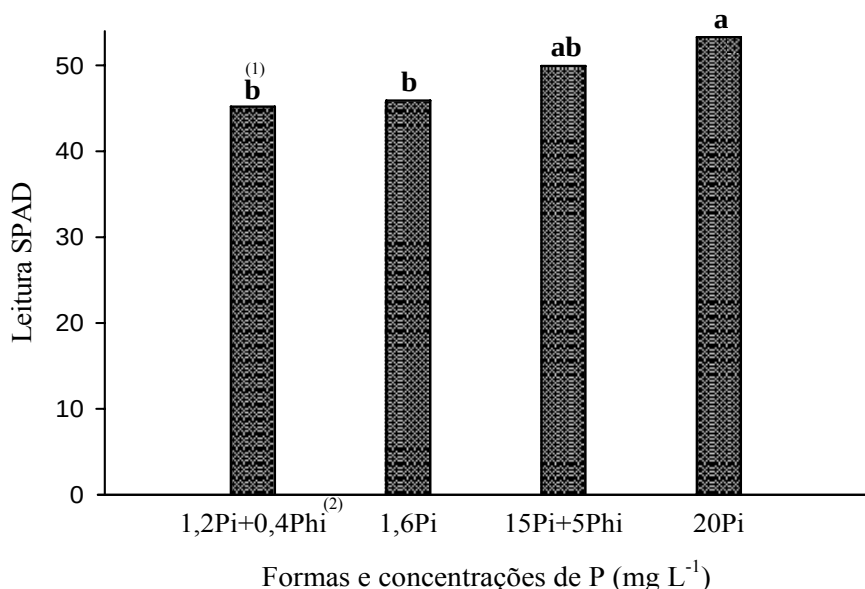


FIGURA 10 Valores da leitura SPAD nos limbos da primeira e da segunda folha totalmente expandida a partir do ápice do milho em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo.

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

4.2 Parâmetros cinéticos de absorção de fosfato

O estudo de cinética foi realizado sob baixa concentração de P na solução, visando atingir somente a primeira isoterma de absorção do nutriente correspondente ao mecanismo de absorção de alta afinidade, que é saturável e obedece ao modelo cinético enzimático de Michaelis-Menten (Faquin, 2005; Epstein & Bloom, 2006; Fernandes & Souza, 2006; Danova-Alt et al., 2008).

No gráfico da Figura 11 observa-se a curva de depleção do ^{31}P na forma de Pi ($\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$) da solução de cinética, em função do tempo de absorção, conforme os tratamentos. Verificou-se que, independente dos tratamentos aplicados na solução de cinética (Pi e $\text{Pi}+\text{Phi}$), a depleção do Pi da solução pelas plantas submetidas ao baixo suprimento de P durante o cultivo (tratamentos $1,2\text{Pi}+0,4\text{Phi}$ e $1,6\text{Pi}$) foi muito mais rápido do que as cultivadas sob adequado fornecimento de P (tratamentos $15\text{Pi}+5\text{Phi}$ e 20Pi). Já, analisando-se os tratamentos dentro de uma mesma concentração de P fornecida durante o cultivo, observa-se que, de maneira geral, o fornecimento de Phi , tanto na solução de cinética quanto durante o cultivo das plantas, tornaram mais lenta a depleção do Pi da solução. Porém, o fornecimento adicional de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Phi na solução de cinética teve efeito mais acentuado sobre o comportamento das curvas em relação à substituição de 1/4 de Pi por Phi no cultivo das plantas.

Na Tabela 5 é apresentado o efeito dos tratamentos nos parâmetros cinéticos de absorção de Pi no milho. Os valores de V_{max} e K_m foram calculados por meio do *software* Cinética (Ruiz & Fernandes Filho, 1992), que se baseia em uma aproximação gráfico-matemática, a partir da curva de depleção do nutriente (Ruiz, 1985). O *software* Cinética determina a V_{max} por meio de uma equação linear e o K_m , por equações do tipo potencial, exponencial e exponencial-recíproco. A C_{min} foi obtida a partir da média dos valores de concentração de Pi da solução de depleção, os quais apresentaram tendência de permanecer constantes nas amostragens finais (Faquin et al., 1990).

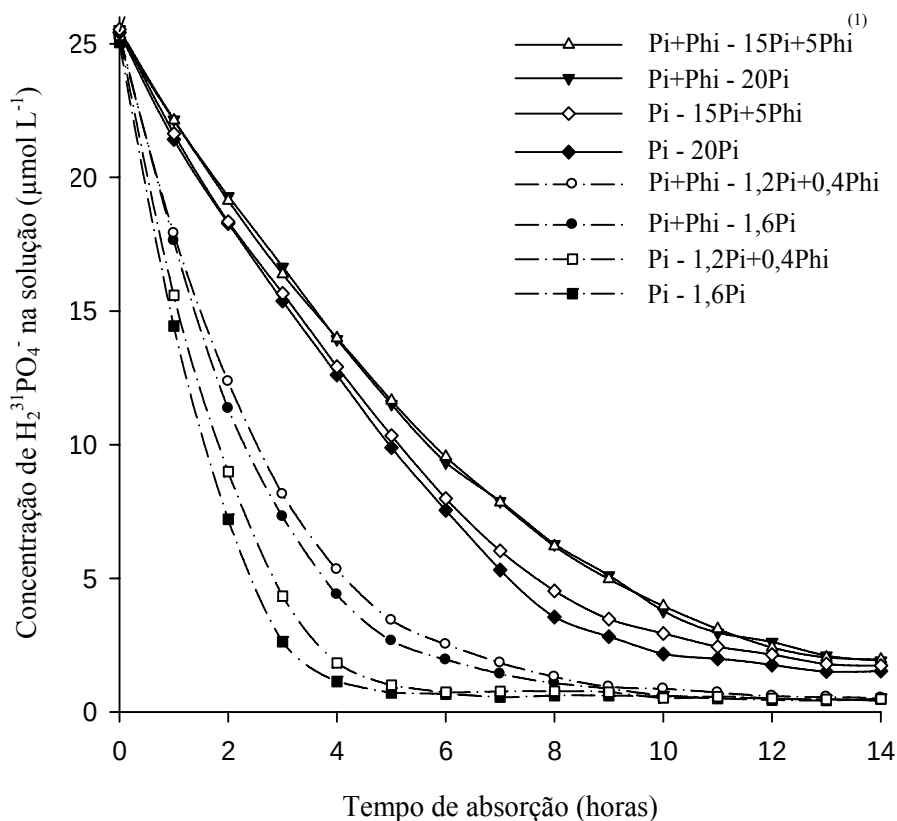


FIGURA 11 Depleção do $\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$ da solução nutritiva pelo milho, em função do tempo de absorção.

⁽¹⁾ Pi e Pi+Phi, respectivamente, concentração inicial da solução de cinética de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P fornecidos totalmente na forma de fosfato (Pi) e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P, sendo $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ fornecidos na forma de Pi e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ fornecidos na forma de fosfito (Phi). 15Pi+5Phi = plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L^{-1} ($3/4$) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L^{-1} ($1/4$) na forma de Phi; 20Pi = plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = plantas cultivadas sob concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P na solução nutritiva, sendo $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ ($3/4$) fornecido na forma de Pi e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ ($1/4$) na forma de Phi; 1,6Pi = plantas cultivadas sob concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi.

TABELA 5 Parâmetros cinéticos de absorção de $\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$ no milho, em função dos tratamentos.

Solução de cinética ⁽¹⁾	Tratamentos submetido às plantas durante o cultivo ⁽²⁾			
	1,6Pi	1,2Pi+0,4Phi	20Pi	15Pi+5Phi
Vmax ⁽³⁾				
..... $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$				
Pi	0,88 aA ⁽⁴⁾	0,78 aB	0,20 aC	0,22 aC
Pi+Phi	0,67 bA	0,61 bA	0,14 aB	0,17 aB
Km				
..... $\mu\text{mol L}^{-1}$				
Pi	5,02 bA	5,33 bA	4,79 bA	4,75 bA
Pi+Phi	6,54 aA	7,37 aA	6,78 aA	6,85 aA
Cmin				
..... $\mu\text{mol L}^{-1}$				
Pi	0,50 aA	0,46 aA	1,50 aB	1,73 aB
Pi+Phi	0,42 aA	0,55 aA	2,10 aB	2,04 aB

⁽¹⁾ Pi e Pi+Phi, respectivamente, concentração inicial da solução de cinética de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P fornecidos totalmente na forma de fosfato (Pi) e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P, sendo $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ fornecidos na forma de Pi e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ fornecidos na forma de fosfito (Phi).

⁽²⁾ 1,6Pi = plantas cultivadas sob concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = plantas cultivadas sob concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P na solução nutritiva, sendo $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ (3/4) fornecido na forma de Pi e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L^{-1} (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L^{-1} (1/4) na forma de Phi.

⁽³⁾ Vmax obtida por unidade de peso da massa fresca de raízes.

⁽⁴⁾ Para cada parâmetro cinético, médias seguidas de letras iguais, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem entre si (Tukey, 5%).

Observa-se que, como já era esperado, as plantas cultivadas em baixa concentração de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi) apresentaram, em média, incremento na Vmax superior quatro vezes à de plantas cultivadas em adequado suprimento de P (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi). A Vmax corresponde à velocidade de absorção do íon quando todos os transportadores estão sendo efetivamente utilizados em um dado momento (Fernandes & Souza, 2006). Conforme já comentado no item anterior, plantas sob deficiência em P promovem a ativação de genes relacionados com a expressão de mecanismos de superação a essa deficiência. Entre esses mecanismos, destaca-se a elevação na síntese de transportadores de membrana para o P de alta afinidade (Torriani-Gorini, 1994; Muchhal & Raghothama, 1999; Raghothama, 2000; Franco-Zorrilla et al., 2004; Ticconi & Abel, 2004; Chen et al., 2007; Schachtman & Shin, 2007). Consequentemente, um maior número de transportadores de Pi estará em atividade na unidade de tempo, elevando assim a Vmax (Drew et al., 1984). Porém, a afinidade de cada transportador com o Pi não é alterada, não ocorrendo, portanto, modificações nos valores de Km (Tabela 5). Resultados semelhantes foram observados para o milho (Anghinoni & Barber, 1980; Jungk et al., 1990; Alves et al., 1998; Alves et al., 2002) e outras culturas (Lee, 1982; Drew et al., 1984; Martinez et al., 1993; Shimogawara & Usuda, 1995).

Em relação à influência do Phi sobre a Vmax, verificou-se efeito significativo somente nas plantas cultivadas em baixa dose de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi). Contudo, nesses tratamentos, o fornecimento adicional de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Phi na solução de cinética (tratamento Pi+Phi) reduziu a Vmax em 24% e 22% nos tratamentos 1,6Pi e 1,2Pi+0,4Phi, respectivamente. Considerando apenas os tratamentos que não receberam Phi na solução de cinética (tratamento Pi), observa-se um pequeno decréscimo de 11% na Vmax do tratamento 1,2Pi+0,4Phi em relação ao tratamento 1,6Pi. O mesmo comportamento foi observado quanto aos tratamentos que receberam Phi na

solução de cinética (tratamento Pi+Phi) que, apesar de não significativo pelo teste de médias (Tukey, $p \leq 0,05$), ocorreu um decréscimo de 9% na Vmax do tratamento 1,2Pi+0,4Phi em relação ao tratamento 1,6Pi. Provavelmente, esses resultados tiveram como consequência o efeito depressivo do Phi sobre o sistema radicular das plantas deficientes em P.

O Km não foi influenciado pelos tratamentos submetidos às plantas durante o cultivo e nem pela interação entre os tratamentos submetidos no ensaio de cinética e no cultivo das plantas. Conforme já comentado, plantas cultivadas sob deficiência de P promovem a elevação da Vmax para o nutriente, enquanto o Km tende a permanecer inalterado. No entanto, tanto nas plantas previamente cultivadas sob deficiência quanto naquelas adequadamente supridas em P, a adição de 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Phi na solução de cinética (tratamento Pi+Phi) promoveu a elevação do Km de Pi, em média, de 40% (Tabela 5). O Km corresponde à afinidade existente entre o Pi e o seu transportador. Porém, nesse caso, a relação é inversa, ou seja, quanto maior o Km, menor é a afinidade entre o Pi pelo seu transportador (Faquin, 2005).

Interações iônicas que promovem a elevação do Km para os respectivos íons são conhecidas por inibição competitiva (Faquin, 2005; Epstein Bloom, 2006; Fernandes & Souza, 2006). Assim, fica claro, pelos resultados obtidos neste trabalho, que o Phi é um competidor do Pi pelo mesmo sítio do transportador no milho. Nesse caso, o total de transportadores efetivos não é alterado, mas ocorre redução do total de sítios disponíveis para o transporte do Pi (Fernandes & Souza, 2006).

A literatura apresenta resultados divergentes quanto à interação do Phi com o Pi na solução e suas consequências na cinética de absorção de Pi. Carswell et al. (1997) verificaram acentuada elevação do Km e redução da Vmax de Pi em *Brassica napus*, devido à adição de Phi na solução. Nesse caso, o Phi inibiu de forma competitiva e não-competitiva a absorção de Pi. Lee &

Tsai (2005), em ensaio com *Ulva lactuca* conduzido em baixa concentração de P, encontraram aumento do Km para o Pi superior a quatro vezes, em função do fornecimento de Phi, não tendo a Vmax sido significativamente alterada. Porém, esses autores não observaram efeito do Phi no Km e na Vmax de Pi em plantas com suprimento adequado de P. Recentemente, Danova-alt et al. (2008), em estudo realizado em células de tabaco (*Nicotiana tabacum*), verificaram incremento considerável nos valores de Km de Pi promovido pela adição de Phi na solução, apresentando baixa e adequada concentração de Pi, não sendo evidenciado efeito significativo do Phi na Vmax. Os autores concluíram que o Phi inibiu de forma competitiva a absorção do Pi, corroborando os resultados obtidos neste trabalho.

A Cmin (concentração de Pi na solução a partir da qual seu influxo é cessado) foi influenciada somente pelas diferentes concentrações de P fornecidas na solução de cultivo. Seus valores, em média, foram reduzidos em 70% nos tratamentos que receberam baixo suprimento de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi) quando comparados aos submetidos à adequada concentração do nutriente (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi). O fornecimento de Phi, tanto na solução de cinética quanto durante o cultivo do milho, não influenciou nessa variável.

De posse dos resultados de Vmax, Km e Cmin (Tabela 5), foi determinada, para cada tratamento, a partir da equação de Michaelis-Menten $\{\text{Influxo líquido} = [V_{\text{max}} (C - C_{\text{min}})]/[K_m + (C - C_{\text{min}})]\}$, a taxa de influxo líquido de Pi por unidade de peso de massa fresca de raiz, em função da concentração de Pi na solução nutritiva (Figura 12).

O influxo líquido integra, portanto, todos os parâmetros cinéticos (Vmax, Km e Cmin) envolvidos na absorção de Pi e que foram influenciados pelos tratamentos com suprimento deficiente ou adequado de P, na presença ou na ausência de Phi.

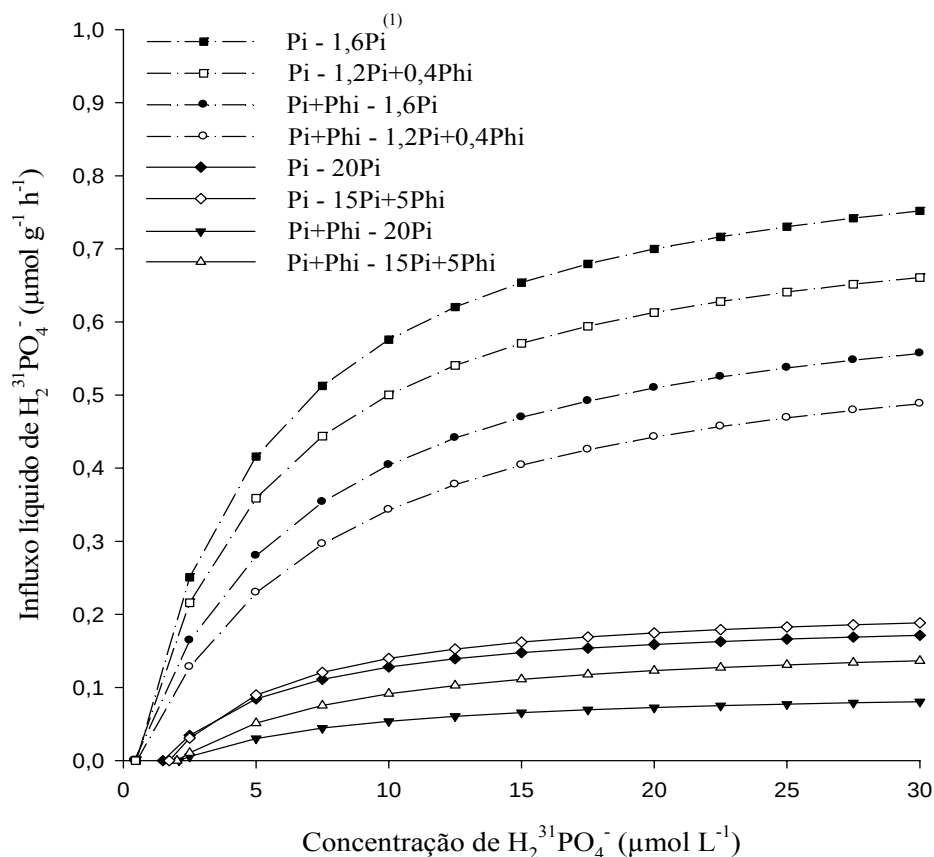


FIGURA 12 Influxo líquido do ^{31}P na forma de fosfato ($\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$) por unidade de peso de massa fresca de raízes, em função da concentração de $\text{H}_2^{31}\text{PO}_4^-$ na solução nutritiva, para cada tratamento estudado.

(1) Pi e Pi+Phi, respectivamente, concentração inicial da solução de cinética de $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P fornecidos totalmente na forma de fosfato (Pi) e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de P, sendo $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ fornecidos na forma de Pi e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$ fornecidos na forma de fosfito (Phi). 1,6Pi = plantas cultivadas sob concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = plantas cultivadas sob concentração de $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ de P na solução nutritiva, sendo $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ (3/4) fornecido na forma de Pi e $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = plantas cultivadas sob concentração de 20 mg L^{-1} de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L^{-1} (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L^{-1} (1/4) na forma de Phi.

Assim, observa-se que, para uma mesma concentração de Pi na solução de absorção (por exemplo, $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, Figura 12), os influxos líquidos de Pi são muito maiores nos tratamentos cujas plantas foram cultivadas sob deficiência de P (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi). E, dentro desses tratamentos, a presença do Phi, tanto na solução de cultivo (tratamento 1,2Pi+0,4Phi) quanto na solução de cinética (tratamento Pi+Phi), reduziu o influxo líquido de Pi (Figura 12). Esses efeitos devem-se, basicamente, à influência do Phi na diminuição da V_{max} e no aumento do K_m nas plantas deficientes em P, como já discutido quando da interpretação da Tabela 5.

Já para as plantas cultivadas sob adequado suprimento de P (tratamentos 15Pi+5Phi e 20Pi), os influxos líquidos de Pi foram bem menores (Figura 12), devido, unicamente, aos baixos valores de V_{max} observados, pois os valores de K_m não foram influenciados pelo suprimento de P na solução de cultivo (Tabela 5). E, dentro desses tratamentos, a presença de Phi reduziu o influxo líquido de Pi apenas quando presente na solução de cinética (tratamento Pi+Phi) (Figura 12), devido ao maior K_m nesse tratamento, visto que a V_{max} não foi afetada (Tabela 5). Porém, analisando-se os tratamentos de cultivo dentro de um mesmo tratamento aplicado na solução de cinética, observa-se que tanto no tratamento com adição (tratamento Pi+Phi) quanto no sem adição (tratamento Pi) de Phi na solução de cinética, o influxo líquido foi levemente elevado no tratamento 15Pi+5Phi, em comparação ao tratamento 20Pi. Esse fato pode ser explicado por uma pequena elevação do valor de V_{max} que, embora não significativa (Tukey, $p \leq 0,05$), foi suficiente para promover esse acréscimo no influxo líquido de Pi.

A C_{min} , definida como a concentração do nutriente na solução em que o influxo líquido se iguala a zero, também pode ser claramente visualizada na Figura 12, nos pontos de intercepção das curvas com o eixo da abscissa. Observa-se que os valores para as plantas sob baixo suprimento de P são

menores que o daquelas bem supridas, fato já discutido quando da apresentação da Cmin da Tabela 5.

O estudo dos coeficientes de correlação de Pearson entre Vmax, Km e Cmin, realizado individualmente para cada tratamento fornecido à solução de cinética, confirma em grande parte os resultados discutidos anteriormente (Tabela 6). Observa-se que, nos tratamentos em que não foi adicionado Phi na solução de cinética, houve forte correlação negativa entre Vmax e Cmin, porém, não foram observadas relações dessas variáveis com o Km. Já, considerando os tratamentos que receberam Phi na solução de cinética, observou-se forte correlação entre as três variáveis em estudo, sendo positiva entre Km e Cmin e negativa entre estas e a Vmax. Essa grande divergência existente na correlação do Km com a Vmax e Cmin, observada entre os tratamentos fornecidos na solução de cinética, corrobora o forte efeito da presença do Phi nessa solução sobre o Km, enquanto Vmax e Cmin foram mais intensamente influenciadas pelas concentrações de P aplicadas no cultivo das plantas.

TABELA 6 Coeficientes de correlação de Pearson entre Vmax, Km e Cmin de Pi no milho, realizados individualmente para cada tratamento fornecido à solução de cinética.

Variáveis	Km	Vmax
----- 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Pi-----		
Cmin	0,31 ^{ns}	-0,96***
Vmax	-0,23 ^{ns}	-
-----25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Pi + 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Phi-----		
Cmin	0,98***	-0,98***
Vmax	-0,97***	-

*** Valor significativo, a 0,1% de probabilidade. ^{ns} Não significativo, a 5% de probabilidade.

4.3 Aspectos relacionados com a indução de resistência

No gráfico da Figura 13 apresentam-se os valores da atividade de peroxidases (POXs, EC 1.11.1.7) no limbo da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta, em função dos tratamentos.

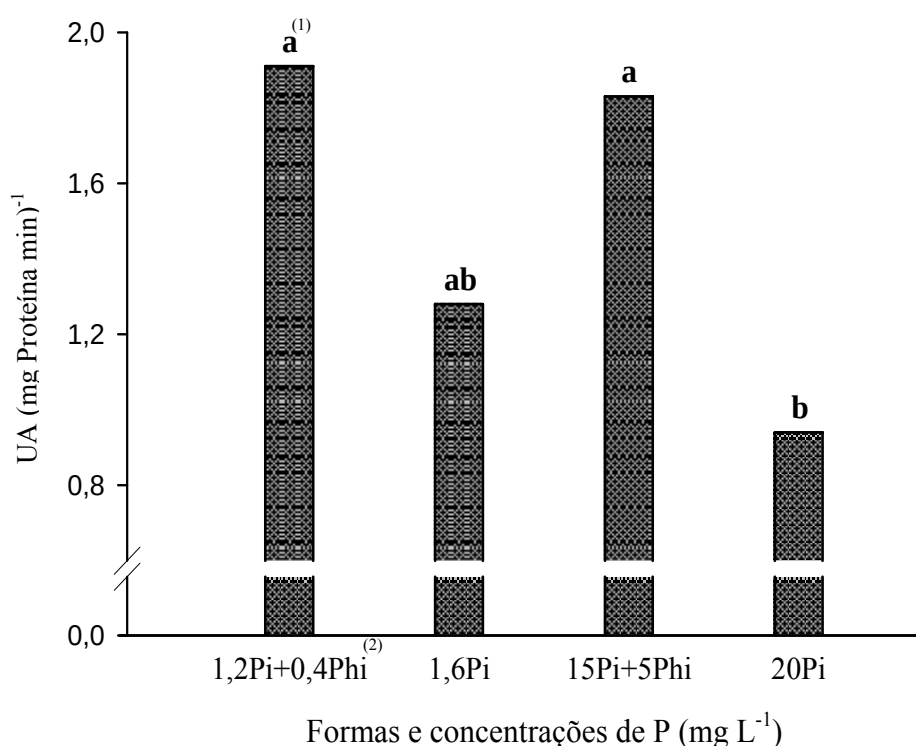


FIGURA 13 Atividade de peroxidases (POXs) no limbo da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice do milho, em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo. UA = unidade de atividade de peroxidases/mg de proteína minuto⁻¹.

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

Considerando os tratamentos que receberam adequado suprimento de P, observa-se que a atividade de POXs foi duas vezes maior no tratamento 15Pi+5Phi, em comparação ao tratamento 20Pi. Já nos tratamentos submetidos à baixa concentração de P, o tratamento 1,2Pi+0,4Phi apresentou tendência de elevação da atividade dessas enzimas em relação ao tratamento 1,6Pi, porém, essa diferença não foi significativa pelo teste de médias (Tukey, $p \leq 0,05$). Esses resultados demonstraram claramente o efeito positivo da substituição de 1/4 do Pi por Phi sobre essa variável no milho submetido ao adequado suprimento de P.

As POXs fazem parte de um seletivo grupo de proteínas relacionadas com a indução de resistência de plantas à patogênese, designadas por proteínas-PR (Cavalcanti et al., 2006). A ação antioxidante é a principal função das POXs na planta, atuando na conversão do peróxido de hidrogênio em água e outro composto oxidado dependendo do tipo de POX atuante (Mittler, 2002; Santos, 2006). No entanto, muitos desses subprodutos são utilizados como substrato por outras enzimas ou, mesmo, pelas POXs na síntese de substâncias relacionadas com a indução de resistência (La Camera et al., 2004; Taiz & Zeiger, 2004; Passard et al., 2005). Nesse contexto, a principal participação das POXs está na catalização da oxidação de álcoois hidroxicinâmicos, originando radicais fenólicos precursores da biossíntese de lignina, que constitui uma importante defesa da planta aos agentes externos (Peixoto, 1998; Van Loon & Van Strien, 1999; Boudet, 1998; Cavalcanti et al., 2006).

Diversos trabalhos têm demonstrado efeitos positivos das POXs sobre a indução de resistência de plantas (Loon & Strien, 1999; Campos et al., 2004; Gayoso et al., 2004; Cavalcanti et al., 2007; Cavalcanti et al., 2008). No entanto, estudos que relacionam Phi e POXs são restritos. Ribeiro Júnior et al. (2006) não observaram influência do Phi na atividade de POXs em cacaueiro (*Theobroma cacao* L.).

Na Figura 14 são apresentados os teores de lignina e fenóis totais solúveis do limbo da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice da planta.

Observa-se que os tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 1,6Pi (tratamento com baixo suprimento de P) apresentaram maiores teores de fenóis totais em relação ao tratamento 20Pi (tratamento com adequada dose de P e sem presença de Phi) (Figura 14 a). Provavelmente, a expressão dos mecanismos de superação à deficiência de P, que promovem a intensificação do metabolismo secundário das plantas, interferiu positivamente na síntese de compostos fenólicos (Taiz & Zeiger, 2004; Epstein & Bloom, 2006). No entanto, essa variável não foi influenciada pelo fornecimento de Phi, tanto em baixo quanto em adequado suprimento de P. Apesar de ter sido observada uma tendência de aumento no tratamento 15Pi+5Phi em relação ao tratamento 20Pi, essa diferença não foi significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Quanto a deposição de lignina no tecido foliar, independente da concentração de P na solução de cultivo, foi significativamente maior nos tratamentos que tiveram 1/4 do Pi substituído por Phi (tratamentos 1,2Pi+0,4Phi e 15Pi+5Phi), em comparação aos tratamentos que receberam somente Pi como fonte de P (tratamentos 1,6Pi e 20Pi). Já a concentração total de P na solução (baixa e adequada) não exerceu influência nessa variável (Figura 14 b). Conforme já comentado, a intensificação na biossíntese de lignina constitui importante defesa da planta aos agentes externos (Anterola & Lewis, 2002; Durrant & Dong, 2004; Cavalcanti et al., 2008). Contudo, em relação ao efeito do Phi sobre essa variável, a literatura tem mostrado resultados divergentes conforme a espécie vegetal estudada. Nojosa (2003) verificou incremento no acúmulo de lignina em folhas de café após aplicação foliar de Phi. Já Ribeiro Júnior et al. (2006) não observaram alteração nessa variável, em função da aplicação foliar de Phi em cacauzeiro (*Theobroma cacao* L.).

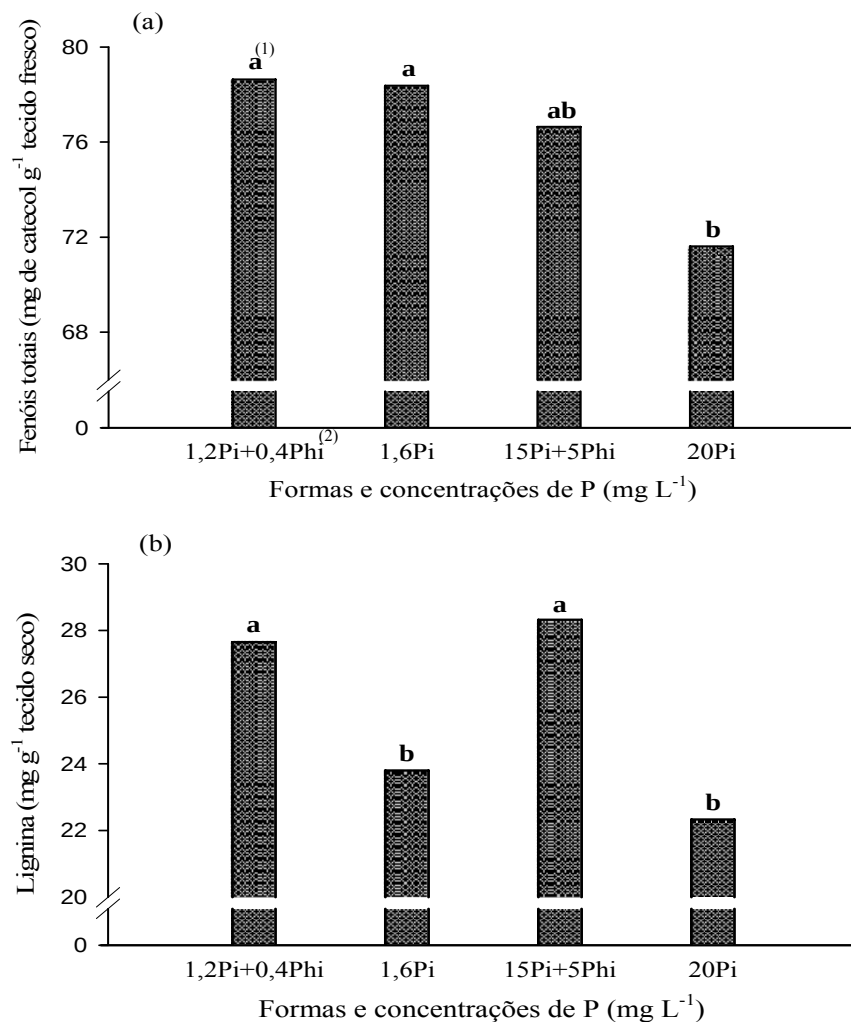


FIGURA 14 Teores de fenóis totais solúveis (a) e lignina (b) nos tecidos do limbo da primeira folha totalmente expandida a partir do ápice do milho, em função das formas e concentrações de P fornecidas na solução de cultivo.

⁽¹⁾ Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey, 5%).

⁽²⁾ 1,6Pi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecido totalmente na forma de Pi; 1,2Pi+0,4Phi = 1,6 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 1,2 mg L⁻¹ (3/4) fornecido na forma de Pi e 0,4 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi; 20Pi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, fornecidos totalmente na forma de Pi; 15Pi+5Phi = 20 mg L⁻¹ de P na solução nutritiva, sendo 15 mg L⁻¹ (3/4) fornecidos na forma de Pi e 5 mg L⁻¹ (1/4) na forma de Phi.

Neste trabalho, ficou evidenciado o efeito estimulante do Phi na lignificação do limbo foliar do milho e, em concentrações adequadas de P, foi acompanhado pela elevação da atividade de POXs. Porém, o mesmo não foi constatado com os teores de fenóis totais, em que era esperado o contrário, já que grande parte dos compostos fenólicos é precursora da lignificação da parede celular, fato este verificado por Soyly (2006) em *Arabidopsis thaliana*. No entanto, Cavalcanti et al. (2006) observaram que a indução de resistência de tomateiro contra *Xanthomonas vesicatoria*, utilizando como eliciador suspensão de micélios de *Crinipellis pernicioso*, ocorreu paralelamente com o incremento nos teores de lignina e redução nos de fenóis totais. Conforme os autores, a maior demanda por intermediários fenólicos para a biossíntese de outros compostos promovido pelo eliciador pode mascarar a elevação da síntese de fenóis. Além das POXs durante a síntese de lignina, outras enzimas que também utilizam intermediários fenólicos como substrato têm suas atividades elevadas pela presença de um eliciador, como, por exemplo, as polifenoloxidasas, durante a síntese de quinonas (Mayer & Harel, 1979).

5 CONCLUSÕES

Sob baixa concentração de P, a substituição de 1/4 de fosfato por fosfito na adubação fosfatada interfere negativamente no crescimento do sistema radicular e da parte aérea do milho. Contudo, sob suprimento adequado de P, esse efeito é pouco pronunciado.

O acúmulo de P na massa seca da parte aérea e os teores foliares de P-inorgânico solúvel em ácido são reduzidos pela substituição de 1/4 de fosfato por fosfito na adubação fosfatada. No caso de plantas cultivadas sob baixo suprimento de P, a eficiência de utilização do nutriente é também reduzida.

A presença de fosfito na solução promove inibição competitiva na absorção de fosfato pelo milho.

A substituição de 1/4 de fosfato por fosfito na adubação fosfatada promove a elevação dos teores de lignina nos tecidos foliares da planta. O mesmo efeito é evidenciado para a atividade de peroxidases, em caso de plantas cultivadas com adequado fornecimento de P. Esse comportamento evidencia o efeito eliciador do fosfito nos mecanismos de defesa do milho.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, S.; NÜRNBERGER, T.; AHNERT, V.; KRAUSS, G-J.; GLUND, K. Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, n.2, p.543-552, Feb. 2000.
- ALVES, V.M.C.; NOVAIS, R.F.; OLIVEIRA, M.F.G. de; SANT'ANNA, R. Cinética e translocação de fósforo em híbridos de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.10, p.1047-1052, out. 1998.
- ALVES, V.M.C.; PARENTONI, S.N.; VASCONCELLOS, C.A.; PITTA, G.V.E.; FRANÇA, C.C.M. Cinética de absorção de fósforo e crescimento do sistema radicular de genótipos de milho contrastantes para eficiência a fósforo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.1, n.1, p.85-92, jan./abr. 2002.
- ANGHINONI, I.; BARBER, S.A. Phosphorus influx and growth characteristics of corn roots as influenced by phosphorus supply. **Agronomy Journal**, Madison, v.72, p.685-688, 1980.
- ANTEROLA, A.M.; LEWIS, N.G. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. **Phytochemistry**, Oxford, v.61, n.3, p.221-294, Oct. 2002.
- ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. Agrianual 2009. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2009.
- ARAÚJO, A.P.; MACHADO, C.T. de T. Fósforo. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.253-280.
- ARAÚJO, J.L. **Crescimento e nutrição fosfatada do feijoeiro em função da aplicação via radicular e foliar do fosfito**. 2008. 77p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BLACKMER, T.M.; SCHEPERS, J.S. Techniques for monitoring crop nitrogen status in corn. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.25, n.9/10, p.1791-1800, 1995.

BOUDET, A.M. A new view of lignification. **Trends in Plant Science**, London, v.3, n.2, p.67-71, Feb. 1998.

BRACKMANN, A.; SESTARI, I.; GIEHL, R.F.H.; STEFFENS, C.A.; FAULIN, G.D.C.; PINTO, J.A.V. Controle de podridão pós-colheita de *penicillium* spp. em maçã 'fuji' com fosfitos e fungicidas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.2, p.251-254, abr./jun. 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.

CAMPOS, A.D.; FERREIRA, A.G.; HAMPE, M.M.V.; ANTUNES, I.F.; BRANÇÃO, N.; SILVEIRA, E.P.; OSÓRIO, V.A.; AUGUSTIN, E. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.7, p.637-643, jul. 2004.

CARADUS, J.R.; KENNEDY, L.D. DUNN, A. Genetic variation for the ratio of inorganic to total phosphorus in white clover leaves. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.21, n.10, p.2265-2272, 1998.

CARSWELL, M.C.; GRANT, B.R.; PLAXTON, W.C. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. **Planta**, Berlin, v.203, n.1, p.67-74, Sept. 1997.

CARSWELL, C.; GRANT, B.R.; THEODOROU, M.E.; HARRIS, J.; NIERE, J.O.; PLAXTON, W.C. The fungicide phosphonate disrupts the phosphatostarvation response in *Brassica nigra* seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v.110, n.1, p.105-110, Jan. 1996.

CARVALHO, D.O. **Efeito do nitrogênio e do potássio na intensidade da antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*) e na nutrição mineral do milho**. 2008. 96p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; CARVALHO, C.P.S.; SILVEIRA, J.A.G.; OLIVEIRA, J.T.A. Induced defence responses and protective effects on tomato against *Xanthomonas vesicatoria* by an aqueous extract from *Solanum lycocarpum* infected with *Crinipellis pernicioso*. **Biological Control**, San Diego, v.39, n.3, p.408-417, Dec. 2006.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; CARVALHO, C.P.S.; SILVEIRA, J.A.G.; OLIVEIRA, J.T.A. Na aqueous suspension of *Crinipellis perniciosa* mycelium activates tomato defence responses against *Xanthomonas vesicatoria*. **Crop Protection**, Oxford, v.26, n.5, p.729-738, May 2007.

CAVALCANTI, F.R.; RESENDE, M.L.V.; RIBEIRO JUNIOR, P.M.; PEREIRA, R.B.; OLIVEIRA, J.T.A. Induction of resistance against *verticillium dahliae* in cacao by a *crinipellis perniciosa* suspension. **Journal of Plant Pathology**, Pisa, v.90, n.2, p.271-278, July 2008.

CHEN, A.Q.; HU, J.; SUN, S.B.; XU, G.H. Conservation and divergence of both phosphate and mycorrhiza-regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in Solanaceous species. **New Phytologist**, New York, v.173, n.4, p.817-831, 2007.

CLAASSEN, N.; BARBER, S.A. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.54, n.4, p.564-568, 1974.

DANIEL, R.; GUEST, D. Defense responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.67, n.3-5, p.194-201, Sept. 2005.

DANOVA-ALT, R.; DIJKEMA, C.; DEWAARD, P.; KÖCK, M. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells – kinetic and ³¹P nuclear magnetic resonance studies. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.31, n.10, p.1510–1521, Oct. 2008.

DARAKIS, G.A.; BOURBOS, V.A.; SKOUDRIDAKIS, M.T. Phosphonate transport in *Phytophthora*. **Plant Pathology**, Oxford, v.46, n.5, p.762-772, Oct. 1997.

DOSTER, M.A.; BOSTOCK, R.M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, St. Paul, v.78, n.4, p.473-477, Apr. 1988.

DREW, M.C.; SAKER, L.R.; BARBER, S.A.; JENKINS, W. Changes in the kinetic of phosphate and potassium absorption in nutrient-deficient barley roots measured by a solution-depletion technique. **Planta**, New York, v.160, n.6, p.490-499, 1984.

DURRANT, W.E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.42, p.185-209, 2004.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. **Nutrição mineral de plantas**: princípios e perspectivas. Londrina: Planta, 2006. 169p.

EPSTEIN, E.; HAGEN, C.E. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v.27, n.3, p.457-474, 1952.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2005. 182p.

FAQUIN, V.; MALAVOLTA, E.; MURAOKA, T. Cinética da absorção de fosfato em soja sob influência de micorriza vesículo-arbuscular. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.14, n.1, p.41-48, jun./abr. 1990.

FENN, M.E.; COFFEY, M.D. Further evidence for direct mode of action of Fosetyl-Al and phosphorous acid. **Phytopathology**, St. Paul, v.75, n.9, p.1064-1068, Sept. 1985.

FENN, M.E.; COFFEY, M.D. Quantification of phosphonate and ethyl phosphonate in tobacco and tomato tissues and significance for the mode of action of two phosphonate fungicides. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, n.1, p.76-82, Jan. 1989.

FERNANDES, L.A.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CURI, N. Frações de fósforo e atividade da fosfatase ácida em plantas de feijoeiro cultivadas em solos de várzeas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.24, n.3, p.561-571, jul./set. 2000.

FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.115-152.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCAR, 2000. p.255-258.

FÖRSTER, H.; ADASKAVEG, J.E.; KIM, D.H.; STANGHELLIN, M.E. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. **Plant Disease**, St. Paul, v.82,n.10, p.1165-1170, Oct. 1998.

FRANCO-ZORRILLA, J.M.; GONZALEZ, E.; BUSTOS, R.; LINDARES, F.; LEYVA, A.; PAZ-ARES, J. The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n.396, p.285-293, Feb. 2004.

FUNDAÇÃO ARTHUR BERNARDES. **SAEG. Sistema para análises estatísticas**: versão 9,1.– Viçosa, MG: UFV, 2007.

FURLANI, A.M.C.; USBERTI FILHO, J.A. Capim-colonião: eficiência na absorção e na utilização de fósforo em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v.49, n.2, p.413-423, 1990.

GAHOONIA, T.S.; NIELSEN, N.E. Root traits as tools for creating phosphorus efficient crop varieties. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.260, n.1-2, p.47-57, Mar. 2004.

GAYOSO, C.; POMAR, F.; MERINO, F.; BERNAL, M.A. Oxidative metabolism and phenolic compounds in *Capsicum annuum* L. var. *annuum* infected by *Phytophthora capsici* Leon. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.102, n.1, p.1-13, Oct. 2004.

GRANT, B.R.; GRANT, J.; HARRIS, J. Inhibition of growth of *Phytophthora infestans* by phosphate and phosphonate in defined media. **Experimental Mycology**, San Diego, v.16, n.3, p.240-244, Sept. 1992.

GREEN, P.J. The ribonucleases of higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.45, p.421-445, 1994.

GRIFFITH, J.M.; COFFEY, M.D.; GRANT, B.R. Phosphonate Inhibition as a Function of Phosphate Concentration in Isolates of *Phytophthora palmivora*. **Journal General of Microbiology**, Reading, v.139, n.9, p.2109-2116, Sept. 1993.

GUEST, D.; GRANT, B.R. The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, New York, v.66, n.2, p.159-187, May 1991.

HELYAR, K.R. Efficiency of nutrient utilization and sustaining soil fertility with particular reference to phosphorus. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.56, n.1-2, p.187-195, Mar. 1998.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Circular California Agricultural Experiment Station**, Berkeley, n. 347, 1950.

HOGUE, E.; WILCOX, G.E.; CANTLIFE, D.J. Effect of soil phosphorus levels on phosphate fractions in tomato leaves. **Journal American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v.95, n.2, p.174-176, Mar. 1970.

ITO, H.A.; OLIVEIRA, M.F.O.; NETO, J.A.G.; STRADIOTTO, N.R. Eletrodo modificado em filme de paládio para a determinação voltamétrica de fosfito. **Eclética Química**, São Paulo, v.27, p.161-168, 2002.

JACKSON, T.J.; BURGESS, T.; COLQUHOUN, I.; HARDY, G.E.St.J. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v.49, n.1, p.147-154, Feb. 2000.

JOHNSON, D.; INGLIS, D.A.; MILLER, J.S. Control of Potato Tuber Rots Caused by Oomycetes with Foliar Applications of Phosphorous Acid. **Plant Disease**, St. Paul, v.88, n.10, p.1153-1159, Oct. 2004.

JUNGK, A.; BARBER, S.A. Plant age and the phosphorus uptake characteristics of trimmed and untrimmed corn root system. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.42, n.1, p.227-239, 1975.

JUNGK, A.; ASHER, C.J.; EDWARDS, D.G.; MEYER, D. Influence of phosphate uptake kinetics of maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.124, n.2, p.175-182, June 1990.

KÖPPEN, W. **Roteiro para classificação climática**. [S.l.: s.n.], 1970. 6p. Mimeografado.

LA CAMERA, S.; GOUZERT, G.; DHONDT, S.; HOVMAN, L.; FRITIG, B.; LEGRAND, M.; HEITZ, T. Metabolic reprogramming in plant immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipins pathways. **Immunology Review**, Copenhagen, v.198, n.1, p.267-281, Apr. 2004.

LAI, F.; THACKER, J.; LI, Y.Y.; DOERNER, P. Cell division activity determines the magnitude of phosphate starvation responses in Arabidopsis. **The Plant Journal**, Oxford, v.50, n.3, p.545-556, May 2007.

LEE, R.B. Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. **Annual Botany**, London, v.50, n.4, p.429-440, 1982.

LEE, T.M.; TSAI, P.F. The effects of phosphate on phosphate starvation responses of *Ulva lactuca* (*Ulvaes chlorophyta*). **Journal of Phycology**, Oxford, v.41, n.5, p.975-982, Oct. 2005.

LEFEBVRE, D.D.; GLASS, A.D.M. Regulation of phosphate influx in barley roots: effects of phosphate deprivation and reduction of influx with provision of orthophosphate. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.54, n.2, p.199-206, 1982.

LI, B.; McKEAND, S.E.; ALLEN, H.L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v.37, n.2, p.613-626, June 1991.

LOON, L.C. van; STRIEN, E.A. van. The families of patogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.55, n.1, p.85-89, 1999.

LOVATT, C.J.; MIKKELSEN, R.L. Phosphite fertilizers: What are they? Can you use them? What can they do? **Better Crops**, Atlanta, v.90, p.1-11, 2006.

MACHADO, C.T.T.; FURLANI, A.M.C.; MACHADO, A.T. Índices de eficiência de variedades locais e melhoradas de milho ao fósforo. **Bragantia**, Campinas, v.60, n.3, p.225-238, 2001.

MACINTIRE, H.W.; S.H.; HARDIN, L.J.; STERGES, A.J.; CLEMENTS, L.B. Fertilizer evaluation of certain phosphorous, phosphorous, and phosphoric materials by means of pot cultures. **Agronomy Journal**, Madison, v.42, n.11, p.543-549, Nov. 1950.

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

MCDONALD, A.E.; GRANT, B.R.; PLAXTON, W.C. Phosphite (Phosphorous acid): Its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.24, n.10, p.1505-1519, 2001.

MARQUES, B.M.F.P.P.; ROSA, G.B.; HAUSCHILD, L.; CARVALHO, A.d'A.; LOVATTO, P.A. Substituição de milho por sorgo de baixo tanino em dietas para suínos: digestibilidade e metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.59, n.3, p.767-772, jun. 2007.

MARTINEZ, H.E.P.; NOVAIS, R.R.; RODRIGUES, L.A.; SACRAMENTO, L.V.S. Comportamento de variedades de soja cultivadas em diferentes doses de fósforo: I. Cinética de absorção de fósforo e ajustes morfológicos da planta. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, n.2, p.231-238, maio/ago. 1993.

MAYER, A.M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.18, n.2, p.193-215, 1979.

MENGEL, K.; KIRBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 5.ed. Dordrecht: Kluwer Academic, 2001. 849p.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, London, v.17, n.9, p.405-410, Sept. 2002.

MOOR, U.; KARP, K.; PÖLDMA, P.; PAE, A. Cultural systems affect content of anthocyanins and vitamin C in strawberry fruits. **European Journal of Horticultural Science**, Stuttgart, v.70, n.4, p.195-201, Aug. 2005.

MOOR, U.; PÖLDMA, P.; TÕNUTARE, T.; KARP, K.; STARAST, M.; VOOL, E. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.119, n.3, p.264-269, Feb. 2009.

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

MOTTA, P.E.F.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O.; RAIJ, B.V.; FURTINI NETO, A.E.; LIMA, J.M. Adsorção e formas de fósforo em latossolos: influência da mineralogia e histórico de uso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v.26, n.2, p.349-359, abr./jun. 2002.

MUCHHAL, U.S.; PARDO, J.M.; RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate transporters from the higher plant Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.93, n.19, p.10519-10523, Sept. 1996.

MUCHHAL, U.S.; RAGHOTHAMA, K.G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.96, n.10, p.5868-5872, May 1999.

MURPHY, J.; RILEY, H.P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.27, n.1, p.31-36, 1962.

NAGAHASHI, G.; DOUDS, D.D. Partial separation of root exudate compounds and their effects upon the growth of germinated spores of AM fungi. **Mycological Research**, New York, v.104, n.12, p.1453-1464, Dec. 2000.

NEMESTOTHY, G.S.; GUEST, D.I. Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia-lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Phytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.37, p.207-219, Sept. 1990.

NIERE, J.O.; DEANGELIS, G.; GRANT, B.R. The effect of phosphonate on the acid soluble phosphorus components in the genus *Phytophthora*. **Microbiology**, London, v.140, n.7, p.1661-1670, July 1994.

NOJOSA, G.B.A. **Efeito de indutores na resistência de *Coffea arabica* L. à *Hemileia vastatrix* BERK & BR. E *Phoma costaricensis* ECHANDI**. 2003. 102 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NOVAIS, R.F.; SMITH, T.J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: DPS/UFV, 1999. 399p.

NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J.; NUNES, F.N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F. de; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L.; (Ed.). **Fertilidade do solo**. 23.ed. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.471-550.

ORBOVIĆ, V.; SYVERTSEN, J.S.; BRIGHT, D.; VAN CLIEF, D.L.; GRAHAM, J.H. Citrus seedling growth and susceptibility to root rot as affected by phosphite and phosphate. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.31, n.4, p.774-787, 2008.

PASSARDI, F.; COSIO, C.; PENEL, C.; DUNAND, C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Report**, Piracicaba, v.24, n.5, p.255-265, July 2005.

PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, cap.22, p.417-454.

PEIXOTO, P.H.P. **Peroxidação de lipídios em membranas e tecidos de dois cultivares de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) com tolerância diferencial do alumínio**. 1998. 95p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

PLAXTON, W.C. The organization and regulation of plant glycolysis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.47, p.185-214, 1996.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.50, p.665-693, 1999.

RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate transport and signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.3, p.182-187, June 2000.

RAUSCH, C.; BUCHER, M. Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. **Planta**, Berlin, v.216, n.1, p.23-37, Nov. 2002.

RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; RESENDE, M.L.V.; PEREIRA, R.B.; CAVALCANTI, F.R.; AMARAL, D.R.; PÁDUA, M.A. Effect of potassium phosphite on the induction of resistance in cocoa seedlings (*Theobroma cacao* L.) against *Verticillium dahliae* Kleb. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.30, n.4, p.629-636, July/Aug. 2006.

RUIZ, H.A. Estimativa dos parâmetros cinéticos Km e Vmax por uma aproximação gráfico-matemática. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v.32, n.179, p.79-84, jan./fev. 1985.

RUIZ, H.A.; FERNANDES FILHO, E.I. Cinética: Software para estimar as constantes Vmax e Km da equação de Michaelis-Menten. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 10., 1992, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: SBCS, 1992. p.124-125.

SALA, F.C.; COSTA, C.P.; ECHER, M.M.E.; MARTINS, M.C.; BLAT, S.F. Phosphite effect on hot and sweet pepper reaction to *Phytophthora capsici*. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.61, n.5, p.492-495, set./out. 2004.

SAINDRENAN, P.; BARCHIETTO, T.; BOMPEIX, G. Effect of phosphonate on the elicitor activity of culture filtrates of *Phytophthora cryptogea* in *Vigna unguiculata*. **Plant Science**, Clare, v.76, n.2, p.245-251, 1990.

SANTOS, G.A. **Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio**. 2006. 45p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SCHACHTMAN, D.P.; SHIN, R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.58, p.47-69, 2007.

SCHROETTER, S.; ANGELES-WEDLER, D.; KREUZIG, R.; SCHNUG, E. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). **Landbauforschung Volkenrode. Fal Agricultural Research**, Braunschweig, v.56, n.3-4, p.87-99, Sept. 2006.

SHEARER, B.L.; FAIRMAN, R.G. A stem injection of phosphate protects *Banksia* species and *Eucalytus marginata* from *Phytophthora cinnamomi* for at least four years. **Australian Plant Pathology**, Collingwood, v.36, n.1, p.78-86, 2007.

SHELTON, A.M.; ZHAO, J.Z.; ROUSH, R.T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.47, p.845-881, 2002.

SHIMOGAWARA, K.; USUDA, H. Uptake of inorganic phosphate by suspension - cultured tobacco cells: kinetics and regulation by Pi starvation. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.36, n.2, p.341-351, Mar. 1995.

SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Utilization Index: A modified approach to the estimations and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.4, n.3, p.289-302, 1981.

SILVA, F.C.; BASSO, L.C. Avaliação da atividade in vivo da fosfatase ácida da folha na diagnose da nutrição fosfórica em cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, n.3, p.371-375, set./dez. 1993.

SIQUEIRA, J.O.; ANDRADE, A.T.; FAQUIN, V. O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas. In: YAMADA, T.; ABDALA, S.R.S. **Fósforo na agricultura**. Piracicaba: Potafos, 2004. p.117-149.

SINGH, V.K.; WOOD, S.M.; KNOWLES, V.L.; PLAXTON, W.C. Phosphite accelerates programmed cell death in phosphate-starved oilseed rape (*Brassica napus*) suspension cell cultures. **Planta**, Berlin, v.218, n.2, p.233-239, Dec. 2003.

SMILLIE, R; GRANT, B.R; GUEST, D. The mode of action of phosphite: Evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. **Phytopathology**, St. Paul, v.79, n.9, p.921-926, Sept. 1989.

SMITH, F.W. The phosphate uptake mechanism. **Plant Soil**, Dordrecht, v.245, n.1, p.105-114, Aug. 2002.

SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, E.; REIN, A.T. Adubação fosfatada. In: SOUSA, D.M.G. de; LOBATO, E. **Cerrado**: Correção do solo e adubação. 2. Brasília, DF: Embrapa Cerrado, 2004. p.147-168.

SOYLU, S. Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. **Plant Science**, Clare, v.170, n.5, p.942-952, May 2006.

SPANOS, G.A.; WROLSTAD, R.E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, Washington, v.38, n.7, p.1565-1571, July 1990.

STEHMANN, C.; GRANT, B.R. Inhibition of enzymes of the glycolytic pathway and hexose monophosphate bypass by phosphonate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.67, n.1, p.13-24, May 2000.

SWIADER, J.M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F.G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.17, n.10, p.1687-1699, 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

THAO, H.T.B.; YAMAKAWA, T.; SHIBATA, K.; SARR, P.S.; MYINT, A.K. Growth response of komatsuma (*Brassica rapa* var. peruviridis) to root and foliar applications of phosphate. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.308, n.1-2, p.1-10, July 2008.

THEODOROU, M.E.; PLAXTON, W.C. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n.2, p.339-344, Feb. 1993.

TICCONI, C.A.; DELATORRE, C.A.; ABEL, S. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v.127, n.3, p.963-972, Nov. 2001.

TICCONI, C.A.; ABEL, S. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. **Trends in Plant Science**, London, v.9, n.11, p.548-555, Nov. 2004.

TORRIANI-GORINI, A. The Pho regulon of *Escherichia coli*. In: TORRIANI-GORINI, A.; YAGIL, E.; SILVER, S. (Ed.). **Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology**. Washington: American Society for Microbiology, 1994. p.1-4.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Varsóvia, v.13, n.1, p.43-50, 1991.

VANCE, C.P.; UHDE-STONE, C.; ALLEN, D.L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Cambridge, v.157, n.3, p.423-447, Mar. 2003.

VARADARAJAN, D.K.; KARTHIKEYAN, A.S.; MATILDA, P.D.; RAGHOTHAMA, K.G. Phosphite, an analog of phosphate suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, n.3, p.1232-1240, July 2002.

WILKINSON, C.J.; HOLMES, J.M.; DELL, B.; TYNAN, K.M.; MCCOMB, J.A.; SHEARER, B. L.; COLQUHOUN I.J.; HARDY, G.E.S.T.J. Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, Oxford, v.50, n.5, p.587-593, Oct. 2001.