

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR COM GENÓTIPOS DE MILHO**

**Sueli da Silva Aquino**

Bióloga

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Engenharia da  
UNESP, Campus de Ilha Solteira,  
para a obtenção do título de Mestre  
em Agronomia - Área de  
Concentração: Sistemas de  
Produção.

**ILHA SOLTEIRA - SP**

**Maio – 2003**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE ENGENHARIA - CAMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR COM GENÓTIPOS DE MILHO**

Sueli da Silva Aquino

Bióloga

**Prof. Dra. Ana Maria Rodrigues Cassiolato**

Orientadora

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Engenharia da  
UNESP, Campus de Ilha Solteira,  
para a obtenção do título de Mestre  
em Agronomia - Área de  
Concentração: Sistemas de  
Produção.

**ILHA SOLTEIRA - SP**

**Maio – 2003**

**ASSOCIAÇÃO MICORRÍZICA ARBUSCULAR COM GENÓTIPOS DE  
MILHO**

**SUELI DA SILVA AQUINO**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DO CAMPUS  
DE ILHA SOLTEIRA – UNESP, COMO PARTE DOS REQUISITOS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM AGRONOMIA.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Prof. Dra. Ana Maria Rodrigues Cassiolato**  
**Orientadora**

**Prof. Dr. João Antonio da Costa Andrade**

**Prof. Dra. Sandra Maria Gomes da Costa**

**ILHA SOLTEIRA - SP**  
**Maió – 2003**

AQUINO, S.S. **Associação micorrízica arbuscular com genótipos de milho**. Ilha Solteira, 2003. 55p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

O milho é uma das culturas mais cultivadas no mundo, e constitui a base alimentar para milhões de pessoas, sendo uma das espécies mais estudadas e melhoradas atualmente. Devido ao seu rápido crescimento, esta cultura apresenta elevada demanda de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, podendo assim beneficiar-se da associação com microrganismos do solo, entre estes, os fungos micorrízicos arbusculares. O benefício destes é reconhecido cientificamente, e abrange um vasto número de culturas economicamente importantes, podendo destacar-se de um modo geral as gramíneas, como beneficiadas neste processo de associação simbiótica. O estudo foi conduzido em condições de campo, na Fazenda Experimental da Faculdade de Engenharia, Campus de Ilha Solteira – UNESP, localizada em Selvíria-MS, no ano agrícola de 2001/2002. O objetivo do trabalho foi verificar variações na associação micorrízica arbuscular com diferentes genótipos de milho, utilizando fungos micorrízicos arbusculares autóctones, em condições de campo com baixo nível tecnológico. Os caracteres estudados foram: número de esporos/100 g de solo, porcentagem de colonização micorrízica, altura de inserção de espiga, altura de planta, produção de matéria seca e rendimento de grãos, em linhagens endogâmicas e seus híbridos. O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com 2 repetições e 30 tratamentos. Para a porcentagem de colonização micorrízica foram detectadas diferenças significativas entre linhagens, híbridos e para o contraste linhagens *versus* híbridos. Para o rendimento de grãos, ocorreram diferenças significativas entre híbridos e para o contraste. A análise

qualitativa de fungos micorrízicos arbusculares autóctones constatou a presença de 12 espécies, sendo *Scutellospora calospora*, *Entrophospora colombiana*, e *Scutellospora pellucida*, as espécies mais abundantes. Ocorreram mudanças qualitativas e quantitativas na composição dos FMAs e associações preferenciais entre os genótipos. No geral os caracteres mostraram ser correlacionados positivamente, como a maior produção de matéria seca e rendimento de grãos. Para a porcentagem de colonização micorrízica, as correlações significativas observadas com altura de inserção da espiga, altura de planta, matéria seca e rendimento de grãos evidenciaram uma interação positiva entre a planta e o fungo. A heterose para rendimento de grãos não mostrou correlação com a heterose para porcentagem de colonização micorrízica. A associação entre colonização micorrízica e rendimento de grãos não foi suficientemente clara, e estudos quantitativos mais específicos serão necessários para separar a correlação genética da ambiental.

Termos para indexação: *Zea mays*, fungos micorrízicos arbusculares autóctones, híbridos, linhagens.

AQUINO, S.S. **Arbuscular mycorrhizal association with corn genotypes.** Ilha Solteira, 2003. 55p. Dissertation (Master Science in Agronomy) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Corn is one of the most cultivated crops in the world, and constitutes the alimentary basis for millions of people. Due to its faster growth, the corn crop presents high demand for nutrients, mainly nitrogen and phosphorus. Thus, the association with soil microorganisms, among these the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) could be very beneficial to the crop. This beneficial symbiotic association is recognized scientifically, and it embraces a vast number of cultures economically important. The present study was conducted in field conditions, in the Experimental Farm of UNESP - Campus de Ilha Solteira, located in Selvíria-SP, in the agricultural year of 2001/2002. The objective was to verify the of autochthonous association arbuscular mycorrhizal fungi with different corn genotypes in field conditions. The following characters were studied: number of spores/100 g of soil, percentage of mycorrhizal colonization, height of corn ear insert, plant height, dry matter production and grain yield in inbred lines and their hybrids. The experimental design was complete randomized blocks, with 2 repetitions and 30 treatments. For the percentage of mycorrhizal colonization significant differences were detected among inbred lines, hybrids and for the contrast inbred lines *versus* hybrids. For the grain yield, there was significant differences between hybrids and for the contrast. The qualitative analysis of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungi indicated the presence of 12 species. *Scutellospora calospora*, *Entrophospora colombiana* and *Scutellospora pellucida* were the most abundant ones. There were qualitative and

quantitative changes in the composition of AMF and preferential associations among AMFs and genotypes. In general, the characters were positively correlated with production of dry matter and productivity of grains. For percentage of mycorrhizal colonization, significant correlations observed for height of corn ear insert, plant height, dry matter production and grain yield. These observations evidenced an interaction between the plant and the fungi. Heterosis for grain yield did not show correlation with the heterosis for percentage of mycorrhizal colonization. However, the association between mycorrhizal colonization and productivity of grains was not sufficiently clear, and, more specific quantitative studies will be necessary to separate the genetic correlation from environmental effects.

**Index Terms:** *Zea mays*, autoctone arbuscular mycorrhizal fungi, hybrids, inbred lines.

## SUMÁRIO

Página	
	<b>RESUMO.....5</b>
	<b>ABSTRACT.....7</b>
	<b>SUMÁRIO ..... 10</b>
	<b>LISTA DE TABELAS ..... 12</b>
	<b>1. INTRODUÇÃO..... 14</b>
	<b>2. REVISÃO DE LITERATURA..... 14</b>
	2.1. Considerações sobre a cultura do milho ..... 14
	2.2. Fungos micorrízicos arbusculares ..... 15
	2.3. Fatores que afetam a eficiência simbiótica ..... 19
	2.4. Micorriza x nutrientes, especialmente o fósforo ..... 20
	2.5. Melhoramento x milho x micorriza ..... 22
	<b>3. MATERIAL E MÉTODOS ..... 26</b>
	3.1. Instalação do experimento ..... 26
	3.2. Histórico da área ..... 26
	3.3. Análise química do solo ..... 27
	3.4. Genótipos de milho ..... 28
	3.5. Delineamento experimental ..... 29
	3.6. Variáveis fitotécnicas..... 29
	3.7. Variáveis microbiológicas..... 30
	3.7.1. Taxa de colonização micorrízica ..... 30
	3.7.2. Contagem de esporos e análises quantitativa e qualitativa ..... 31
	3.8. Análise estatística ..... 32
	<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 34</b>
	<b>5. CONCLUSÕES..... 46</b>
	<b>6. REFERÊNCIAS ..... 47</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
01 Análise das características químicas do solo da área estudada antes da instalação do experimento de milho .....	29
02 Valores de F, coeficiente de variação e médias para os caracteres: altura de espiga (AE), altura de plantas (AP), produção de matéria seca (MS), número de esporos (ESP), colonização por fungos micorrízicos arbusculares autóctones (COL) e rendimento de grãos (REND), para genótipos de milho.....	36
03 Valores médios das linhagens de milho para os caracteres altura de espiga (AE), altura de plantas (AP), produção de matéria seca (MS), número de esporos (ESP), colonização por fungos micorrízicos autóctones (COL) e rendimento de grãos (REND) .....	37
04 Valores médios dos híbridos de milho para os caracteres altura de espigas (AE), altura de plantas (AP), produção de matéria seca (MS), número de esporos (ESP), colonização por fungos micorrízicos arbusculares autóctones (COL) e rendimento de grãos (REND) .....	39
05 Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares autóctones (%) antes da semeadura, dos genótipos de maior rendimento de grãos e respectivos parentais .....	41
06 Valores de heterose sobre a média dos pais (h %) e heterose sobre o pai superior (hs %) para rendimento de grãos (REND) e colonização por fungos micorrízicos arbusculares autóctones (COL), para os diferentes híbridos de milho .....	44

07	Coeficientes de correlação de Pearson entre altura de espigas (AE), altura de plantas (AP), produção de matéria seca (MS), número de esporos (ESP), colonização por fungos micorrízicos arbusculares autóctones (COL) e rendimento de grãos (REND), para genótipos de milho .....	45
----	---	----

## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento populacional e a diminuição das áreas produtivas por meio dos processos erosivos do solo, torna-se iminente a necessidade de aumentar a produtividade das culturas. O uso do melhoramento de plantas é bastante antigo, datando desde os tempos dos primeiros agricultores, que guardavam suas melhores sementes para o plantio da próxima safra. Isto fez com que, gradualmente, as espécies fossem se propagando e melhorando ao longo dos tempos. Atualmente, o melhoramento de plantas é uma estratégia imprescindível, pois visa, entre outros fatores, promover o aumento da produtividade agrícola, com o desenvolvimento de variedades melhoradas.

O milho é uma das culturas mais cultivadas no mundo, e constitui a base alimentar para milhões de pessoas, sendo uma das espécies mais estudadas e melhoradas atualmente. É um cereal que pode ser cultivado em diferentes climas, embora se desenvolva melhor sob temperaturas amenas, onde os problemas são relativamente mais simples que em climas tropicais. Assim, técnicas mais apropriadas são necessárias, como o plantio de cultivares mais adaptadas, sendo o uso de híbridos muito utilizado, visando minimizar esses problemas.

Devido ao seu rápido crescimento, esta cultura apresenta elevada demanda de nutrientes, especialmente o nitrogênio e o fósforo, podendo assim beneficiar-se das associações com microrganismos do solo, entre estes, os fungos micorrízicos arbusculares.

O benefício dos fungos micorrízicos é reconhecido cientificamente, e abrange um vasto número de culturas economicamente importantes, como as gramíneas. Estes fungos desempenham um papel importante na manutenção da fertilidade do solo, beneficiam o crescimento das plantas aumentando a sua

capacidade de absorção de nutrientes, principalmente o fósforo, atuam como agentes de controle biológico de microrganismos fitopatogênicos, aumentam a resistência das plantas nos períodos de seca, além de consistirem em um fator de agregação das partículas do solo (LOPES et al., 1983, p.1-19; JEFFRIES, 1987, p.319-357).

Estudos sobre a cultura do milho associado a micorrização vêm sendo realizados visando minimizar o uso e maximizar a eficiência dos insumos aplicados em solos de baixa fertilidade, por meio de alternativas biológicas. No entanto, a influência de diferentes genótipos sobre essa associação tem sido pouco estudada. A identificação de uma correlação entre alguma característica do fungo, ou da associação, com caracteres agrônômicos da planta é de especial interesse, pois possibilitará o uso de tais informações no melhoramento genético do milho, principalmente com genótipos mais rústicos, para os agricultores que não utilizam alta tecnologia em suas lavouras, devido ao alto custo dos insumos.

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo verificar as variações na associação micorrízica arbuscular com diferentes genótipos de milho, utilizando os fungos micorrízicos arbusculares autóctones, em condições de campo com baixo nível tecnológico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Considerações sobre a cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta pertencente à família Poaceae, e possui uma haste (colmo) cilíndrica com nós compactos. A cada nó abaixo do solo são produzidas raízes e, nos nós ao nível do solo ou imediatamente acima, são produzidos perfilhos e raízes adventícias. As folhas e ramificações, que podem permanecer no estado rudimentar ou se desenvolver para formar as “bonecas” (inflorescência feminina), são produzidas a partir dos nós, acima do solo. Os colmos são compactos e terminam com o pendão (inflorescência masculina). É uma planta anual, robusta e ereta, variando de 1 a 4 metros de altura. A característica monóica evoluiu pelo aborto dos órgãos pistilados na inflorescência superior (pendão) e dos órgãos estaminados nas inferiores (espiga), e contribuiu para a polinização cruzada e a extrema especialização da inflorescência (PATERNIANI & VIÉGAS, 1987, p.41-58). É uma planta alógama, cuja forma de reprodução natural ocorre com o acasalamento entre plantas; assim, as plantas de uma geração qualquer são naturalmente oriundas de gametas femininos e masculinos de diferentes plantas. A propagação do milho é sexuada, via sementes (SOUZA Jr, 2001, p.159-199).

O milho é originário da América, provavelmente da região onde hoje se situa o México e foi domesticado num período entre 7.000 e 10.000 anos atrás. Como resultado da seleção, tanto a artificial, praticada pelo homem, como a natural, para adaptação às diferentes condições ecológicas, o homem civilizado herdou dos povos mais antigos cerca de 300 raças de milho, caracterizadas pelas mais diversas adaptações, tanto para condições climáticas como para os vários usos do cereal.

Acrescente-se ainda a diversidade de variedades intra-raciais e a enorme quantidade de genes identificados, o que torna o milho a espécie botânica de maior diversidade genética existente na natureza. Praticamente toda essa variabilidade genética é fruto da seleção que, ao longo das gerações, foi promovendo o rearranjo progressivo do material genético (PATERNIANI, 1993, p.23-43).

No Brasil, o milho é o produto com maior volume de produção, seguido do trigo, arroz, sorgo e soja. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, sendo o segundo a China e o primeiro os Estados Unidos da América. A cultura do milho no Brasil ocupou uma área de 12.350.200 hectares e produziu 35.739.200 toneladas de grãos na safra 2001/2002. Entre os estados de maior produção, podemos destacar o Paraná com 9.333.100, Minas Gerais com 4.758.100, o Rio Grande do Sul com 3.976.500 e em quarto lugar São Paulo com 3.948.500 toneladas. A estimativa da produção brasileira para a safra 2002/2003 coloca o estado de São Paulo, como o segundo maior produtor de milho, com uma produção estimada de 4.336.754 toneladas (NEHMI et al., 2003, p.413-434).

Em função de seu potencial produtivo, composição química e valor nutritivo, o milho constitui-se em um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos no mundo. Devido à sua multiplicidade de aplicações na alimentação humana e animal, assume relevante papel socioeconômico, sendo também indispensável matéria prima impulsionadora de diversificados complexos agro-industriais (FANCELLI & DOURADO NETO, 2000).

## **2.2. Fungos micorrízicos arbusculares**

As plantas terrestres estabelecem simbioses mutualísticas ou parasíticas com diversos microrganismos, os quais encontram ambientes favoráveis nas partes aéreas ou subterrâneas dos vegetais. As associações entre raízes e determinados fungos do solo, denominados micorrizas, ocorrem na maioria das espécies vegetais superiores. O termo micorriza foi inicialmente proposto pelo botânico alemão Albert Bernard Frank, em 1885, originando-se do grego, onde “mico” significa fungo e “riza”, raízes. Este autor considerava as micorrizas como um fenômeno de ocorrência generalizada, resultante da união orgânica entre as raízes e o fungo, com dependência fisiológica íntima e recíproca, seguida pelo crescimento dos simbiontes e com funções fisiológicas muito estreitas. Os diferentes tipos de micorrizas foram

agrupados, com base nas características morfo-anatômicas das raízes colonizadas, em ectomicorrizas, ectendomicorrizas e endomicorrizas (SIQUEIRA & FRANCO, 1988, p.125-166).

Baseado em dados de seqüência molecular, as mais recentes estimativas colocam a origem dos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) entre 353 a 462 milhões de anos atrás, o que é coincidente com a evolução das plantas terrestres, sugerindo que os FMAs atuaram, de maneira decisiva, como instrumento facilitador da colonização terrestre pelas plantas ancestrais (SIMON, 1996, p.95-101).

As plantas diferem muito quanto à capacidade de formarem micorriza e se beneficiarem da associação. Sua dependência micorrízica é definida como sendo “o grau pelo qual a planta depende do fungo para crescimento ou produção máxima, a um dado nível de fertilidade” e são agrupadas em três graus de micotrofia. As Micorrízicas Obrigatórias, apresentam crescimento extremamente reduzido na ausência de FMAs. Possuem raízes curtas, grossas, pouco desenvolvidas e com pouco pêlo absorvente, como alguns genótipos de citros, mandioca, leguminosas tropicais, e outras, e dependem do fungo para absorção de nutrientes do solo. As Micorrízicas Facultativas têm o sistema radicular mais desenvolvido e mais eficiente na absorção de água e de nutrientes do solo, possui taxas de colonização micorrízicas geralmente mais baixas que as plantas do primeiro grupo e somente se beneficiam da associação em condições estressantes ao crescimento. As gramíneas, em geral, pertencem a esse grupo. As Não Micorrízicas incluem as plantas que não formam micorriza ou possuem “infecção passiva”, isto é, não dependem e não se beneficiam da associação com os fungos. As plantas que não formam micorriza são exceções na natureza (SIQUEIRA & FRANCO, 1988, p.125-166).

As raízes das gramíneas atuais apresentam muitas ramificações e radicelas com menos de 0,1 mm de diâmetro, freqüentemente com longos pêlos absorventes e respondem à colonização micorrízica somente em condições limitantes de fósforo, mostrando micotrofia facultativa. Entre estas plantas existe ligeira tendência para a diminuição do diâmetro da raiz e forte tendência à contínua cobertura de longos pêlos absorventes, à medida que a micotrofia diminui (BAYLIS, 1975, citado em ZANGARO FILHO, 1997).

Embora tradicionalmente classificados na Divisão Zygomycota, os fungos micorrízicos arbusculares apresentam divergências suficientes, com base na análise

do RNA ribossômico 18 S, para formarem uma nova Divisão. A Divisão Glomeromycota foi proposta para abrigar os organismos formadores de FMAs, colocando esse grupo de fungos no mesmo nível da hierarquia taxonômica que os tradicionais grupos basidiomicetos e ascomicetos (SCHUESSLER et al., 2001, p.1413-1421)

Na nova classificação taxonômica dos fungos formadores de micorriza arbuscular, proposta por Morton & Redecker (2001, p.181-195) estes passaram a pertencer à classe dos Zygomycetos, ordem Glomales, subordens Gigasporineae e Glomineae, com 5 famílias, 7 gêneros e 168 espécies, aproximadamente. A família Paraglomaceae abriga o gênero *Paraglomus*; a Archaeosporaceae o gênero *Archaeospora*; a Glomaceae o gênero *Glomus*, a Acaulosporaceae os gêneros *Entrophospora* e *Acaulospora* e a Gigasporaceae, os gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora*.

As endomicorrizas são caracterizadas pela ausência de modificações morfológicas nas raízes e por possuírem ampla distribuição, estando presentes em regiões tropicais, temperadas e árticas, tanto em florestas como em áreas cultivadas, cerrados, dunas e desertos (SILVEIRA, 1992, p.257-319). Resultam da colonização das raízes finas absorventes pelos fungos micorrízicos, após a germinação dos esporos de resistência no solo e formação de hifas asseptadas. Estas, por meio da formação de apressórios, penetram nas células da epiderme ou pêlos radiculares e invadem apenas o córtex primário, seja inter ou intracelularmente, mantendo a conexão entre a raiz e o solo. A colonização radicular pelos fungos micorrízicos arbusculares é principalmente caracterizada pela formação de arbúsculos e ou vesículas (MIRANDA, 1992). Os arbúsculos são estruturas efêmeras que ocorrem no interior de células corticais, tendo função na troca de nutrientes entre os organismos simbiotes, e suas origens são as ramificações dicotômicas das hifas (SCANNERINI & BOFANTE FASOLO, 1983, p.917-943). As vesículas são estruturas globulares esféricas com função de armazenamento de substâncias de excreção ou reserva, como óleos, e ocorrem inter e intracelularmente às raízes, e também no solo (SIQUEIRA & COLOZZI-FILHO, 1986, p.207-211). Além da colonização intraradical, parte do micélio desenvolve-se externamente, comportando-se como extensões do sistema radicular da planta.

Os esporos formados pelos FMAs são de origem assexuada e servem para sua disseminação e sobrevivência. Possuem diâmetro que varia de 45 a 700



µm (os maiores encontrados no Reino), coloração hialina, amarelada, esverdeada, amarronzada ou mesmo preta, e forma globosa, alongada ou muitas vezes irregular, podendo ter parede lisa ou ornamentada. Os tipos de esporos são distinguíveis em função de sua ontogenia que, juntamente com características estruturais, formam a base da taxonomia e da sistemática dos FMAs (MORTON, 1988, p.267-324).

Para compensar a transferência de nutrientes minerais à planta, os fungos simbiontes recebem carbono da planta hospedeira para o seu crescimento, das células do córtex, região onde ocorre a formação dos arbúsculos, principal sítio de transferência (GIANINAZZI-PEARSON & GIANINAZZI, 1983, p.197-209). O carbono passa através da interface fungo-planta, onde os carboidratos, predominantemente a sacarose, são liberados pelas células do hospedeiro, hidrolisados na interface apoplástica por invertases à hexoses, as quais são absorvidas ativamente pelos fungos (SIQUEIRA & FRANCO, 1988, p.125-166). O conteúdo de fosfolipídios das células das raízes regula a simbiose, via fuga de carbono pela membrana, para manter a atividade do fungo (GRAHAM & EISSENSTAT, 1994, p.179-185).

As micorrizas podem favorecer o crescimento das plantas atuando como agente de controle biológico, aumentar a resistência das plantas nos períodos de seca e de mudas na ocasião do transplante, consistir em fator de agregação das partículas do solo (JEFFRIES, 1987, p.319-357) e pelo efeito físico das hifas (SIQUEIRA, 1993, p.153-183).

A natureza das relações de especificidade é complexa e envolve interações tríplices planta-solo-fungo. A eficiência de um determinado fungo é influenciada pelo hospedeiro, sendo que certas associações hospedeiro-fungo são mais eficientes que outras. As associações simbióticas entre FMAs e raízes de plantas apresentam baixa especificidade, ou seja, qualquer espécie de planta capaz de desenvolver a micorriza pode ser colonizada por quaisquer destes fungos (MOSSE, 1981). Desta maneira, as hifas externas dos FMAs no solo, conectadas às estruturas fúngicas dentro da raiz, estabelecem interconexões entre plantas de mesma ou de diferentes espécies (NEWMAN & EASON, 1993, p.242-248).

Segundo Bethlenfalvay (1992, p.1-27), as interações obtidas entre as populações de FMAs autóctones e as espécies de plantas geneticamente melhoradas para a agricultura atual, talvez possam desenvolver preferências genéticas entre os simbiontes. Como resultado, a expressão fenotípica da associação dos FMAs (crescimento, produção, resistência a estresses, colonização

da raiz e solo, etc.) poderá ser afetada negativamente quando o fitobionte for retirado do seu centro de diversidade e levado para novas áreas de cultivo, onde existirá uma microflora do solo ou micota de FMAs exóticas.

### **2.3. Fatores que afetam a eficiência simbiótica**

A eficiência simbiótica é afetada por fatores que controlam o crescimento em extensão do fungo no solo, a translocação e liberação de fósforo na raiz do hospedeiro e a patogenicidade latente em relação ao hospedeiro. As associações micorrízicas são dependentes de uma série de fatores relacionados aos diferentes aspectos do sistema solo-planta-atmosfera. Ao mesmo tempo, devido à diversidade de espécies de fungos que compõem as micorrizas arbusculares, é provável que estas tenham diferentes requerimentos para o crescimento, divergindo, concomitante, nas suas relações com as diferentes condições ambientais. Parece evidente também que o grau de aumento na absorção de nutrientes, como o fosfato, não é o mesmo para todos os fungos em qualquer solo, visto que diversos fatores afetam a eficiência do endófito. Portanto, as interações entre solo e fungo são bastante complexas, uma vez que ambos estão intimamente relacionados (MOSSE, 1981).

A associação micorrízica e a produção de esporos podem ser afetadas direta ou indiretamente por fatores como pH, temperatura, salinidade, disponibilidade de nutrientes, umidade, aeração, luz, planta hospedeira e interação com outros microrganismos, além de agrotóxicos. Em agrossistemas, o uso intensivo de insumos pode promover uma diminuição em até 50% das espécies de FMAs, se comparado com ecossistemas naturais (SIEVERDING, 1990, p.369-390).

A condição de acidez dos solos tropicais é um problema sério, pelo fato de promover a toxidez do alumínio (Al) nas plantas. A toxidez é particularmente severa em solos com pH inferior a 5,0 e a tolerância a este elemento é um fator importante para a adaptação das mesmas. A adaptação a tais solos requer alta eficiência na absorção e utilização de nutrientes. A toxidez de Al no milho provoca o encurtamento e engrossamento das raízes e desenvolvimento reduzido da parte aérea (MALAVOLTA et al., 1997). Concentrações até mesmo inferior aquelas encontradas na solução do solo, podem inibir a germinação dos esporos e, conseqüentemente a micorrização (SIQUEIRA, 1993, p.153-183).

A influencia do pH do solo na eficiência micorrízica tem mostrado que alguns endófitos se comportam melhor em meio neutro ou alcalino, e outros, em meios ácidos. Desta forma, o pH influencia qualitativa e quantitativamente os fungos micorrízicos arbusculares e, as variações do mesmo, interferem no índice de ocorrência das espécies, densidade de esporos na rizosfera, proporção dos diferentes fungos nas raízes e germinação dos esporos. Portanto, a calagem em solos ácidos pode, pelo menos temporariamente, reduzir a formação de micoriza, pois a elevação do pH pode causar efeitos adversos sobre a infectividade dos fungos autóctones, adaptados às condições ácidas (SIQUEIRA & FRANCO, 1988, p.125-166).

A temperatura do solo e sua influência sobre a associação micorrízica, bem como sobre sua eficiência, também tem sido estudada. Uma vez relacionada com a germinação de esporos e colonização das raízes do hospedeiro, pode causar precocidade ou o não estabelecimento do fungo na raiz, mascarando seu real comportamento. Um maior conhecimento dos efeitos da temperatura na colonização, esporulação e resposta da planta induzida pelo fungo, poderá ser útil na aplicação prática na agricultura (FURLAN & FORTIN, 1973, p.467-477).

#### **2.4. Micorriza x nutrientes, especialmente o fósforo**

A rede de hifas dos FMA, externa à raiz da planta, apresenta importante função na absorção de nutrientes, especialmente para os íons que são pouco móveis na solução do solo, como o fósforo (P). Este elemento desempenha papel fundamental na transferência de energia nas plantas, por ser constituinte de uma série de compostos vitais do metabolismo dos vegetais. Nem todo o P presente no solo está disponível para o vegetal. O P inorgânico pode ser dividido em três frações principais: fósforo em solução ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$ ), P lábil e o P não lábil. O P em solução é o único que pode ser absorvido diretamente pelas plantas. A disponibilidade do P pode ser afetada pelo pH. Nos solos ácidos o Al e o ferro (Fe) tornam-se mais solúveis e reagem com  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , formando fosfatos insolúveis (EMBRAPA, 1993).

Um dos efeitos dos FMA na absorção do P deve-se à capacidade das hifas externas em explorar o solo e acessar o P, situado além da zona de esgotamento ao redor das raízes. A exploração física é facilitada pelo pequeno

diâmetro das hifas, adequada para absorver nos microporos do solo, onde os pêlos absorventes não têm acesso. O P é provavelmente translocado pelas hifas na forma de polifosfato, e a transferência do P inorgânico à planta ocorre por meio do transporte passivo do fungo no interior da interface simbiótica, seguido por absorção ativa pela célula da planta (JAKOBSEN, 1995, p.297-324).

Além da capacidade dos FMAs suprirem a planta colonizada com P, por meio da capacidade do micélio externo para absorvê-lo (GIANINAZZI-PEARSON & GIANINAZZI, 1983, 197-209), a atividade das fosfatases ácidas, produzidas pelas raízes e hifas dos FMA, com a conseqüente mudança do pH na região da rizosfera, aumenta a disponibilidade do P inorgânico à ser absorvido (JAKOBSEN, 1995, p.297-324).

A produção de hifas externas pode variar consideravelmente entre as espécies de FMAs, e a absorção do P varia com a taxa de crescimento destas hifas no solo, com o seu comprimento e longevidade (ABBOTT & ROBSON, 1982, p.389-408). THOMSON et al. (1990, p.647-653) relatam que a taxa de absorção e transporte do P pelas hifas à planta é regulada tanto pela demanda de P pela planta e da absorção de P pelos FMAs, como pela concentração interna nas hifas e da capacidade do fungo em translocar e transferir P para o seu hospedeiro. Essa regulação, portanto, é mútua entre os simbioses (JAKOBSEN, 1995, p.297-324).

Espécies de FMAs diferem na extensão pela qual aumentam a absorção de nutrientes e o crescimento da planta (SIEVERDING, 1990, p.369-390). Estes efeitos também diferem de acordo com a espécie da planta. Algumas espécies de FMAs podem ser mais efetivas que outras para aumentar o crescimento da planta em solos deficientes. Segundo ABBOTT & ROBSON (1982, p.389-408), existem pelo menos quatro fatores relacionados com a efetividade de um FMA: a capacidade para formar hifas extensivas e bem definidas no solo; a capacidade para formar extensiva colonização por todo o sistema de raízes; a capacidade das hifas para absorver P da solução do solo e a longevidade do mecanismo de transporte ao longo das hifas e dentro da raiz.

Em campo, o transporte de P pelos fungos micorrízicos pode ser influenciado por diversos fatores do ambiente que produzam efeitos no funcionamento das hifas extraradiciais e nas taxas de colonização das raízes (ABBOTT & ROBSON, 1991, p.121-150). JAKOBSEN (1995, p.297-324) investigando a relação entre o transporte de P pelas hifas e a taxa de colonização

das raízes pelos fungos autóctones em *Trifolium subterraneum*, crescendo em solos oriundos de cinco pastagens, em casa de vegetação, verificou que o transporte de P pelas hifas diferiu entre as áreas estudadas, e que não houve relação entre o transporte de P, a colonização das raízes e os níveis de P no solo. Os autores sugeriram que o transporte de P pelas hifas em campo pode ser influenciado pela diversidade da população de FMAs e pela competição direta dos fungos pelos pontos de colonização das raízes. Portanto, a grande diferença entre as espécies de fungos na capacidade de aumentar o crescimento das plantas à taxas similares de colonização das raízes ou comprimento de hifas, podem ser atribuídas à eficiência no transporte do P entre as diferentes espécies.

## **2.5. Melhoramento x milho x micorriza**

Os primórdios do melhoramento genético vegetal perdem-se na pré-história e confundem-se com a origem das plantas cultivadas pelo homem. O homem embarcou num programa de melhoramento vegetal no momento em que começou a cultivar as plantas para seu próprio uso. A maioria das plantas que alimenta ou fornece as fibras de nosso vestuário foi domesticada ainda na idade da pedra e não poderia hoje sobreviver, em estado selvagem, sem os tratos culturais proporcionados pelo homem. A ênfase dada ao aumento da produtividade agrícola pelo melhoramento genético é conseqüência da grande necessidade de uma fonte adequada de alimentação, capaz de satisfazer o constante crescimento da população num mundo de área limitada (PAIVA & VALOIS, 2001, p.79-99). Os cultivares desenvolvidos nos programas de melhoramento genético precisam atender, simultaneamente, agricultores e consumidores, sendo que os primeiros anseiam por cultivares que apresentem maior produtividade e resistência às pragas e doenças, maior estabilidade de produção, resistência às ocorrências climáticas indesejáveis, e os segundos exigem produtos com melhor qualidade nutricional ou maior teor de um determinado produto ou substância. Nos programas de melhoramento é preciso classificar os genótipos corretamente para que “o (s) genótipo (s) superior (s)” sejam reconhecidos, selecionados e multiplicados para que os agricultores venham a utilizá-los (SOUZA Jr, 2001, p.159-199).

Embora requerendo várias gerações para obter linhagens com alto nível de homozigose, o método-padrão de melhoramento ainda constitui em sua essência,

na obtenção de linhagens e confecção de híbridos, sendo os outros métodos, na sua maioria, modificações deste. Consiste em autofecundar, por sucessivas gerações plantas selecionadas, as quais são escolhidas tendo em vista os objetivos de melhoramento (PATERNIANI & CAMPOS, 1999, p.429-485).

Outro aspecto que deve ser considerado é a depressão por endogamia das populações utilizadas para a extração de linhagens, uma vez que esta é geralmente muito elevada, e as linhagens devem ter um nível de comportamento mínimo para serem utilizadas comercialmente. Portanto, estas populações devem ser avaliadas quanto à depressão por endogamia e selecionadas aquelas menos sensíveis e escolhidas para a obtenção das linhagens (SOUZA Jr, 2001, p.159-199).

A endogamia pode ser usada para o desenvolvimento de linhas puras (homozigóticas) para fins de desenvolvimento de híbridos. Esta por si só não promove nenhum melhoramento, mas simplesmente causa uma reorganização na população, permitindo o aparecimento dos tipos homozigóticos que podem ser mais ou menos desejáveis, como se queira. O fenômeno conhecido como depressão por endogamia ocorre universalmente nos reinos vegetal e animal. A depressão propriamente dita é uma diminuição na expressão de caracteres quantitativos, em decorrência do aumento de homozigose causado pela endogamia. A depressão pode ser causada por genes recessivos deletérios que, em homozigose causam forte redução na expressão de caracteres ou de genes recessivos de efeitos pequenos e quantitativos e que não são reconhecidos visualmente por seus efeitos individuais, mas sim pelo resultado em conjunto (MIRANDA FILHO, 2001, p.629-647).

Neste processo, que é o mais rápido para obter as linhagens, o nível de heterozigose é reduzido à metade em cada geração de autofecundação, de forma que na primeira geração de autofecundação ( $S_1$ ) tem-se 50 % de locos em homozigose, na segunda geração ( $S_2$ ) 75 %, na terceira, quarta, quinta, sexta e sétima gerações têm-se 87,50, 93,75, 96,88, 98,44 e 99,22 %, respectivamente. Na sétima geração ( $S_7$ ) de autofecundação, quase 100 % dos locos estão em homozigose e, para fins de melhoramento, considera-se que as plantas já atingiram a homozigose, pois as linhagens já estão com os caracteres fixados e são facilmente distinguíveis umas das outras e, também, as variações entre plantas dentro de cada linhagem são praticamente imperceptíveis (SOUZA Jr, 2001, p.159-199).

Os híbridos são resultados do cruzamento entre indivíduos geneticamente distintos, visando à utilização prática da heterose. São heterozigóticos para a maioria dos locos, homogêneos e podem ser obtidos do cruzamento de duas linhagens endogâmicas ( $P1 \times P2$ ), dando origem ao híbrido simples; de três linhagens endogâmicas  $[(P1 \times P2) \times P3]$ , originando o híbrido triplo; ou de quatro linhagens endogâmicas  $[(P1 \times P2) \times (P3 \times P4)]$ , o híbrido duplo. Além de linhagens endogâmicas, podem ser utilizadas variedades de polinização aberta, clones ou linhas puras na obtenção dos híbridos. No Brasil dois grupos de milho, são freqüentemente referidos na literatura: o grupo Duro, originário da variedade de polinização aberta Cateto, e o grupo Dentado, resultante da variedade de polinização aberta Tuxpeno. A maioria dos híbridos comerciais no Brasil envolvem cruzamentos entre linhagens pertencentes a esses dois grupos heteróticos (BORÉM, 1997).

O comportamento dos híbridos é função da heterose expressa no cruzamento entre os progenitores selecionados. A heterose geralmente é aumentada em função da distância genética entre os progenitores. O objetivo no desenvolvimento de híbridos é identificar linhagens que, quando cruzadas entre si expressam alto vigor por combinarem bem. Do ponto de vista acadêmico, o híbrido expressa heterose quando é superior à média dos progenitores, mas, do ponto de vista comercial, quando é superior ao melhor progenitor. A manifestação do vigor híbrido pode ser observada na área foliar, no desenvolvimento do sistema radicular, na altura de planta, na produtividade, na taxa fotossintética, no metabolismo celular, no tamanho de célula, no tamanho ou cor do fruto e na precocidade, dentre outras características. A principal vantagem dos cultivares híbridos, como já evidenciado, é o aumento da produtividade em razão da heterose. Os cultivares híbridos também asseguram ao melhorista o controle da produção de sementes, possibilitando-lhe retorno econômico. O grande desafio dos programas de melhoramento é desenvolver híbridos com caracteres agronômicos desejáveis, com heterose que minimizem os custos na produção de sementes e proporcionem vantagens econômicas ao agricultor (BORÉM, 1997).

Apesar do grande volume de pesquisas sobre micorrizas em plantas de milho, os efeitos do melhoramento nas associações micorrízicas ainda são pouco conhecidos, assim como da interferência dos fungos micorrízicos arbusculares na capacidade competitiva de diferentes genótipos.

Tanto a planta hospedeira quanto o fungo, constituem fatores determinantes do grau de colonização e eficiência das micorrizas. As plantas exibem grande variabilidade de suscetibilidade à formação das mesmas, as quais, por sua vez, parecem ser controladas geneticamente, podendo estender-se até mesmo ao nível de variedade (BERTHEAU et al., 1980, citado por LOPES et al., 1983). Diferentes espécies ou isolamentos de uma mesma espécie de fungo são também responsáveis por variações no grau de colonização e no funcionamento da simbiose (LOPES et al., 1980, p.241-245).

O controle genético exercido por diferentes espécies de fungos e variedades de planta, é provavelmente o fator importante que influencia a micorrização. Em um estudo realizado com milho visando a obtenção de plantas melhoradas para resistência a fungos patogênicos, foi constatado que linhagens selecionadas para maior resistência apresentavam menor colonização micorrízica e maior sistema radicular. Sem determinar a seqüência causa-efeito, TOTH et al. (1990, p.1039-1044) asseguraram que, independente da causa, o programa de melhoramento para resistência à doenças em milho influenciou a capacidade da planta em formar micorrizas. Trabalhando com genótipos de milheto inoculado ou não com *G. caledonicum*, Tewari et al. (1993, p.191-195) observaram que os genótipos das plantas influenciaram a taxa de colonização micorrízica, mostrando que a demanda da planta hospedeira pôde determinar, pelo menos parcialmente, a resposta-induzida dos fungos micorrízicos.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Instalação do experimento**

O experimento foi conduzido no ano agrícola de 2001/02, na Fazenda de Ensino e Pesquisa da Faculdade de Engenharia - UNESP, Campus de Ilha Solteira, localizada no município de Selvíria-MS. Apresenta como coordenadas geográficas 51° 22' de longitude Oeste e 20° 22' de latitude sul e altitude de 335 metros. A média anual de precipitação é 1370 mm e a temperatura é de 23,5 °C, sendo janeiro e fevereiro os meses mais quentes (25,7 °C) e junho e julho os mais frios (20,5 °C). A umidade relativa do ar é de 64,8 %. De acordo com Koppen, o tipo climático é Aw, caracterizado como tropical úmido, com estação chuvosa no verão e seca no inverno.

O solo foi classificado, por Demattê (1980), como Latossolo Vermelho epi-eutrófico álico, textura argilosa, e reclassificado como LATOSSOLO VERMELHO Distrófico, de acordo com atual nomenclatura do Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 1999).

#### **3.2. Histórico da área**

No local foi conduzido milho no período de março a agosto 1999, seguido de um pousio entre agosto de 1999 a novembro de 2000. O milho foi novamente conduzido entre os meses de novembro de 2000 a março de 2001 e, a seguir,

realizada a semeadura da leguminosa *Crotalaria juncea*, que ocupou a área de março a novembro de 2001.

A semeadura do experimento foi feita manualmente, com o auxílio de matracas, no dia 21 de dezembro de 2001. O preparo do solo constou de uma aração e de uma gradagem de nivelamento. Foram aplicados apenas 20 kg ha<sup>-1</sup> de N na forma de uréia no sulco, mas não foi realizada adubação de cobertura, procurando se aproximar de um sistema de baixa tecnologia na condução da cultura. Não foi realizado tratamento de sementes e nem aplicação de qualquer outro produto no solo, visando não prejudicar a comunidade microbiana existente no mesmo.

As coletas foram realizadas em três épocas: a primeira ocorreu antes da instalação do experimento, no dia 17 de dezembro de 2001. A segunda em 14 de fevereiro de 2002, quando as plantas emitiram os pendões (inflorescência masculina) e a terceira no final do ciclo da planta, no dia 10 de abril de 2002. Na primeira foram coletadas amostras de solo, para realizar a análise das características químicas e avaliação de esporos de FMAs autóctones antes da semeadura da cultura. Amostras de solo foram utilizadas para a contagem do número de esporos em todos os tratamentos e as raízes foram utilizadas para a quantificação da colonização micorrízica. Na terceira coleta foram realizadas as análises dos diferentes caracteres fitotécnicos. Todos os caracteres serão discutidos posteriormente.

### **3.3. Análise química do solo**

O solo foi amostrado antes da implantação do experimento na profundidade de 0-15 cm. Estas foram secas à sombra, peneiradas (malha de 2 mm), homogeneizadas e uma amostra foi enviada para análise das características químicas ao Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas do Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos da UNESP, Campus de Ilha Solteira, onde a análise seguiu metodologia proposta por RAIJ & QUAGGIO (1983). O resultado está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Análise das características químicas do solo da área utilizada antes da instalação do experimento.

pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC	V
CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	mg dm <sup>-3</sup>	-----mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>				-----			%
4,5	21	20	1,4	11	9	42	3	22,2	64,2	35

### 3.4. Genótipos de milho

Parte dos materiais genéticos empregados, ou seja, as linhagens Flintisa e Dentado e os híbridos provenientes dos cruzamentos destas, fazem parte do projeto de melhoramento para baixa tecnologia, em Cerrado, que vem sendo desenvolvido na UNESP/Ilha Solteira, pelo professor de Melhoramento Vegetal, Dr. João Antônio da Costa Andrade. Também foram utilizadas linhagens puras originadas da variedade ESALQ-PB 1, híbridos simples da firma Semeali e híbridos triplos provenientes do cruzamento destes. Os tratamentos estão descritos abaixo:

- a) 5 linhagens S<sub>5</sub> (5<sup>a</sup> geração de autofecundação) originadas do Composto Flintisa (F1, F2, F3, F4 e F5);
- b) 5 linhagens S<sub>5</sub> originadas do Composto Dentado (D1, D2, D3, D4 e D5);
- c) 5 híbridos simples provenientes do cruzamento entre as linhagens S<sub>5</sub> do Flintisa e Dentado (D1 x F2, D2 x F4, D3 x F5, D4 x F3);
- d) 3 linhagens puras originadas da variedade ESALQ-PB 1 (E1, E2 e E3);
- e) 3 híbridos simples Semeali (HS 10, HS 32 e HS 83);
- f) 9 híbridos triplos resultantes do cruzamento entre as linhagens puras do ESALQ-PB1 e os híbridos simples da Semeali (HS 10 x E1; HS 10 x E3; HS 10 x E5; HS 32 x E1; HS 32 x E3; HS 32 x E5; HS 83 x E1; HS 83 x E3 e HS 83 x E5).

O Composto Flintisa foi obtido pela recombinação das populações ESALQ-VF I, SUWAN e CATETO COLÔMBIA (Andrade, 2002) dados não publicados). O Composto Dentado PB (CMS-06) foi obtido originalmente do Banco de germoplasma do CNPMS-EMBRAPA, sendo a mesma população utilizada por esta instituição como base para obtenção da variedade BR 106, largamente utilizada no Brasil, principalmente por produtores de baixo nível tecnológico. O Composto ESALQ-PB 1 foi obtido no Instituto de Genética da ESALQ/USP, a partir do intercruzamento de sete variedades de porte baixo como característica poligênica, com base no trabalho de MIRANDA FILHO (1974).

Todos os híbridos e seus parentais são experimentais, exceto os híbridos da SEMEALI, que são utilizados como parentais de diversos híbridos comerciais (duplos e triplos).

### 3.5. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado para o ensaio foi o de blocos inteiramente casualizados, com 30 tratamentos e 2 repetições, totalizando 60 parcelas. Os tratamentos constaram de 13 linhagens, 8 híbridos simples e 9 híbridos triplos. As parcelas foram constituídas de duas linhas de dois metros, espaçadas de 0,85 m entre linhas e 0,20 m entre plantas, totalizando 20 plantas. Foram semeadas duas sementes por cova e o desbaste foi realizado no estágio de 5 folhas estabelecidas.

Para evitar que as linhagens (que são pouco vigorosas), fossem abafadas pelos híbridos, estas foram agrupadas dentro de cada bloco, no momento da casualização dos tratamentos. Desta maneira, restringiu-se a competição entre as linhagens e os híbridos, o que seria desfavorável às linhagens.

### 3.6. Variáveis fitotécnicas

- **Altura de plantas (AP):** medida em metros, do nível do solo até o final da bainha da folha bandeira (média de cinco plantas por parcela);
- **Altura de espigas (AE):** medida em metros, do nível do solo até a inserção da espiga superior (média de cinco plantas por parcela);

- **Matéria seca (MS):** a determinação deste caráter foi realizado, utilizando cinco plantas coletadas aleatoriamente na parcela. O material foi secado em estufa de circulação de ar à 60 °C, até massa constante. A seguir a matéria seca foi aferida em kg.
- **Rendimento de grãos (RG):** tomado em kg como total da parcela;

O rendimento de grãos foi corrigido (VENCOVSKY & BARRIGA, 1992) para umidade uniforme de 13,0 %, pela fórmula:  $RGC = RG (1 - U)/0,87$ , onde,

RGC é o rendimento de grãos corrigido para umidade;

RG é o rendimento de grãos observado e

U é a umidade observada.

O RGC foi corrigido para estande ideal de 20 plantas por parcela, através da seguinte fórmula:  $REND = RGC - b (E - 20)$ , onde,

REND é o rendimento de grãos corrigido para umidade constante e estande de 20 plantas por parcela;

b é o coeficiente de regressão do RGC em relação ao estande, obtido através da análise de covariância entre as duas variáveis e;

E é o estande observado em cada parcela.

### **3.7. Variáveis microbiológicas**

#### **3.7.1. Taxa de colonização micorrízica**

As amostras de raízes coletadas das plantas dos diferentes tratamentos foram lavadas em água corrente e armazenadas em frascos contendo álcool 50 %. Posteriormente, para realização da coloração, um grama de raiz foi lavada em água corrente e clarificada por meio de aquecimento à 90 °C em solução de KOH 10 %, aquecida à 90 °C por uma hora, seguida de acidificação com HCl 1 %, por três horas em temperatura ambiente e mais quinze minutos em banho-maria à 90 °C. A seguir foram lavadas em água corrente e coradas com azul de tripano a 0,05 % por

cinco minutos à 90 °C (PHILLIPS & HAYMAN, 1970, p.158-161). As raízes foram lavadas em água corrente, para retirar o excesso do corante e preservadas em lactoglicerol até o momento da avaliação. Foram analisadas 3 lâminas contendo 10 segmentos de um centímetro cada, perfazendo um total de 30 segmentos por parcela e a avaliação da taxa de colonização micorrízica foi feita sob microscópio óptico 40x (COLLOZI-FILHO & BALOTA, 1994, p.383-418).

### **3.7.2. Contagem de esporos e análises quantitativa e qualitativa**

As amostras de solo da rizosfera dos diferentes tratamentos foram coletadas quando as plantas emitiam os pendões (inflorescência masculina), 60 dias após a semeadura. A seguir foram secas à sombra, peneiradas e homogeneizadas. Os esporos dos FMAs foram separados e coletados por meio do método de peneiramento por via úmida e decantação (GERDEMANN & NICOLSON, 1963, p.234-244) seguidos de centrifugação com sacarose (JENKINS, 1964, p.288-300). Por amostra, 100 gramas de solo foram misturados em dois litros de água, em um béquer, e agitado vigorosamente. Após decantação por alguns segundos, para sedimentação das partículas maiores e/ou mais densas que os esporos, o sobrenadante foi passado quatro vezes por duas peneiras, com aberturas de 710 µm e 50 µm, na seqüência da maior para a menor abertura da malha.

O material coletado foi transferido para tubos e centrifugado por 4 minutos a 302,1 g. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e a seguir, ressuspenso em sacarose 50 % com a ajuda de um agitador mecânico de tubos, e novamente centrifugados por mais 1 minuto. Os esporos presentes no sobrenadante foram transferidos para a peneira de malha de 50 µm, lavados com água em abundância, para retirar o excesso de sacarose, e recolhidos em um béquer pequeno. A análise quantitativa dos esporos de FMAs autóctones foi realizada usando uma placa concêntrica de acrílico com anéis, sob o microscópio estereoscópio (40x). Para cada repetição por tratamento, o processo foi repetido por três vezes, e a média analisada estatisticamente.

A análise qualitativa dos esporos de FMAs seguiu a metodologia para obtenção de esporos, como descrita acima, utilizando as amostras de solo de rizosfera dos dois híbridos que apresentaram os maiores rendimentos de grãos e

seus respectivos parentais. Para a identificação dos fungos, procedeu-se a confecção de lâminas permanentes, preparadas com resina de álcool polivinílico, ácido láctico e fenol (WALKER, 1979, p.98). A análise das características como: morfologia dos esporos, tamanho, forma, número e características das paredes, posição da hifa, etc, foram utilizadas para a identificação dos diferentes táxons de FMAs. A identificação foi realizada pela professora Dra. Sandra Gomes da Costa da Universidade Estadual de Maringá, sob microscópio óptico, com aumentos de 40 a 1000 vezes (SCHENK & PÉREZ, 1988). Somente os esporos aparentemente saudáveis e com conteúdo citoplasmático foram considerados, desprezando os que estavam deteriorados.

As diferenças de fungos micorrízicos arbusculares autóctones presentes nos híbridos mais produtivos e seus respectivos parentais foram, analisadas pela determinação dos parâmetros: média do número de esporos e freqüência numérica (abundância).

a) – Média do número de esporos ( $\bar{x}$ ), obtida pela contagem dos esporos em três amostras de 100 g de solo, por parcela.

b) – Freqüência numérica (FN), foi calculada utilizando a fórmula:

$$FN = (\bar{x}/\bar{xt})100$$

Onde,  $\bar{x}$  indica a média do número de esporos de uma espécie de FMAs, em cada tratamento (híbridos e parentais) e  $\bar{xt}$  indica a somatória das médias de todas as espécies em um dado genótipo.

### 3.8. Análise estatística

Os dados foram analisados seguindo o modelo  $Y_{ij} = m + b_j + t_i + e_{ij}$ , onde  $Y_{ij}$  é a observação do tratamento  $i$  no bloco  $j$ ;  $m$  é a média geral;  $b_j$  é o efeito do bloco  $j$ ;  $t_i$  é o efeito do tratamento  $i$  e  $e_{ij}$  indica o erro experimental associado à parcela  $ij$ . Na análise estatística o quadrado médio de tratamentos desdobrado entre linhagens, híbridos e linhagens *versus* híbridos. As médias dentro de cada grupo, foram comparadas pelo teste de Tukey e calculada a correlação de Pearson entre todos os caracteres envolvidos. Foi calculado o valor da heterose (%) sobre a média

dos pais ( $P_1$  e  $P_2$ ) nos cruzamentos envolvidos, usando a fórmula:  $h (\%) = 100 [F_1 - (P_1+P_2) / 2] / [(P_1 + P_2) / 2]$ . E o cálculo para heterose sobre o pai superior ( $P_{\text{maior}}$ ) para os cruzamentos envolvidos, usando a fórmula:  $hs (\%) = 100 (F_1 - P_{\text{maior}}) / P_{\text{maior}}$ , onde,  $F_1$  é a média do híbrido,  $(P_1+P_2) / 2$  é a média dos parentais do híbrido e  $P_{\text{maior}}$ , é a média do melhor parental do híbrido, para os caracteres altura de planta, altura de espiga, rendimento de grãos, contagem de esporos e colonização micorrízica, nos diferentes cruzamentos.



#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado da análise das características químicas do solo apresentado na Tabela 1 revela a condição ácida do solo, característica do cerrado. Em solos com alta capacidade de adsorção de fósforo, a concentração deste na solução do solo é baixa e a difusão para as raízes será reduzida. É neste tipo de solo que os grandes benefícios serão obtidos pelas plantas hospedeiras quando associadas com os FMAs (THOMSON et al., 1990, p.647-653). Nos trópicos, a baixa fertilidade do solo, a limitada disponibilidade do fósforo e a alta concentração de alumínio propiciam a formação da associação micorrízica, que são essenciais para uma grande variedade de espécies de plantas (NEWSHAM et al., 1995, p.407-411).

A colonização pelos FMAs é grandemente afetada pela nutrição de P pelo hospedeiro. Plantas crescendo em solos com baixa disponibilidade deste nutriente, e com deficiência do mineral nos tecidos, são mais rapidamente colonizadas por FMAs do que as plantas crescendo em solos com alta disponibilidade de fósforo (HABTE & MANJUNATH, 1987, p.797-801; GRAHAM & EISSENSTAT, 1994, p.179-185). O efeito benéfico da inoculação de plantas hospedeiras com FMAs conduz a um aumento na absorção do fósforo, elevando seu conteúdo na raiz e parte aérea, refletindo no aumento da biomassa vegetal (HABTE & MANJUNATH, 1987, p.797-801; DIGHTON, 1991, p.362-369).

Os FMAs tornaram-se potencialmente importantes do ponto de vista ecológico e econômico. Por beneficiar o crescimento das plantas e aumentar a capacidade das mesmas em absorver nutrientes do solo (JEFFRIES, 1987, p.319-357).

O número médio de esporos de fungos micorrízicos arbusculares autóctones presentes na área antes da sementeira foi de 391/100 g de solo. Como pode ser observado na Tabela 2, não foram detectadas diferenças significativas para este carácter, podendo possivelmente estar indicando a estabilidade das comunidades de FMAs autóctones presentes, entre os génotipos de milho. Para linhagens e híbridos as médias foram de 427 e 468 esporos por 100 g de solo, respectivamente (Tabelas 3 e 4).

Tabela 2. Valores de F, coeficiente de variação e médias para os caracteres: altura de espiga (AE), altura de plantas (AP), produção de matéria seca (MS), número de esporos (NE), colonização por fungos micorrízicos arbusculares autóctones (COL) e rendimento de grãos (REND), para génotipos de milho<sup>1</sup>.

Tratamentos	AE (m)	AP (m)	MS (kg ha <sup>-1</sup> )	NE <sup>2</sup> (100 g solo <sup>-1</sup> )	COL <sup>2</sup> (%)	REND (kg ha <sup>-1</sup> )
Linhagens (L)	1,52	2,53	1,28	1,16	3,28*	1,66
Híbridos (H)	0,81	0,66	1,05	1,24	3,49**	4,94**
L vs H	50,61**	86,66**	138,49**	3,40	26,60**	312,95**
CV (%)	12,90	9,11	16,98	3,11	7,18	20,86
Média geral	0,95	1,78	965,34	2,65	1,36	1214,82

\* e \*\* - Significativos em nível de 5 e 1 % de probabilidade, respectivamente.

<sup>2</sup> Para as análises estatísticas os valores originais foram transformados em  $\log(x + 1)$ .

Para os caracteres altura de espiga, altura de planta e matéria seca também não foram observadas diferenças significativas para os tratamentos linhagens e híbridos, somente para o contraste linhagem *versus* híbridos. Enquanto que o carácter número de esporos, não mostrou diferenças significativas em nenhum dos tratamentos.

Dentre os demais caracteres avaliados, o valor de F apresentou diferença significativa somente para percentagem de colonização micorrízica nas linhagens, enquanto que entre híbridos, tanto colonização micorrízica quanto rendimento de grãos apresentaram diferenças significativas. O contraste entre linhagens *versus* híbridos apresentaram diferença significativa para todos os caracteres (Tabela 2),

exceto para número de esporos.

Entre as linhagens as diferenças no rendimento de grãos não foram significativas, embora possam ser observadas na Tabela 3, variações no rendimento de 3259 kg ha<sup>-1</sup> (linhagem F3) a 639 kg ha<sup>-1</sup> (linhagem F1). O coeficiente de variação de 21 % talvez possa explicar a não significância para o caráter. O resultado, no entanto, é aceitável pelo fato da média geral de todos os tratamentos (1214,82 kg ha<sup>-1</sup>) ter sido baixa, possivelmente em consequência das médias de rendimento das linhagens endogâmicas (Tabela 2).

Tabela 3. Valores médios das linhagens de milho para os caracteres altura de espiga (AE), altura de plantas (AP), produção de matéria seca (MS), número de esporos (NE), colonização por fungos micorrízicos autóctones (COL) e rendimento de grãos (REND).

Linhagens	AE (m)	AP (m)	MS (kg ha <sup>-1</sup> )	NE (100 g solo <sup>-1</sup> )	COL (%)	REND (kg ha <sup>-1</sup> )
F3	0,89	1,77	1337	489	30,83 a	3259
F2	0,91	1,69	2142	343	27,6 ab	2281
F4	0,78	1,54	1832	484	21,7 abc	2009
E1	0,66	1,26	2106	441	23,92 abc	1991
E5	0,86	1,66	1790	483	20,50 abc	1961
E3	0,60	1,19	1878	434	13,33 bc	1537
D3	0,94	1,69	2280	466	15,67 abc	1494
D1	0,87	1,61	2766	436	15,66 abc	1488
D5	0,75	1,65	1619	403	22,83 abc	1182
F5	0,97	1,75	1839	480	17,08 abc	1172
D2	0,87	1,39	1976	384	23,25 abc	1107
D4	0,79	1,57	1854	397	19,08 abc	1020
F1	0,81	1,49	2607	308	12,16 c	639
Médias	0,82	1,56	2002	427	20,28	1626

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Comparando os valores médios entre linhagens para o caráter colonização micorrízica (Tabela 3), as diferenças significativas foram verificadas apenas entre as maiores porcentagens, observadas nas linhagens F3 (30,83 %) e F2 (27,66 %) e as menores nas linhagens F1 (12,16 %) e E3 (13,33 %), apesar desta última não ter diferido da linhagem F2.

No entanto, estas diferenças não se refletiram nos demais caracteres, nem mesmo no rendimento de grãos ou número de esporos. Estes resultados estão de acordo com as observações de Abbott & Robson (1982, p.389-408) que afirmam ser os benefícios das associações micorrízicas dependente da interação entre as raízes do hospedeiro e os fungos, podendo ocorrer populações de FMAs autóctones eficientes ou não. Além disso, de acordo com KAEPLER et al. (2000, p.358-364) o potencial genético é de grande importância na produção de biomassa em baixa concentração de P. O potencial genético para produzir biomassa em linhagens inatas de milho foi maior que seu potencial genético para beneficiar-se da simbiose, o que pode explicar os resultados de rendimento obtidos neste trabalho.

Para os valores médios entre híbridos, foram verificadas diferenças significativas para colonização micorrízica e rendimento de grãos (Tabela 4). Os maiores e menores valores de colonização micorrízica foram observados para os tratamentos HS 83 x E5 (43,92 %) e D1 x F2 (15,42 %), respectivamente, os quais diferem estatisticamente entre si.

O caráter rendimento de grãos apresentou as maiores médias para os híbridos HS 83 x E3 (7108 kg ha<sup>-1</sup>) e D3 x F5 (7048 kg ha<sup>-1</sup>) e a menor para HS 10 x E1 (3089 kg ha<sup>-1</sup>), as quais diferem estatisticamente entre si. Na maioria dos tratamentos onde foram verificadas as maiores porcentagens de colonização micorrízica também foram observados os maiores rendimentos de grãos. Entretanto, não é possível generalizar tal afirmação uma vez que híbridos, como D1 x F2, que apresentou baixa colonização micorrízica, não diferiram dos demais para maior rendimento de grãos, com exceção de HS 83 x E3 e D3 x F5, enquanto o híbrido de mais alta colonização micorrízica (HS 83 x E5) não diferiu do de menor rendimento de grãos (HS 10 x E1).

Os valores médios de porcentagem de colonização micorrízica apresentados neste estudo estão próximos aos relatados por SIQUEIRA et al. (1989, p.1499-1506), MAIA & TRUFEM (1990, p.89-96), GRACIOLLI (1992) e GOMES-DA-

COSTA (1993), trabalhando com milho mas diferem de CARRENHO et al. (2001, p.262-270), que obtiveram valores mais altos (de 56,7 a 87 %).

Tabela 4. Valores médios dos híbridos de milho para os caracteres altura de espigas (AE), altura de plantas (AP), produção de matéria seca (MS), número de esporos (NE), colonização por fungos micorrízicos arbusculares autóctones (COL) e rendimento de grãos (REND).

Híbridos	AE (m)	AP (m)	MS (kg ha <sup>-1</sup> )	NE (100 g solo <sup>-1</sup> )	COL (%)	REND (kg ha <sup>-1</sup> )
HS 83 x E3	1,11	1,96	3674	456	24,30 abc	7108 a
D3 x F5	1,11	2,13	3817	378	17,33 bc	7048 a
HS 10 x E3	1,17	2,08	3365	453	26,90 abc	6107 ab
HS 83 x E1	1,03	1,97	4489	578	32,60 abc	6047 ab
HS 32 x E1	0,96	1,88	3155	365	35,75 ab	5819 abc
HS 83 x E5	1,02	1,89	3594	436	43,92 a	5480 abc
HS 32 x E5	1,03	1,98	3007	569	33,90 abc	5376 abc
HS 32	1,04	1,88	3512	537	19,60 abc	5315 abc
HS 10 x E5	1,11	1,92	3029	542	21,80 abc	4928 abc
HS 32 x E3	1,11	1,95	3627	456	32,40 abc	4915 abc
HS 83	1,17	2,13	3258	573	28,40 abc	4873 abc
F3 x D4	1,12	1,93	3181	396	25,20 abc	4538 abc
HS 10	1,02	2,00	3655	435	25,30 abc	4398 abc
D2 x F4	0,99	1,97	3371	434	39,00 ab	4150 bc
F1 x D5	0,92	1,78	3562	446	24,30 abc	3468 bc
D1 x F2	0,92	1,86	3448	409	15,42 c	3393 bc
HS 10 x E1	1,01	1,89	3404	499	19,10 abc	3089 c
Médias	1,05	1,95	3479	468	27,39	5062

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em seu trabalho, PEREIRA (1995), avaliou a ocorrência de FMAs e bactérias fixadoras de nitrogênio em genótipos de milho, em condições de campo, cultivados em solo sem adição de fertilizantes químicos nitrogenados ou fosfatados.

Ele observou que, embora a associação micorrízica seja vista como inespecífica, foi possível estabelecer diferenças na capacidade dos diferentes genótipos de milho de se beneficiar das associações estudadas. Foram verificadas diferenças entre os genótipos de milho avaliados e o número de esporos, densidade relativa de espécies e colonização de raízes pelos FMAs.

A variabilidade genética das plantas responsivas aos fungos micorrízicos tem sido cultivares de várias plantas (AZCON & OCAMPO, 1981, p.677-685). Em estudos de herdabilidade da dependência micorrízica, HETRICK et al. (1993, p.512-518) observaram que todos os cultivares de trigo testados e seus ancestrais foram colonizados por FMAs apesar de variarem significativamente na resposta à simbiose.

Trabalhando com genótipos de milheto inoculados ou não com *G. caledonicum*, TEWARI et al. (1993, p.191-195) encontraram diferenças significativas entre os mesmos. O genótipo HR-374 apresentou maior altura de planta e maior produção de matéria seca, independente da porcentagem de micorrização. Para o genótipo PES-400, as raízes não micorrizadas apresentaram menos massa que as micorrizadas, assim como as taxas de colonização. Neste caso, a eficiência micorrízica foi altamente significativa e o genótipo da planta influenciou a taxa de colonização dos fungos micorrízicos arbusculares, parecendo que a demanda da planta hospedeira pôde determinar, pelo menos parcialmente, a resposta-induzida das micorrizas.

As melhores taxas de rendimento observadas para os híbridos HS 83 x E3 (7108 kg ha<sup>-1</sup>) e D3 x F5 (7048 kg ha<sup>-1</sup>), mesmo não diferindo estatisticamente da maioria dos demais híbridos, evidenciaram um alto potencial produtivo para as condições tecnológicas utilizadas. Apesar destes rendimentos terem sido obtidos sob condições experimentais, eles superaram a média dos agricultores para este nível tecnológico, que está entre 3000 e 4000 kg ha<sup>-1</sup>. No entanto, outros experimentos em diversos locais e anos agrícolas, serão necessários para confirmar esse potencial, uma vez que esta foi a primeira avaliação realizada com estes híbridos.

Na análise qualitativa de fungos micorrízicos arbusculares autóctones, antes da semeadura, foi constatada a presença de 12 espécies (Tabela 5), sendo que a espécie mais abundante foi a *Entrophospora colombiana* (29,13 %) seguida de *Glomus diaphanum* (18,45 %) e *Scutellospora pellucida* (10,68 %). Destas, *E.*

*columbiana* foi melhor multiplicada pelo híbrido D3 x F5 (45,23 %) e ocupou a segunda posição para as três linhagens e para o híbrido simples avaliado.

Tabela 5. Diversidade de fungos micorrízicos arbusculares autóctones (%) antes da semeadura, dos genótipos de maior rendimento de grãos e respectivos parentais.

Espécies de FMA	Antes	D3	F5	D3 x F5	HS 83	E3	HS 83 x E3
<i>Acaulospora longula</i> Spain & Schenck	8,74	0,00	1,18	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>A. scrobiculata</i> Trappe	4,85	4,00	3,55	10,71	0,00	7,37	2,14
<i>Entrophospora colombiana</i> Spain & Schenck	29,13	17,60	11,83	45,23	15,79	16,84	8,56
<i>Glomus clarum</i> Nicolson & Schenck	5,82	11,20	10,06	4,76	2,63	1,05	3,21
<i>Glomus diaphanum</i> Morton & Walker	18,45	3,20	1,78	1,19	0,88	1,05	1,60
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerdemann	0,97	7,20	11,24	4,76	0,00	2,11	3,74
<i>Glomus macrocarpum</i> Tul. & Tul.	0,97	11,20	4,14	0,00	1,75	0,00	5,88
<i>Glomus</i> sp.	9,71	0,80	0,00	3,57	0,00	0,00	0,00
<i>Gigaspora margarita</i> Becker & Hall	2,91	0,00	1,78	0,00	0,00	2,11	3,21
<i>Scutellospora calospora</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders	5,82	34,40	51,48	23,81	68,42	60,00	58,29
<i>Scutellospora gilmorei</i> (Trappe & Gerd.) Walker & Sanders	1,94	0,80	1,18	1,19	0,88	1,05	2,14
<i>Scutellospora pellucida</i> (Nicol. & Schenck) Walker & Sanders	10,68	9,60	1,78	4,76	9,65	8,42	11,23
Total	100	100	100	100	100	100	100
Riqueza de espécies	12	10	11	9	7	9	10

No entanto, a *Scutellospora calospora*, presente no solo antes da semeadura com apenas 5,82 %, foi a mais multiplicada por todos os materiais de milho analisados, chegando a ser o mais abundante para as linhagens D3 (34,4 %), F5 (51,48 %), E3 (60 %) e para os híbridos HS 83 x E3 (58,29 %) e HS 83 (68,42 %).

Estes resultados dão claros indícios de preferências das espécies de fungos a um determinado hospedeiro. Os diferentes genótipos mantidos sob o mesmo manejo do solo e cultura, multiplicaram espécies determinadas, mesmo que em porcentagens um pouco diferentes. A presença de associação preferencial também foi verificada por GOMES-DA-COSTA (1993), para milho e soja.

Pelas análises da diversidade entre os híbridos e seus parentais foram detectadas predominância de espécies, como seguem: para o híbrido D3 x F5, a espécie mais abundante foi *E. colombiana* seguida da *S. calospora*, enquanto que para seus parentais, as linhagens D3 e F5, estas duas espécies também foram as mais encontradas, porém em ordem inversa de abundância; para o híbrido triplo HS 83 x E3 assim como para seus parentais, a espécie mais abundante foi *S. calospora*. Também pode ser observado na Tabela 5, para todos os genótipos, com exceção do híbrido D3 x F5, que a espécie em maior abundância foi *S. calospora*.

Para o fator riqueza de espécies, 12 antes da semeadura, esta foi menor para o híbrido D3 x F5, que para seus parentais D3 e F5, com 9, 10, 11 espécies respectivamente. Fato oposto foi observado para o híbrido HS 83 x E3 e seus parentais HS 83 e E3, com 10, 7 e 9 espécies respectivamente.

O número de espécies de FMAs encontradas na rizosfera de uma determinada planta, pode diferir muito, tanto para uma mesma cultura, como entre diferentes plantas, como pode ser observado na literatura. TRUFEM & BONONI (1985, p.165-187) em cultura de milho no solo de cerrado, verificaram a ocorrência de nove espécies; SIQUEIRA et al. (1989, p.1499-1506), trabalhando com milho em Minas Gerais, observaram a presença de dez espécies; MAIA & TRUFEM (1990, p.89-96), constataram a ocorrência de dezesseis espécies de FMAs em milho no estado de Pernambuco; GOMES-DA-COSTA (1993), na rizosfera de milho em monocultivo, encontrou vinte e duas espécies de fungos micorrízicos e CARRENHO (1998), em cultivos sucessivos de milho, verificou a presença de vinte e cinco espécies. Neste trabalho o número encontrado está próximo à média esperada para a cultura de milho, semelhante aos três primeiros pesquisadores e diferindo dos últimos.



Os resultados obtidos para as avaliações qualitativas e quantitativas demonstraram que, houve uma mudança na comunidade dos fungos micorrízicos, sendo que o mesmo foi constatado também por GOMES-DA-COSTA (1993), SIEVERDING (1991, p.108) e JOHNSON et al. (1991, p.657-663).

De acordo com ABBOTT & ROBSON (1991, p.121-150), vários são os fatores que interferem no padrão de esporulação das diferentes espécies de fungos micorrízicos arbusculares, tais como, disponibilidade de nutrientes, tipo de solo, sazonalidade, tratos culturais, manejo tanto do solo como das culturas, além da planta hospedeira. Apesar do número de esporos não fornecer o valor real do potencial de inóculo (efetividade e infectividade) do solo, contribui para a avaliação populacional de FMAs.

Os valores de heterose foram muito variados para os dois caracteres, como apresentados na Tabela 6. Para rendimento de grãos, com exceção dos híbridos triplos HS 10 x E1, HS 32 x E3 e HS 32 x E5, os demais mostraram heterose sobre o pai superior e heterose sobre a média dos pais. As heteroses mais altas foram observadas para os híbridos simples, pelo fato dos parentais serem linhagens, ao contrário dos híbridos triplos, onde um dos parentais é um híbrido simples vigoroso.

Como pode ser verificado na Tabela 6, o caráter colonização micorrízica não apresentou a mesma tendência do caráter rendimento de grãos. Como podemos observar, o híbrido D3 x F5 apresentou valor alto (372) de heterose sobre o pai superior, para rendimento de grãos, enquanto que para colonização micorrízica, apresentou valor bem baixo (1,46). O mesmo aconteceu com o híbrido HS 32 x E1, o qual apresentou valor alto para colonização micorrízica (81,77) quando comparado com a heterose sobre o pai superior para rendimento de grãos (9). Essa tendência ocorreu na maioria dos híbridos avaliados. Devido ao ocorrido foi feita uma análise de correlação para as variáveis em questão, colonização micorrízica e rendimento de grãos, as quais apresentaram valores negativos (-0,012 e -0,11), respectivamente.

A baixa correlação entre a porcentagem de colonização e rendimento verificados neste estudo, também foi relatada por HETRICK et al. (1996, p.19-25) para cultivares de trigo e KAEPLER et al. (2000, p.358-364) para cultivares de milho, os quais sugeriram que a seleção realizada no melhoramento vegetal pode ter

interferido na simbiose planta-micorriza, desenvolvendo cultivares menos responsivos ao fungo.

Tabela 6. Valores de heterose sobre a média dos pais (h %) e heterose sobre o pai superior (hs %) para rendimento de grãos (REND) e colonização por fungos micorrízicos arbusculares autóctones (COL), para os híbridos de milho.

Híbridos	REND		COL	
	h	hs	h	hs
D3 x F5	429	372	5,85	1,46
F1 x D5	281	193	39,10	6,60
D2 x F4	166	106	73,37	67,80
HS 83 x E3	122	49	20,65	-13,50
F3 x D4	112	39	1,16	-18,12
HS 10 x E3	106	39	43,00	6,24
D1 x F2	80	49	-28,84	-44,30
HS 83 x E1	76	24	24,84	14,96
HS 83 x E5	60	12	64,58	54,55
HS 32 x E1	59	9	64,04	81,77
HS 10 x E5	55	12	-13,20	-13,82
HS 32 x E5	48	1	52,03	35,93
HS 32 x E3	43	-7	102,62	64,84
HS 10 x E1	-3	-30	-22,16	-24,34

O coeficiente de correlação entre os caracteres altura de inserção de espiga, altura de planta, matéria seca, rendimento de grãos e colonização micorrízica, indicou associações positivas, evidenciando que quanto maior a altura de inserção de espiga e altura de planta, maior o desenvolvimento das plantas, refletindo em uma maior quantidade de matéria seca e de rendimento de grãos (Tabela 7).

A colonização micorrízica mostrou correlação positiva e significativa com todos os caracteres, exceto número de esporos. Estes valores estão indicando que, embora alguns genótipos tenham apresentado baixa colonização micorrízica, eles foram produtivos, já que a maioria apresentou correlação entre colonização micorrízica e rendimento de grãos. Isto demonstra que, provavelmente houve uma

interação entre a planta e o fungo com hifas translocando uma maior quantidade de nutrientes e água.

Esta correlação ainda não permite afirmar que houve uma associação genética entre colonização micorrízica e rendimento de grãos. A ocorrência de condições microambientais, que tenham favorecido ou a colonização micorrízica ou o rendimento de grãos, também podem ter contribuído para a correlação.

Desta forma, para o isolamento da correlação genética da ambiental faz-se necessário um delineamento experimental ainda mais específico, utilizando um número muito maior de progênies (tratamentos) oriundas de uma população variável. Isto, no entanto, dificultaria as avaliações de colonização micorrízica ou qualquer outro caráter referente ao fungo e sua correlação com o rendimento de grãos. Outra saída mais viável seria a identificação de genótipos, preferencialmente linhagens puras, altamente contrastantes quanto à colonização micorrízica, que seriam cruzadas e observadas para os caracteres em questão, nas gerações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e retrocruzamentos.

Tabela 7. Coeficientes de correlação de Pearson entre altura de espigas (AE), altura de plantas (AP), produção de matéria seca (MS), número de esporos (ESP), colonização por fungos micorrízicos arbusculares autóctones (COL) e rendimento de grãos (REND), para genótipos de milho.

Variáveis	AP (m)	MS (g/parcela)	ESP (100 g <sup>-1</sup> solo)	COL (%)	REND (kg.ha <sup>-1</sup> )
AE	0,88**	0,70**	0,35**	0,35**	0,67**
AP	-	0,78**	0,35**	0,39**	0,76**
MS	-	-	0,21	0,42**	0,83**
ESP	-	-	-	0,19	0,27*
COL	-	-	-	-	0,47**

\*\* e \* - Significativos em nível de 1 e 5%, respectivamente, pelo teste t.

Segundo TRINDADE et al. (2001, p.1485-1494), o melhoramento pode gerar genótipos com diferentes exigências nutricionais e capacidade de absorção. Como um dos grandes benefícios da colonização micorrízica é o aumento da absorção de nutrientes, é razoável esperar que existam diferenças genotípicas relativas à simbiose micorrízica, tanto por parte do simbionte como do hospedeiro.

No entanto, com os dados obtidos, ainda é prematuro preconizar o uso da colonização micorrízica para seleção de genótipos superiores. As populações da comunidade de fungos micorrízicos arbusculares autóctones presente, e sua interferência com genótipos superiores, também precisam ser melhor compreendidos. Faz-se necessário procurar outros caracteres referentes à associação micorrízica que se correlacione geneticamente com o rendimento de grãos.

## 5. CONCLUSÕES

A taxa de colonização micorrízica mostrou correlação positiva com rendimento de grãos, produção de matéria seca, altura de inserção de espiga e altura de plantas, para os genótipos de milho;

Não houve correlação entre os valores de heterose dos caracteres rendimento de grãos e porcentagem de colonização micorrízica;

Ocorreram mudanças qualitativas e quantitativas na composição dos FMAs com observação da existência de associações preferenciais entre genótipos , assim como entre híbridos e seus parentais;

As espécies *Scutellospora calospora*, *Entrophospora colombiana* e *Scutellospora pellucida*, apresentaram uma maior abundância nos híbridos mais produtivos e seus parentais;

As espécies *Acaulospora longula*, *Glomus etunicatum*, *Glomus macrocarpum* *Glomus* sp. e *Gigaspora margarita* apresentaram uma certa especificidade de hospedeiro, pois a multiplicação de esporos não ocorreu em todos os tratamentos avaliados.

## 6. Referências

ABBOT, L.K.; ROBSON, A.D. The role of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.33, n.2, p.389-408, 1982.

ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. Factors influencing the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 35, p.121-150, 1991.

ANDRADE, J.A.C. **Formação de um composto de milho (*Zea mays* L.)**. Ilha Solteira: Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária, FEIS/UNESP, 1992, 24p. (Relatório de Pesquisa FEIS/UNESP).

AZCON, R.; OCAMPO, J.A. Factores affectins the vesicxular arbuscular infection and mycorrhizae dependency of thirteen wheat cultivars. **New Phitologist**, v. 87, p.677-685, 1981.

BETHLENFALVAY, G.J. Mycorrhizae and crop productivity. In: BETHLENFALVAY, G.J.; LINDERMAN, R.G. (Eds.) **Mycorrhizae in sustainable agriculture**. Madison: American Society Agronomy, 1992. p.1-27. (ASA Special Publication Number, 54).

BORÉM, A. **Melhoramento de plantas**. Viçosa: UFV, 1997. 547p.

CARRENHO, R. **Influência de diferentes espécies de plantas hospedeiras e fatores edáficos no desenvolvimento de fungos micorrízicos arbusculares**

**(FMA)**. Rio Claro, 1998. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biologia Vegetal) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

CARRENHO, R.; SILVA, E.S.; TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Successive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.262-270, 2001.

COLLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Micorrizas arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S.: **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa- SPI, 1994. p.383-418. (Embrapa – CNPAF. Documento, 46).

DEMATTÊ, J.L.I. **Levantamento detalhado dos solos do “Campus experimental de Ilha Solteira”**. Piracicaba: USP/ESALQ, 1980. 44p.

DIGHTON, J. Acquisition of nutrients from organic resources by mycorrhizal autotrophic plants. **Experimentia**, v.47, p.362-369, 1991.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Recomendações técnicas para o cultivo de milho**. Brasília, DF: Embrapa, 1993. 304p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema brasileiro de classificação de solo**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/ CNPS, 1999. 412p.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 360p.

FURLAN, V.; FORTIN, A. Formation of endomycorrhizae by *Endogone calospora* on *Allium cepa* under three temperatures regimes. **Naturaliste Canadien**, Quebec, v.100, p.467-477, 1973.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v.46, p.234-244, 1963.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. The physiology of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots. **Plant Soil**, The Hague, v.71, p.197-209, 1983.

GOMES-DA-COSTA, S.M. **Fungos micorrízicos arbusculares em monoculturas e rotações de milho (*Zea mays* L.) e soja (*Glycine max* (L) Merrill)**. Rio Claro, SP.UNESP, 1993, 112p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Vegetal) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

GRACIOLLI, L.A. **Efeito de biossuper na cultura de milho (*Zea mays* L.) em latossolo vermelho-escuro, no município de Selvíria, MS**. Rio Claro, SP.UNESP, 1992, 92p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

GRAHAM, J.H.; EISSENSTAT, D.M. Host genotype and the formation and function of VA mycorrhizae. **Plant and Soil**, The Hague, v.159, p.179-185, 1994.

HABTE, M.; MANJUNATH, A. Soil solution phosphorus status and mycorrhizal dependency in *Leucena leucocephala*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, p.797-801, 1987.

HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T.; COX, T.S. Mycorrhizae dependence of modern wheat varieties and ancestors. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.71, p.512-518, 1993.

HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T.; COX, T.S. Mycorrhizal response in wheat cultivars: relationship to phosphorus. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.74, p.19-25, 1996.

JAKOBSEN, I. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. In:



VARMA, A.; HOCK, B. (Eds) **Mycorrhiza**: structure, function, molecular biology and biotechnology. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.297-324.

JEFFRIES, P. Use of mycorrhizae in agriculture. **Critical Reviews in Biotechnology**, Cleveland, v.5, p.319-357, 1987.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant and Soil**, The Hague, v.73, p.288-300, 1964.

JOHNSON, N.C.; PFLEGER, F.L.; CROOKSTON, R.K.; SIMMONS, S.R.; COPELAND, P.J. Vesicular-arbuscular mycorrhizas respond to corn and soybean crooping history. **New Phytologist**, Oxford, v.117, p.657-663, 1991.

KAEPLER, S.M.; PARKE, J.L.; MUELLER, S.M.; SENIOR, L.; STUBER, C.; TRACY, W.F. Variation among maize inbred lines and detection of quantitative trait loci for growth at low phosphorus and responsiveness to arbuscular mycorrhizal fungi. **Crop Science**, Madison, v.40, p.358-364, 2000.

LOPES, E.S.; OLIVEIRA, E.; NEPTUNE, A.M.L. Efeito de espécies de micorrizas vesiculares arbusculares no siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Bragantia**, Campinas, v.39, p.241-245, 1980.

LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.7, n.1, p.1-19, 1983.

MAIA, L.C.; TRUFEM, S.F.B. Fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em solos cultivados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.13, n.2, p.89-96, 1990.

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

MIRANDA, J.C.C. **A endomicorriza na região dos cerrados: uma revisão.** Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1992. 35p. (EMBRAPA – CPAC. Documentos, 42p).

MIRANDA FILHO, J.B. **Cruzamentos dialélicos e síntese de composto de milho (*Zea mays* L.) com ênfase na produtividade e no porte da planta.** Piracicaba, 1974, 116p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

MIRANDA FILHO, J.B. Endogamia ou consangüinidade. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds) **Recursos genéticos e melhoramento – plantas.** Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.629-647.

MORTON, J.B. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. **Mycotaxon**, Ithaca, v.32, p.267-324, 1988.

MORTON, J.B.; REDCKER, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia**, New York, v.93, p.181-195, 2001.

MOSSE, B. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza research for tropical agriculture.** Hawaii: Institute for Tropical Agriculture and Human Resources, 1981. 82p. (Research Bulletin, 194).

NEHMI, I.M.D.; FERRAZ, J.V.; NEHMI FILHO, V.A.; SILVA, M.L.M. (Coords.) Milho. In: \_\_\_\_\_. **AGRIANUAL 2003: Anuário da Agricultura Brasileira.** São Paulo: Argos, 2001. p.413-434. (Agriannual, 2003).

NEWMAN, E.I.; EASON, W.R. Rates of phosphorus transfer within and between ryegrass (*Lolium perenne*) plants. **Functional Ecology**, Oxford, v.7, p.242-248, 1993.

NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam v.10, n.10, p.407-411, 1995.

PAIVA, J.R.; VALOIS, A.C.C. Espécies selvagens e sua utilização no melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds.) **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.79-99.

PATERNIANI, E.; VIÉGAS, G.P. **Melhoramento e produção de milho**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v.1, p.41-58.

PATERNIANI, E. Métodos tradicionais de melhoramento do milho. In: BULL, L.T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993. p.23-43.

PATERNIANI, E.; CAMPOS, M.S. Melhoramento do milho. In: BORÉM, A.. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. p.429-485.

PEREIRA, J.A.R. **Bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares em diferentes genótipos de milho (*Zea mays* L.)**. Lavras, 1995. 60p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of British Mycological Society**, Cambridge, v.55, p.158-161, 1970.

RAIJ, B. van.; QUAGGIO, J.A. **Métodos de análises de solos para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1983. 31p (Boletim técnico, 81).

SCANNERINI, S.; BONFANTE-FASOLO, P. Comparative ultra estrutural analysis of mycorrhizal associations. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.61, p.917-943, 1983.

SCHENCK, N.C.; PEREZ, Y. **Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi**. Gainesville: IVAM, 1988. 245p.

SCHUESSLER A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v.105, n.12, p.1413-1421, 2001.

SIEVERDING, E. Ecology of VAM fungi in tropical agrosystems. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.29, n.1, p.369-390, 1990.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Eschborn: Germany Technical comparison (GTZ) – Federal Republic of Germany, 1991, 371p.

SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Coords.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-319.

SIMON, L. Phylogeny of the Glomales: deciphering the past to understand the present. **New Phytologist**, Oxford, v.133, p.95-101, 1996.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A. Micorrizas vesículo-arbusculares em mudas de cafeeiro. II. Efeito do fósforo no estabelecimento e funcionamento da simbiose. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.10, n.3, p.207-211, 1986.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnology do solo: fundamentos e perspectivas**. Lavras: FAEPE, 1988. p.125-166.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesículo-arbusculares em agro e ecossistemas de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.24, p.1499-1506, 1989.

SIQUEIRA, J.O. **Biologia do solo**. . Lavras: FAEPE, 1993. p.153-183.

SOUZA Jr., C.L. Melhoramento de espécies alógamas. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Eds.) **Recursos genéticos e melhoramento – plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.159-199.

TEWARI, L.; JOHRI, B.N.; TANDON, S.M. Host genotype dependency and growth enhancing ability of VA-mycorrhizal fungi for *Eleusine coracana* (finger millet). **World Journal of Microbioly and Biotechnology**, London, v.9, p.191-195, 1993.

THOMSON, B.D.; CLARKSON, D.T; BRAIN, P. Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, Oxford, v.116, p.647-653, 1990.

TOTH, R.; TOTH, D.; STARKE, D.; SMITH, D.R. Vesicular-arbuscular colonization in *Zea mays* affected by breeding for resistance to fungal pathogens. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.68, p.1039-1044, 1990.

TRINDADE, A.V.; SIQUEIRA, J.O.; ALMEIDA, F.P. Dependência micorrízica de variedades comerciais do mamoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.36, n.12, p.1485-1494, 2001.

TRUFEM, S.F.B.; BONONI, V.L.R. Micorrizas vesículo-arbusculares de culturas introduzidas em áreas de cerrado. **Rickia**, São Paulo, v.12, p.165-187, 1985.

VENCOVSKY, R.; BARRIGA, P. **Genética biométrica no fitomelhoramento**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 487p.

WALKER, C. The mycorrhizast and the herbarium: The preservation of specimens from VA mycorrhizal studies. REID.C.P.P. (Ed.). In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZA, 4<sup>o</sup> , 1979, Fort Collins, Colorado. Abstract..., 1979, p.98.

ZANGARO FILHO, W. **Micorrizas arbusculares em espécies arbóreas nativas da bacia do Rio Tibagi (PR) e suas relações com os grupos sucessionais.** São Paulo 1997. 157p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.