

## FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM DOIS SISTEMAS DE CULTIVO DE MILHO

Amália Aparecida Busoni Campos<sup>1</sup>, Juliana Cristina Scotton<sup>1</sup>, Diego Fontebasso Pelizari Pinto<sup>1</sup>, Bruno Picareli<sup>1</sup>, Rodrigo Henriques Longaresi<sup>1</sup>, Sérgio Kenji Homma<sup>1</sup>

**RESUMO** – Tendo em vista a utilização dos fungos micorrízicos arbusculares atuando como bioindicadores de qualidade do solo, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos sobre a porcentagem de colonização micorrízica, número de esporos viáveis e glomalina facilmente extraível de dois diferentes sistemas de cultivo de milho: milho transgênico em cultivo convencional e milho variedade em cultivo alternativo. Os tratamentos foram semeados em duas faixas paralelas e contíguas, com dois hectares cada, em condições semelhantes de fertilidade de solo e relevo. No cultivo convencional o milho transgênico foi semeado com adubação na linha de 280 kg.ha<sup>-1</sup> do fertilizante fórmula NPK 7-28-16, 8% Ca, 1,5% S e 0,3% Zn. Foi utilizado glifosato juntamente com o inseticida Chlorantraniliprole + lambda-cialotrina para o controle de mato e lagartas. No cultivo alternativo o solo foi preparado com a aplicação de 500 kg.ha<sup>-1</sup> do condicionador de solo Bokashi e posterior gradagem e nivelamento. Foi aplicado o herbicida atrazina para contenção do mato e uma pulverização de inseticida biológico (*Bacillus thuringiensis*) para controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). A amostragem de raízes e solo foi feita na profundidade de 0 a 20 cm no estágio R3 (grão pastoso). Foi utilizado o delineamento em faixas de tratamento com dez repetições. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro- Wilk e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste t de Student (P<0,05). Os resultados mostram maiores índices de colonização micorrízica e concentração de glomalina no solo no cultivo alternativo com milho variedade, comparado ao cultivo convencional com cultivar transgênico. Em relação ao número de esporos viáveis não houve diferença significativa entre os tratamentos. O milho variedade, submetido ao manejo alternativo, proporcionou melhores condições para o desenvolvimento dos fungos micorrízicos, indicando ser esta a melhor opção para este simbiote.

Palavras chave: agricultura alternativa, esporos, glomalina, micorrizas, transgênico, *Zea mays*.

## ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI UNDER TWO SYSTEMS OF MAIZE CROPPING

**ABSTRACT** – Having the mycorrhizal fungi activities as a soil quality bioindicators, the aim of this study was to evaluate the effects two different systems of maize cropping on the mycorrhizal colonization, amount of viable spores, and easily extractable glomalin. One of the systems was transgenic maize under conventional cropping, and another was non-hybrid maize under alternative cropping. The treatments were sowed in the two parallel strips of area, with 2 ha each other, under similar conditions of soil fertility and topography. In the conventional cropping 280 kg.ha<sup>-1</sup> of chemical fertilizer (NPK 7-28-16, 8% Ca, 1.5% sulfur and 0.3% Zn) was applied in the sowing line. The glyphosate and lambda-cyhalothrin + chlorantraniliprole were applied in order to control weeds and caterpillars. In the alternative cropping, the strip area was tilled using 500 kg.ha<sup>-1</sup> of a biological conditioner named Bokashi. A biological insecticide (*Bacillus thuringiensis*) was sprayed to control weeds and caterpillars. Samples of thin roots and soil were collected at 0 to 20 cm depth at pasty grain growth step, to run the laboratory analysis. The results show higher mycorrhizal root colonization rates and the soil glomalin concentration in the alternative cropping of maize, compared to the conventional system with transgenic variety. Regarding the amount of viable spores, there was no significant difference between the treatments. The strip-block experimental design was used applying two treatments and ten replicates.



*The data normality were tested by Shapiro-Wilk test, and the means values were compared by the Student t-Test ( $P < 0.05$ ). The alternative cropping using non-hybrid maize variety provided better conditions for the mycorrhizal fungi growth, pointing out that it would be the best option for the symbiont.*

*Keywords: alternative agriculture, glomalin, mycorrhizae, spores, transgenic, Zea mays.*

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho. O consumo nacional está na casa de 52 a 53 milhões de toneladas anuais (Agrianual, 2014). O milho, alimento de grande interesse econômico e altamente energético, possui uma multiplicidade de aplicações, já que é utilizado no consumo humano e, principalmente animal (Mapa, 2014). Além do seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, o grão torna-se um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo (Fancelli & Dourado Neto, 2000).

Várias práticas e tecnologias de produção do milho vêm sendo desenvolvidas, proporcionando opções para alguns dos desafios atuais e futuros da agricultura, pois estas viabilizam a exploração de agrossistemas produtivos, com uso reduzido de insumos químicos e cultivos conservacionistas (Siqueira *et al.*, 2004). Contudo, a transgenia tem sido a prática mais adotada nas atividades agrícolas mundiais com o objetivo de tornar as espécies mais resistentes a fatores adversos, aliando a maior produtividade a menores custos de produção.

A liberação de plantas transgênicas para o cultivo e para o consumo humano e animal, ou de seus derivados, atrai cada vez mais a atenção das pessoas (Nodari & Guerra, 2001). Entretanto, as consequências ambientais e à saúde não estão completamente esclarecidas, existindo muita controvérsia a esse respeito. Testes realizados em ratos apontaram que a alimentação dos mesmos com o milho transgênico levou ao surgimento de câncer após dois anos de dieta (Séralini *et al.*, 2014).

As consequências ecológicas dos cultivados obtidos via engenharia genética não se limita à resistência das pragas ou à criação de novas ervas daninhas. Os cultivos transgênicos podem produzir toxinas ambientais que se movimentam através da cadeia alimentar e que podem chegar até o solo e a água afetando assim invertebradas e micro-organismos e, provavelmente, alterando os processos ecológicos como o ciclo dos nutrientes (Altieri, 2002).

Compostos orgânicos que são liberados principalmente pelas raízes das plantas na forma de

exsudados são uma das principais fontes de nutrientes utilizadas na atividade microbiana (Colodete *et al.*, 2013). Entender a interação das plantas geneticamente modificadas com os micro-organismos do solo é uma forma de compreender as consequências para o ambiente.

Neste aspecto, os fungos micorrízicos arbusculares conseguem atender essa necessidade, já que são micro-organismos de ampla ocorrência no solo que interagem diretamente com as plantas, auxiliam na absorção de nutrientes e água, bem como na agregação do solo, assumindo uma das mais expressivas simbioses, no que tange ao cultivo sustentável dos alimentos (Cardoso *et al.*, 2010)

O possível impacto, direto ou indireto, do uso dessas plantas sobre a comunidade microbiana do solo é uma das áreas mais carentes de informações quando o assunto é biossegurança (Reis Júnior *et al.*, 2005). Dentre os riscos mais relevantes podemos citar o aumento da população de pragas e micro-organismos resistentes e/ou patogênicos, o aumento ou promoção de plantas daninhas resistentes a herbicidas, a contaminação de variedades crioulas mantidas pelos agricultores, a contaminação de produtos naturais, entre outros (Nodari & Guerra, 2001).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o desenvolvimento dos fungos micorrízicos arbusculares, o número de esporos e a concentração de glomalina facilmente extraível no solo sob dois diferentes sistemas de produção de milho: sistema de cultivo convencional com milho transgênico e sistema de cultivo alternativo com milho variedade.

## 2. MATERIAL EMÉTODOS

A área experimental, localizada no município de Mogi Guaçu-SP, coordenadas geográficas 22° 07' 56" de latitude sul, 47° 10' 29" de longitude oeste e 648 metros de altitude, foi de 3,6 ha em Latossolo Vermelho Amarelo textura areno-argilosa. Inicialmente a área foi dessecada com utilização do herbicida glifosato, para controle de plantas espontâneas, e posterior gradagem e nivelamento do terreno. Foram instalados dois

tratamentos: cultivo convencional, cultivar transgênica DKB 390 Pró 2 e; cultivo alternativo, variedade AL Bandeirante (CATI), com densidades de plantio de 60.000 e 50.000 plantas por ha<sup>-1</sup>, respectivamente. Cada tratamento ocupou 1,8 ha, em formato de faixas paralelas de 50 m de largura e 360 m de comprimento, em condições homogêneas de solo e declive.

No cultivo convencional o milho transgênico foi semeado com adubação na linha de 280 kg.ha<sup>-1</sup> do fertilizante fórmula NPK 7-28-16, 8% Ca, 1,5% S e 0,3% Zn. Após emergência do milho foi aplicado herbicida glifosato juntamente com o inseticida Chlorantraniliprole + lambda-cialotrina para o controle de mato e lagartas. No estádio V6 (seis folhas expandidas) foi aplicada adubação de cobertura com 500 kg.ha<sup>-1</sup> de fertilizante N-P-K fórmula 30-0-10.

No cultivo alternativo o solo foi preparado com a aplicação de 500 kg.ha<sup>-1</sup> do condicionador de solo Bokashi e posterior gradagem e nivelamento. Após a emergência do milho foi aplicado o herbicida atrazina para contenção do mato e uma pulverização de inseticida biológico (*Bacillus thuringiensis*) para controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*).

As parcelas de avaliação foram demarcadas aos 28 dias de plantio, distribuídas ao longo das faixas de tratamento, de modo a representar toda a área experimental. No estádio R3, foi realizada a amostragem de solo e raiz na profundidade de 0 a 20 cm para avaliação dos parâmetros em todas as parcelas, sendo: porcentagem decolonização micorrízica, números de esporos viáveis e glomalina facilmente extraível.

Para avaliação dos índices de colonização micorrízica, as raízes foram lavadas, clarificadas em solução de KOH 10%, segundo metodologia de Vierheilig *et al.* (1998), e posteriormente, coradas em solução de ácido acético 5% e tinta de caneta. Para contagem as amostras foram espalhadas em placa de Petri quadriculada e analisadas em estereomicroscópio no aumento de 40 vezes (Giovannetti & Mosse, 1980).

Para avaliação do número de esporos viáveis utilizou-se o peneiramento úmido, seguido de centrifugação em sacarose (70%). Os esporos foram extraídos de 50 g de solo seco. A suspensão de solo foi passada por peneiras de abertura de 710, 250, 106 e 44 µm, nesta ordem (Gerdemann & Nicholson, 1963), seguida de centrifugação em água e posteriormente

em sacarose a 70% (Jenkins, 1964). O sobrenadante obtido foi colocado em placa de Petri com canaletas e visualizadas com auxílio do estereomicroscópio (40 vezes).

A extração de glomalina presente no solo foi executada pelo método da Glomalina Facilmente Extraível (EEG), como descrito por Wright & Updahyaya (1998), utilizando-se 1,0 g de solo seco ao ar. Após a extração, o material foi quantificado pelo método de Bradford (1976), a leitura foi feita em espectrofotômetro em absorbância com comprimento de onda de 590 nanômetros.

Foi utilizado o delineamento em faixas de tratamento com dez repetições cada. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk as médias dos tratamentos comparadas pelo teste t de Student a 5% de probabilidade, utilizando o programa computacional Sisvar 5.3 (Ferreira, 2010).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se diferença estatística para os resultados referentes à colonização micorrízica e nos teores de glomalina facilmente extraível no solo, sendo que o cultivo alternativo apresentou maiores resultados (P<0,05). Quanto ao número de esporos viáveis não houve diferença estatística entre os cultivos (Tabela 1).

Trabalhos envolvendo a influência de variedades transgênicas e não transgênicas nos FMAs nativos não consideraram a possibilidade de diferença entre os cultivos convencional e alternativo, com utilização de variedade não híbrida sob doses reduzidas de fertilizantes químicos. Alguns autores já verificaram evidências de diminuição na colonização micorrízica em milho em nove variedades transgênicas quando comparadas com suas variedades parentais não transgênicas, ambos no mesmo sistema de cultivo (Cheeke *et al.*, 2011).

Chaparro *et al.* (2013) ressaltam a importância dos fungos micorrízicos arbusculares nas avaliações de riscos ecológicos, utilizando-os como indicadores da qualidade do sistema em que são submetidos. Castaldini *et al.* (2005) encontrou níveis significativamente baixos de colonização micorrízica em raízes de milho GM Bt176, corroborando que há efeitos de plantas geneticamente modificadas nas comunidades deste simbionte (Colodete *et al.*, 2013).



Tabela 1 - Médias de colonização micorrízica, número de esporos viáveis e glomalina facilmente extraível, em cultura de milho submetido ao manejo convencional com variedade transgênica e manejo alternativo com milho variedade

| Tratamentos         | Colonização<br>% | Esporo<br>nº esporo.50 g solo <sup>-1</sup> | Glomalina<br>mg.g solo <sup>-1</sup> |
|---------------------|------------------|---|--------------------------------------|
| Cultivo transgênico | 22,3b            | 89,7a                                       | 6,94b                                |
| Cultivo alternativo | 32,5a            | 73,9a                                       | 7,548a                               |
| C.V. (%)            | 13,12            | 22,18                                       | 4,08                                 |

Médias na coluna seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste t de Student.

Outro fator que deve ser considerado é o volume e a qualidade dos insumos aplicados em cada tipo de cultivo ou manejo. O tratamento do cultivo alternativo teve a adubação química substituída por Bokashi, um fertilizante orgânico e condicionador de solo. Também, no cultivo alternativo foram aplicadas menores doses de defensivos químicos, enquanto que o tratamento do cultivo transgênico recebeu elevadas doses de adubação química.

Neste sentido, muitos trabalhos relatam a influência da adubação na inibição micorrízica, mostrando que elas são afetadas por adubação excessiva e aplicação de agroquímicos comprometendo sua dinâmica e função no sistema (Moreira & Siqueira, 2006). Mais autores consideram, dentre os fatores que afetam a simbiose a fertilidade elevada do solo, sendo observado que a taxa de colonização micorrízica intrarradicular diminui, às vezes drasticamente, com níveis elevados de Pno solo (Cardoso *et al.*, 2010).

Os teores de glomalina de ambos os tratamentos estão associados à intensidade da atividade micorrízica na rizosfera. Esta glicoproteína é produzida enquanto a simbiose está ativa, tendo por finalidade garantir o seu melhor funcionamento (Siqueira *et al.*, 2010). Como esta proteína está contida dentro das paredes de hifas e esporos, elas favorecem a aderência das hifas na superfície, cumprindo suas funções fisiológicas, como observado neste ensaio e em trabalhos que abordam a sua produção e contribuição para o solo (Sousa *et al.*, 2012).

A maior concentração de glomalina facilmente extraível encontrada no cultivo alternativo implica nas melhores condições ambientais encontradas pelos fungos micorrízicos arbusculares para se desenvolverem. No entanto, não foi encontrada menção em literatura científica sobre eventuais diferenças de concentração

de glomalina em rizosferas de milho de cultivares transgênicas, tornando necessário mais ensaios que elucidem estas questões.

A capacidade de esporulação dos fungos micorrízicos arbusculares está intimamente ligada a dois fatores: as características que encontramos em um determinado tipo de solo e a planta hospedeira utilizada (Carrenho, 2001). No caso deste ensaio, os dois cultivos proporcionaram quantidades semelhantes de esporos viáveis no solo. Proporcionalmente, houve maior liberação de esporos no solo, considerando que o índice de colonização micorrízica na cultivar transgênica foi menor. Fungos micorrízicos arbusculares tendem a formar mais esporos quando as condições ambientais na rizosfera estejam mais restritivas ou estressantes (Folli-Pereira *et al.*, 2012).

O estado de quiescência dos esporos precisa ser ativado para desencadear os processos normais de funções metabólicas que sustentem sua germinação e crescimento (Moreira & Siqueira, 2006). Apesar de não se conhecer o mecanismo exato pelo qual os esporos dos fungos micorrízicos arbusculares são ativados, é necessário que fatores externos sejam considerados, e dentre estes fatores o manejo e preparo do solo exercem influência significativa.

No presente trabalho foi possível observar a influência de dois diferentes sistemas de cultivos, convencional com milho transgênico e alternativo com milho variedade, sobre a atividade dos fungos micorrízicos arbusculares nativos. Diante ao exposto, outros ensaios deverão ser conduzidos com o intuito de elucidar os efeitos individuais dos componentes de manejo dos dois cultivos, como as cultivares e a adubação utilizada. Segundo Altieri (2002) muitos riscos ambientais estão associados com as plantas produzidas por engenharia genética. Vale ressaltar os efeitos

ecológicos imprevisíveis relacionados à microbiota do solo.

#### 4. CONCLUSÃO

O cultivo alternativo utilizando milho variedade apresentou maior taxa de colonização micorrízica em raízes e maior quantidade de glomalina facilmente extraída do que o cultivo com milho transgênico. A quantidade de esporos viáveis no solo foi similar em ambos os cultivos. As condições proporcionadas pelo cultivo alternativo do milho variedade foram mais favoráveis ao desenvolvimento dos fungos micorrízicos arbusculares, em relação ao cultivo convencional com milho transgênico.

#### 5. LITERATURA CITADA

- AGRIANUAL: **Anuário da agricultura brasileira**. ed. São Paulo: FNP informa economics, 2014. 466p.
- ALTIERI, M.A. Em defesa da adoção do princípio da preocupação. In: **Biotecnologia agrícola: mitos, riscos ambientais e alternativas**. ASCAR-EMATER/RS, p.1-61,2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CARDOSO, E.J.B.N. et al. Micorrizas arbusculares na aquisição de nutrientes pelas plantas. In: SIQUEIRA, J.O.; SOUZA, F.A.; CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. (Ed.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisa no Brasil**. Editora UFLA, p.153-214, 2010.
- CARRENHO, R.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Fungos micorrízicos arbusculares em rizosfera de três espécies de fitobiontes instaladas em área de mata ciliar revegetada. **Acta botânica brasílica**, v.15, p.115-124, 2001.
- CASTALDINI, M.; TURRINI, A.; SBRANA, C.; et al. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. **Cheese & Microbes. Applied and environmental microbiology**, vol.71, n.11, p.6719-6729.2005.
- CHAPARRO, J.M.; BADRI, D.V.; BAKKER, M.G. et al. Root exudation of phytochemicals in *Arabidopsis* follows specific patterns that are developmentally programmed and correlate with soil microbial functions. **PLoS one**, v.8, p.55731-55735,2013.
- CHEEKE, T.E.; PACE, B.A.; ROSENSTIEL, T.N.; CRUZA, M.B. The influence of fertilizer level and spore density on arbuscular mycorrhizal colonization of transgenic Bt 11 maize (*Zea mays*) in experimental microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, v.75, p.304-312, 2011.
- COLODETE, C.M.; SOUZA, S.B.; SANTOS, W.O. et al. Alterações na exsudação de raízes em plantas transgênicas e da comunidade microbiana da rizosfera colonizadas com micorrizas arbusculares. **Natureza online**, v.4, p.179-186,2013.
- FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.
- FERREIRA, D.F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamentos de experimentos – Sisvar 5.3 – Universidade Federal de Lavras**, 2010.
- FOLLI-PEREIRA, M.S.; MEIRA-HADDAD, L.S.; BAZZOLLI, D.M.S.; KASUYA, M.C.M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, p.1663-1679,2012.
- GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytology**, v.91, p.183-189, 1980.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, v.46, p.235-244,1963.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v.48, n.7, p.692, 1964.



MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Milho**. Brasília, DF: MAPA, 2014. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 07 out. 2014.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

NODARI, R.B.; GUERRA, M.P. Avaliação de riscos ambientais de plantas transgênicas. **Cadernos de Ciências & Tecnologia**, v.18, n.1, p.81-116, 2001.

REIS JÚNIOR, F.B.; MENDES, I.C.; HUNGRIA, M. **As plantas transgênicas e a microbiota do solo**. Embrapa Cerrados, 2005. 36p.

SÉRALINI, G-E.; CLAIR, E.; MESNAGE, R. et al. Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. **Environmental Sciences Europe**, v.26, n.14, 2014.

SIQUEIRA, J.O.; TRANNIN, I.C.B.; RAMAHLO, M.A.P.; FONTES, E.M.G. Interferências no agrossistema e riscos ambientais de culturas transgênicas tolerantes a herbicidas e protegidas contra insetos. **Cadernos Ciências & Tecnologia**, v.21, n.1, p.11-81, 2004.

SOUSA, C.S.; MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.B.; LIMA, F.S. Glomalia: características, produção, limitações e contribuição nos solos. **Ciências Agrárias**, v.33, p.3033-3044, 2012.

VIERHEILIG, H. et al. Inkand Vinegar, a Simple Staining Technique for Arbuscular-Mycorrhizal Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.5004-5007, 1998.

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.198, p.97-107, 1998.

Recebido para publicação em 30/10/2014 e aprovado em 30/07/2015.

<sup>1</sup> Centro de Pesquisa Mokiti Okada, Estrada Municipal Camaquã, s/nº - Rodovia SP 191, Km 82, CEP 13537-000, Ipeúna, SP, Brasil. E-mail: amalia.busoni@cpmo.org.br; juliana.scotton@cpmo.org.br; diego.pelizari@cpmo.org.br; b\_picareli@hotmail.com; rodrigo.longaresi@cpmo.org.br; sergio.homma@cpmo.org.br

