

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ENGENHARIA
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

LUCAS LOPES E SILVA

**ATIVIDADE DE FOSFATASE ÁCIDA E COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA EM
GENÓTIPOS DE MILHO**

Ilha Solteira
2020

LUCAS LOPES E SILVA

**ATIVIDADE DE FOSFATASE ÁCIDA E COLONIZAÇÃO MICORRÍZICA EM
GENÓTIPOS DE MILHO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Profa Dra Lucíola Santos Lannes
Orientadora

Prof. Dr. João Antonio da Costa Andrade
Coorientador

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

S586a Silva, Lucas Lopes e.
Atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica em genótipos de milho / Lucas Lopes e Silva. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2020
45 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2020

Orientador: Lucíola Santos Lannes

Coorientador: João Antonio da Costa Andrade

Inclui bibliografia

1. Fósforo. 2. Produção sustentável. 3. Colonização micorrízica. 4. Enchimento do grão. 5. *Zea mays* L.


Raiane da Silva Santos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica em diferentes genótipos de milho

AUTOR: LUCAS LOPES E SILVA

ORIENTADORA: LUCÍOLA SANTOS LANNES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA, área:
Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LUCÍOLA SANTOS LANNES

Departamento de Biologia e Zootecnia / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO

Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Profa. Dra. LILIAM SILVIA CANDIDO

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais / Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD

Ilha Solteira, 26 de agosto de 2020

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gilmar Afonso da Silva e Fatima Vieira Lopes e Silva.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, a Thyenne Menezes Rocha e aos meus irmãos, Tiago e Caio, que sempre me apoiaram e incentivaram para que eu enfrentasse os desafios e realizasse meus sonhos.

À Lucíola Lannes e ao João Andrade por todo ensinamento compartilhado e colaboração, foi um prazer e uma honra trabalhar com vocês.

À banca examinadora, composta pelos professores Marcelo Carvalho Minhoto Teixeira Filho e Liliam Silvia Candido, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

A todos os membros do Laboratório de Ecologia Vegetal e do Grupo de Pesquisa de Melhoramento de Plantas - JACA da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – FEIS, pelo auxílio sempre que necessário.

Aos funcionários da Fazenda de Pesquisa, Ensino e Extensão – FEPE – Cerrado, por toda a ajuda.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A sabedoria começa na reflexão”
Sócrates

RESUMO

A produção sustentável na agricultura vem se destacando cada vez mais no cenário mundial devido à necessidade de mitigação dos impactos ambientais resultantes da atividade agrícola. As estratégias alternativas das plantas para aquisição de nutrientes, como atividade de fosfatase ácida e a colonização micorrízica, podem contribuir para a redução do uso de fertilizantes fosfatados na produção do milho (*Zea mays* L). A enzima fosfatase ácida, secretada pelas raízes das plantas, é responsável pela retirada de grupamentos fosfato de fontes orgânicas no solo, aumentando a absorção a partir de recursos de fósforo não imediatamente disponíveis. Os fungos micorrízicos arbusculares contribuem para a aquisição de nutrientes do solo, principalmente do fósforo. Com o objetivo de verificar a importância da atividade de fosfatase ácida e da colonização micorrízica para a cultura do milho sob condições naturais e de fertilização por fósforo, foram realizados três experimentos, sendo o primeiro em casa de vegetação, com 17 linhagens puras experimentais, com dois tratamentos com e sem fósforo; o segundo em campo, com 3 linhagens puras experimentais, com dois tratamentos sem adubação e com adubação NPK, o terceiro em campo, com 13 híbridos simples comerciais, com um tratamento com NPK e outro com NK. Ao determinar a colonização micorrízica nas linhagens puras de milho, observou-se efeito positivo sobre diversos parâmetros de crescimento, mostrando ser importante para o desenvolvimento da planta. Ao determinar a atividade de fosfatase ácida em linhagens puras e em híbridos simples comerciais de milho, observou-se que a atividade desta enzima é modulada pela disponibilidade de fósforo e nitrogênio no solo, assim como a existência de variabilidade fenotípica para atividade de fosfatase nas linhagens. A atividade de fosfatase ácida apresentou efeito positivo sobre o enchimento do grão em solos com menor disponibilidade de fósforo. Estes resultados apontam para a possibilidade de sucesso na seleção de genótipos mais adaptados à baixa disponibilidade de fósforo inorgânico no solo e ao mesmo tempo, genótipos que possuam maior atividade de fosfatase ácida sob condições de fertilização fosfatada como forma de reduzir a quantidade de fertilizante fosfatado necessário à cultura do milho.

Palavras-chave: Fósforo. Produção sustentável. Colonização micorrízica. Enchimento do grão. *Zea mays* L.

ABSTRACT

There is an urgent need to mitigate the environmental impacts resulting from agricultural activity, especially in highly biodiverse and threatened areas on the globe, as the Brazilian Cerrado. Alternative plant strategies for nutrient acquisition, such as acid phosphatase activity and mycorrhizal colonization, can contribute to reduce the use of phosphate fertilizers needed for maize production (*Zea mays* L). The acid phosphatase enzyme, secreted by plant roots, is responsible for the removal phosphate groups from organic sources in the soil, increasing absorption from phosphorus sources not immediately available. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to the acquisition and mobility of soil nutrients, mainly from phosphorus. Aiming at verifying the importance of root phosphatase activity and mycorrhizal colonization for the maize production under natural and phosphorus-fertilized conditions, three experiments were performed: the first in a glasshouse, with 17 pure lineages, with two treatments with and without phosphorus; the second in the field, with 3 pure lineages, with two treatments without fertilization and with NPK fertilization; and the third in the field, with 13 simple commercial hybrids, with one treatment with NPK and the other with NK. A positive effect of mycorrhizal colonization rates upon growth parameters was detected in pure maize lineages, revealing to be of relevance for maize development in the Cerrado. The activity of acid phosphatase is dependent of the genotype identity, modulated by the availability of phosphorus and nitrogen in the soil and contributes significantly to grain filling in soils with low phosphorus availability. These results demonstrate that it is possible to select genotypes more adapted to low soil phosphorus availability aiming at organic production, or to use genotypes that have high phosphatase activity under phosphorus fertilization as a way to reduce the amount of added phosphorus needed for maize production in the Cerrado.

Keywords: Phosphorus. Sustainable production. Mycorrhizal colonization. Grain filling. *Zea mays* L.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Modelo de equação estrutural26
- Figura 2** – Efeito da atividade de fosfatase ácida sobre a massa de 100 grãos27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das linhagens de milho (<i>Zea mays</i>).....	18
Tabela 2 - Identificação dos 13 híbridos comerciais de milho (<i>Zea mays</i>)	19
Tabela 3 - Solo do experimento em casa de vegetação	22
Tabela 4 - Linhagens puras de milho (<i>Zea mays</i>), sem fósforo (Controle) e com fósforo (Fósforo).....	23
Tabela 5 – Atividade de fosfatase ácida radicular linhagens puras de milho (<i>Zea mays</i>) em experimentos em casa de vegetação e em campo	24
Tabela 6 - Colonização micorrízica das linhagens de milho (<i>Zea mays</i>) do experimento em casa de vegetação.....	25
Tabela 7 - Resultados do experimento com 13 híbridos simples comerciais de milho (<i>Zea mays</i>).....	28
Tabela 8 - Características de solo das três áreas experimentais	29
Tabela 9 - Efeito da atividade de fosfatase ácida das linhagens entre o 1° experimento e 2° experimento.....	44
Tabela 10 - Efeito da atividade de fosfatase ácida sobre as variáveis de produtividade e crescimento.....	45

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2	OBJETIVOS.....	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4	RESULTADOS.....	22
4.1	Linhagens puras em casa de vegetação.....	22
4.2	Linhagens puras em campo.....	26
4.3	Híbridos comerciais simples em campo.....	27
4.4	Características do solo entre os experimentos.....	29
5	DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÕES.....	36
	REFERÊNCIAS.....	37
	APÊNDICE A – Efeito da atividade de fosfatase ácida.....	44

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

As Nações Unidas têm como um dos objetivos de desenvolvimento sustentável até 2030 mitigar os impactos ambientais da agricultura e aumentar a produtividade agrícola em regiões com baixa tecnologia e menor disponibilidade de nutrientes (UNITED NATIONS, 2015), visando conciliar metas de desenvolvimento sustentável com as metas de desenvolvimento socioeconômico. A produção sustentável na agricultura vem se destacando cada vez mais no cenário mundial devido à urgência de mitigar a degradação ambiental causada por práticas agrícolas ambientalmente incorretas, sendo necessário o aumento da produtividade de sistemas orgânicos e a redução do uso de fertilizantes substituindo-os por fontes orgânicas como forma de reciclagem (KIRCHMANN; THORVALDSSON, 2000).

O fósforo (P) é um elemento essencial ao crescimento vegetal, pois compõe o trifosfato de adenosina (ATP), participando na divisão celular, reprodução e no metabolismo vegetal como fotossíntese e respiração (MALAVOLTA, 1985). Este nutriente limita amplamente o crescimento vegetal em sistemas agrícolas (GUIGNARD *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2018), especialmente em áreas tropicais (HOU *et al.*, 2020). Entretanto, a utilização de fertilizantes fosfatados em excesso pode causar danos ao ambiente como a eutrofização do solo e fontes de água, colaborando para a extinção de espécies (WASSEN *et al.*, 2005; LANNES *et al.*, 2016). Além disso, são caros, apresentam reservas finitas e são potencialmente pouco eficazes devido à imobilização do fósforo (P) pelo solo.

A utilização de fertilizantes fosfatados torna-se cada vez mais preocupante devido à falta de informações concretas sobre a quantidade das reservas fosfatadas e das previsões de fim das reservas mais limpas até o fim do século, podendo acarretar em alta exponencial dos preços, devido ao maior custo para mineralização de fontes menos limpas e dos países considerarem as reservas como instrumento de segurança alimentícia (GILBERT, 2009; VAN KAUWENBERGH, 2010; CORDELL *et al.*, 2011; MEW, 2016). A estimativa realizada pela FAO (2015) é que o Brasil seja responsável por 19% do aumento do consumo do fertilizante fosfatado no mundo, sendo atualmente o segundo maior importador, representando cerca de 60% do total utilizado, e o quarto país que mais utiliza o fertilizante fosfatado (FILHO, 2014). Estes fatos evidenciam a importância de melhorar a eficiência das cultivares agrícolas para aquisição e utilização do P, com intuito de reduzir os impactos

ambientais e diminuir o consumo das reservas globais de P (VENEKLAAS *et al.*, 2012).

O Cerrado brasileiro ocupa uma área de 2 milhões de km² e é considerado um *hotspot* de biodiversidade (MYERS *et al.* 2000) por conter as savanas com a mais rica flora do mundo com alto grau de endemismo (KLINK; MACHADO, 2005; FILARDI *et al.*, 2018) e por estar permanentemente ameaçado pela expansão das atividades agrícolas sem bases sustentáveis (LIMA *et al.*, 2019). Enquanto plantas nativas diferem-se consideravelmente quanto às estratégias de aquisição de fósforo em solos pobres, há também ampla variação genotípica para aquisição de fósforo em espécies e genótipos de plantas cultivadas (CONG *et al.*, 2020).

A principal forma de P utilizada pelas plantas em solos na região do Cerrado brasileiro é o dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$) devido ao baixo pH no solo (HAVLIN *et al.*, 2014), cuja fixação ocorre principalmente pela presença de ferro, alumínio, cálcio e minerais de argila, devido estes terem grande afinidade pelo P, realizando ligações com facilidade e inviabilizando a utilização sem que haja quebra destas ligações (SMITH, 2001; VANCE; OHD-STONE; ALLAN, 2003). O Cerrado, rico reservatório de recursos genéticos, apresenta plantas com diversas estratégias adaptativas para lidarem com a baixa disponibilidade de fósforo no solo (LAMBERS *et al.*, 2020). Em solos deficientes em P, as plantas possuem estratégias alternativas para mitigar este problema como modificações estruturais radiculares, associação micorrízica, formação de raízes proteóides e secreção da enzima fosfatase ácida (LAMBERS *et al.*, 2006; BALEMI; NEGISHO, 2012). Esta enzima é secretada por plantas e microorganismos e sua atividade é responsável pela mobilização mais ativa ou apropriada de fontes orgânicas de P, catalisando a hidrólise de P a partir de fosfatomonoésteres ou fosfatodiésteres, podendo hidrolisar uma ampla gama de monoésteres de fósforo, com ótima atividade sob condições ácidas, aumentando a absorção da planta a partir de recursos de P não imediatamente disponíveis para absorção (TARAFDAR; CLAASSEN, 2001; PLAXTON, 2004; RICHARDSON *et al.*, 2011, GONZALEZ-MUNOZ *et al.*, 2015).

A disponibilidade de P (orgânico e inorgânico) e nitrogênio (N) no solo são os fatores que mais influenciam a atividade de fosfatase ácida, onde os altos teores de P inorgânico inibem a atividade da enzima e altos teores de P orgânico (substrato) e N inorgânico estimulam sua atividade (OLDE VENTERINK; GÜSEWELL, 2010; MARGALEF *et al.*, 2017). O pH do solo também influencia a atividade da fosfatase

ácida, atuando na taxa de síntese, liberação e estabilidade, ocorrendo diminuição de sua atividade conforme o pH aumenta. Outros fatores que influenciam negativamente a atividade da fosfatase ácida são os incêndios, assim como a diminuição da umidade do solo e a presença de chumbo e outros metais pesados (ADETUNJI *et al.*, 2017). Considerando que solos do Cerrado são deficientes em P inorgânico, mas ricos em P orgânico (GOEDERT, 1983; RESENDE *et al.*, 2011; CHAPUIS-LARDY *et al.*, 2001), entender os níveis de atividade de fosfatase ácida secretada pelas raízes de plantas de interesse agrícola pode ser uma excelente forma de otimizar o manejo orgânico do solo, resultando em melhor conservação e maior sustentabilidade agrícola, pois grande parte do P inorgânico assimilado pelas plantas é produzida a partir da mineralização do P orgânico pela atividade da fosfatase (ADETUNJI *et al.*, 2017).

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) frequentemente colonizam o sistema radicular da maioria das plantas, contribuindo para a aquisição e mobilidade de nutrientes do solo, principalmente do P, por favorecer o crescimento dos pelos radiculares e possuir extensa malha de hifas permitindo à planta explorar maior volume do solo (SMITH; READ, 2008). Rillig *et al.* (2016) citam o potencial existente das micorrizas arbusculares em contribuir para a produção agrícola mais sustentável e pontuam a necessidade de desenvolver tecnologia apropriada para tal objetivo, ressaltando a carência de estudos científicos apropriados sobre o assunto.

O milho é mundialmente cultivado principalmente para o consumo humano e nutrição animal, contém cerca de 72% de amido, 10% de proteína e 4% de gordura, fornecendo uma densidade energética de 365 Kcal/100 g. A cultura do milho no Brasil possui alto potencial produtivo, alcançando 10 t ha⁻¹ de grãos quando em condições experimentais ou quando cultivados adequadamente (CARVALHO *et al.*, 2004). No entanto, o que se observa na prática são produtividades mais baixas, cerca de 3.5 t ha⁻¹ de grãos (BRASIL, 2003). Devido à alta capacidade de adsorção do fósforo em solos brasileiros, a baixa eficiência de aproveitamento deste nutriente pela cultura (em torno de 25%) faz com que as doses normalmente recomendadas sejam altas (FANCELLI, 2004). Além disso, outro fator que deve ser levado em conta é a demanda de fósforo pela cultura do milho (DHILLON *et al.*, 2017), que por ter desenvolvimento intenso e ciclo curto, requer maior nível de fósforo em solução e reposição mais rápida do P-adsorvido que as plantas de culturas perenes. Os sintomas de deficiência de P no milho segundo Malavolta *et al.* (1997) incluem a

presença de folhas mais velhas com cor verde-escura seguida de tons roxos nas pontas e margens, atingindo em alguns casos o colmo com os mesmos sintomas.

O milho apresenta alta variabilidade genética podendo ser cultivado em diferentes condições ambientais com adaptações específicas, sendo que o melhoramento genético contribui para o aumento da produtividade a partir do desenvolvimento de novas variedades e de híbridos com ampla adaptação ao ambiente (TEIXEIRA; AVELAR, 2008). O melhoramento para absorção de P em milho depende da identificação de um traço que potencialmente influencia sua aquisição e o seu uso e da identificação ou geração de variação genética dentro de uma fonte de germoplasma (VANCE; OHD-STONE; ALLAN, 2003). A secreção de fosfatase ácida no milho é um caráter quantitativo, como demonstrado por Gonzalez-Munoz *et al.* (2015). Chen *et al.* (2008) estimaram a herdabilidade no sentido amplo em 52.7% para fosfatase e de 90.9% para eficiência de absorção de P, estando esse caráter relacionado com os mesmos genes da fosfatase, confirmando que a genética é um fator muito importante para a atividade de fosfatase no milho.

Alguns estudos apontam que dentre uma ampla variedade de fosfatases ácidas codificadas pelas plantas, o grupo de fosfatase ácida roxa (PAP) desempenha papel mais significativo no forrageamento e reciclagem de P (TRAN *et al.*, 2010). No milho, Gonzalez-Munoz *et al.* (2015) identificaram 33 genes relacionados à PAP comprovando que a expressão desse caráter é quantitativa e confirmando que existe variação funcionalmente importante dentro do germoplasma do milho e relatam ainda que o acúmulo de transcritos do gene ZmPAP26, o principal gene até o momento, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com menor e maior disponibilidade de P, ao contrário de outros 19 genes PAPs que apresentaram maior atividade de fosfatase ácida em menor disponibilidade de P no solo, ressaltando que os genes PAPs no milho possivelmente possuam diversas funções na regulação pós-transcricional e provavelmente a divergência funcional seja ainda maior do que se conhece.

Micorrizas arbusculares naturalmente colonizam as raízes das plantas, contribuindo para a absorção de nutrientes, geralmente quando a disponibilidade de P no solo é baixa (SMITH; SMITH, 2011). Estes fungos são importantes para o milho porque esta cultura apresenta alta taxa de crescimento e uma alta demanda por nutrientes, sendo essa interação positiva para o crescimento, produção de grãos e captação de P (COZZOLINO; DI MEO; PICCOLO, 2013). Entretanto, este

incremento devido à simbiose se diferencia entre os genótipos de milho na produção de massa seca da parte aérea e do sistema radicular (CAMPOS *et al.*, 2010). O crescimento do milho em resposta à simbiose com micorrizas é geralmente positiva, entretanto é dependente do balanço entre N e P no solo e mais importante para a absorção de P do que de N (LÓPEZ-CARMONA *et al.*, 2019).

Devido aos poucos relatos sobre a atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica em linhagens puras e híbridos comerciais, existe grande potencial para explorar essas características, possibilitando o aprimoramento do cultivo de milho mais sustentável. Sendo assim, uma melhor compreensão sobre esses fatores pode contribuir para a redução do uso de fertilizantes fosfatados e auxiliar o melhoramento genético referente à busca por genótipos mais adaptados à produção agrícola mais sustentável do que a realizada no momento.

As hipóteses principais deste trabalho são: (1) A atividade da enzima fosfatase ácida radicular e a taxa colonização micorrízica são diferentes em genótipos de milho desenvolvidos e cultivados no Cerrado, (2) A atividade da enzima fosfatase ácida radicular e a taxa de colonização micorrízica são moduladas pela adição de fósforo inorgânico, sendo mais elevados em meio natural, sem adição de adubo fosfatado, e (3) Variáveis relativas a crescimento e produtividade do milho são influenciadas pela atividade de fosfatase ácida e pelas taxas de colonização micorrízica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar o desempenho de genótipos de milho (linhagens puras experimentais e híbridos simples comerciais) em relação à atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica em meios com maior e menor disponibilidade de fósforo inorgânico no solo.

2.2 Objetivos Específicos

1. Investigar se há diferenças entre genótipos em relação à atividade de fosfatase ácida radicular.
2. Examinar se há plasticidade fenotípica para atividade de fosfatase ácida radicular em relação à adição de fertilizantes.
3. Estudar se a colonização micorrízica é influenciada pelo efeito da adição de fósforo inorgânico.
4. Observar se a atividade de fosfatase ácida e a colonização micorrízica possuem efeito sobre variáveis de desenvolvimento e produtividade sob as diferentes condições de disponibilidade de nitrogênio e fósforo.
5. Verificar se a atividade de fosfatase ácida é um importante fator de seleção para obtenção de genótipos mais adaptados a sistemas de produção mais sustentáveis

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos, um em casa de vegetação e dois em campo. A casa de vegetação localiza-se no Câmpus II da UNESP - Câmpus de Ilha Solteira (20°25'04.77"S 51°20'30.65"O, altitude 375 m) e a área de campo situa-se na área experimental da Fazenda de Pesquisa, Ensino e Extensão da mesma universidade (FEPE-Cerrado) (20°20'50.65"S 51°24'06.32"O, altitude 344 m), a aproximadamente 11 km da casa de vegetação. O solo utilizado no experimento em casa de vegetação é oriundo da FEPE-Cerrado, o qual é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico argiloso a moderado, hipodistrófico, álico, caulínítico, férrico, compactado, muito profundo e moderadamente ácido (SANTOS *et al.*, 2018). O tipo climático na região é Aw, segundo Köppen, caracterizado como tropical úmido com estação chuvosa no verão e seca no inverno.

O primeiro experimento, realizado em casa de vegetação, foi conduzido em blocos casualizados com esquema fatorial 17 genótipos x 2 doses de P (com e sem) com três repetições (Tabela 1). As 17 linhagens puras de milho foram selecionadas para o estudo por serem genótipos experimentais desenvolvidos em pesquisas de melhoramento genético pela UNESP – Câmpus de Ilha Solteira, não tendo tido até o momento as características referentes à atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica determinadas. O experimento foi realizado no período de agosto a outubro de 2018, em vasos de 3.5 litros. O solo foi peneirado em malha de 2 mm, adicionando-se três sementes em cada vaso, as quais foram lavadas previamente com hipoclorito de sódio a 1% e tratadas com fungicida e bactericida.

O desbaste ocorreu 15 dias após a semeadura, momento em que também foi realizada a adubação com 0.92 mg de fosfato de sódio (Na₂HPO₄) nas parcelas com fósforo, equivalente a 200 mg de P para cada kg de solo, como sugerido por Novais *et al.* (1985). A irrigação foi realizada com sistema de gotejamento nos pratos de cada vaso. Os atributos químicos do solo utilizado em CV determinados antes da instalação do experimento, segundo metodologia proposta por Raij *et al.* (2001) apresentaram os seguintes resultados: 11 mg/dm³ de P (resina); 19 g/dm³ de matéria orgânica; 5.0 de pH (CaCl₂); K, Ca, Mg, H⁺Al = 1.4; 11.0; 9.0 e 22.0 mmol/dm³, respectivamente; Cu, Fe, Mn, Zn = 1.6; 16.0; 20.0 e 0.7 mg/dm³, respectivamente; 0.17 mg/dm³ de B, CTC= 43.4 0 mmol/dm³, 49% de saturação por bases e com

valores de granulometria de 420,50 e 530 g kg⁻¹ de areia, silte e argila, respectivamente.

No estágio V9 (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003) foram avaliadas as seguintes variáveis: atividade de fosfatase ácida radicular, colonização micorrízica, altura da planta, número de folhas, diâmetro de colmo, teor de água, massa seca aérea, massa seca radicular e massa seca total. As três últimas foram determinadas pela pesagem em balança de precisão após secagem do material em estufa de circulação a 60 °C durante três dias. As medições foram realizadas no estágio V9 por este representar o final da fase vegetativa e o início do período de maior necessidade de absorção do P no milho, tendo então sido considerado o momento oportuno para as medições, devido à falta de relatos na literatura do momento ideal para a análise da atividade de fosfatase ácida radicular do milho.

Tabela 1 - Identificação das linhagens de milho (*Zea mays*) com abreviações utilizadas.

Abreviação	Nome da Linhagem	Tipo da Altura	Abreviação	Nome da Linhagem	Tipo da Altura
L1	9D	Normal	L10	ND1-4-2-1-1-4-1-1	Normal
L2	8F	Braquítica	L11	IVF1-242-1-1-3-2-2-1	Braquítica
L3	IVF1-5	Braquítica	L12	CON-23-1-1-1-1-1-2-1*	Normal
L4	IVD1-3*	Braquítica	L13	IVD1-6	Braquítica
L5	6F	Normal	L14	IVF1-249-2-1-1-3-1-5-2	Braquítica
L6	IVD1-5	Braquítica	L15	IVD1-8	Braquítica
L7	10F	Normal	L16	IVF1-52-1-1-4-3-1-1-1	Braquítica
L8	IVF1-230-1-3-1-2-1-2-1*	Braquítica	L17	IVF1-193-1-2-1-1-1-1	Braquítica
L9	CON-15-2-1-1-1-1-1-1	Normal			
Pop	População experimental geneticamente equilibrada e variável **				

* - genótipos utilizados no 1° e 2° exp.

** - genótipos utilizados somente no exp. 2°

Fonte: Elaboração do autor.

O segundo experimento foi realizado em campo com 4 genótipos x 2 tratamentos (controle e convencional com NPK) com três repetições, em linhas de 3 metros e espaçamento de 90 centímetros, no período de novembro a janeiro de 2019 (Tabela 1). Constituiu-se de dois lotes com três linhagens (L4, L8 e L12), selecionadas por diferirem entre os tratamentos e com maior atividade no tratamento controle no primeiro experimento, e a população Flintisa (Pop), selecionada para baixa tecnologia, geneticamente variável e em equilíbrio, sendo um tratamento com adubação (250 kg ha⁻¹ da fórmula 8-28-16), com 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ total, e outro

sem adubação. Nesses lotes foram realizados o plantio direto, controle de pragas e utilizado sistema de irrigação por aspersão através de um sistema fixo de irrigação do tipo pivô central, sendo avaliadas as variáveis como altura de plantas, teor de água e atividade de fosfatase ácida radicular, no estágio V10 (RITCHIE; HANWAY; BENSON, 2003).

O terceiro experimento foi conduzido em campo, no período de abril a setembro de 2019, com 13 híbridos comerciais (Tabela 2), em blocos ao acaso com três repetições, sendo um ensaio com P e outro sem. A parcela experimental constituiu-se de 6 linhas de 5 m, espaçadas de 0.45 metros entre linhas, densidade equivalente a 60 mil plantas por hectare, sendo utilizado para análise somente as quatro linhas centrais, foi realizado o plantio direto, controle de pragas e utilizado sistema de irrigação por aspersão através de um sistema fixo de irrigação do tipo pivô central. O tratamento controle foi adubado com NK (250 kg ha⁻¹ da fórmula 8 – 0 – 16) e o tratamento com NPK (250 kg ha⁻¹ da fórmula 8-28-16). No estágio V10 (RITCHIE; HANWAY; BENSON; 2003) foram avaliadas as variáveis atividade de fosfatase ácida radicular, número de folhas e teor de água. No início do estágio reprodutivo foram avaliadas as variáveis altura da planta e altura da espiga principal. Após a colheita foram avaliados o teor de umidade dos grãos e massa de 100 grãos.

Tabela 2 - Identificação dos 13 híbridos comerciais de milho (*Zea mays*) com abreviações utilizadas.

Abreviação	Híbrido Comercial	Tipo	Ciclo	Transgenia
H1	XB 6012 Bt	Simples	Precoce	Transgênico
H2	60XB14	Simples	Precoce	Convencional
H3	XB 9003	Simples	Superprecoce	Convencional
H4	XB 8010	Duplo	Superprecoce	Convencional
H5	XB 8018	Duplo	Precoce	Convencional
H6	XB 8030	Duplo	Precoce	Convencional
H7	90XB06 Bt	Simples	Superprecoce	Transgênico
H8	DKB 390 PRO3	Simples	Precoce	Convencional
H9	DKB 335 PRO3	Simples	Precoce	Convencional
H10	DKB 350 YVTPRO	Simples	Precoce	Convencional
H11	DOW 2B710 PW	Simples	Superprecoce	Convencional
H12	AG 7098	Simples	Semiprecoce	Convencional
H13	DKB 363 PRO3	Simples	Precoce	Convencional

Fonte: Elaboração do autor.

A atividade de fosfatase ácida radicular, para todos os experimentos, foi determinada seguindo o protocolo do nitrofenil-fosfato (adaptado de OLDE VENTERINK, 2011), em 0.100 g de raízes frescas. Estas foram acondicionadas em tubos de reação, sendo adicionados 5 mL da solução do substrato nitrofenil-fosfato e agitados em agitador de Kline por uma hora. Posteriormente foi retirada uma subamostra de 0.5 mL de cada tubo e colocado em tubos com NaOH 2N para interromper a reação, quando então se mediram as absorvâncias em espectrofotômetro a 410 nm previamente calibrado com curva-padrão de nitrofenol.

A partir de trechos de raízes finas coletadas nos indivíduos, foram preparadas lâminas para determinação de colonização micorrízica. As raízes foram cortadas e descoloridas em tubos de ensaio com solução de hidróxido de potássio 1 M por uma hora em banho-maria a 90 °C, tendo a solução de hidróxido de potássio 1 M sido renovada e os tubos novamente colocados em banho-maria a 90 °C por mais três horas. As amostras descoloridas foram lavadas em água da torneira, lavadas em ácido clorídrico 5% durante 5 minutos e coradas por 20 minutos em uma solução de 5% de tinta de caneta (Parker Qink Black, Newell Rubbermaid, Saint Herblain, França) em uma solução de acético a 5% também a 90 °C, seguindo o protocolo de Vierheilig *et al.* (1998). As raízes coloridas foram então dispostas em lâminas graduadas. Para quantificar a colonização micorrízica, as raízes foram analisadas para a verificação da presença de arbúsculos, vesículas ou hifas.

Ao final de cada experimento, amostras de solo foram coletadas para determinação de nutrientes. No primeiro experimento, coletou-se uma amostra aleatória dos vasos. No segundo e terceiro experimentos, foram coletadas três amostras dos primeiros 20 cm do solo e misturadas para a obtenção de uma amostra composta. As amostras de solo foram secas ao ar, peneiradas e tiveram seus atributos químicos determinados de acordo com os métodos de Raij *et al.* (2001) no Laboratório de Solos da UNESP Ilha Solteira (LANNES *et al.* 2020b).

O efeito da adição de fósforo sobre as variáveis foi analisado pelo teste t de Student e as diferenças entre os genótipos para as diversas variáveis estudadas foram analisadas por ANOVA seguida de teste de Tukey usando o software IBM SPSS Statistics 20. Aos dados do primeiro experimento foi aplicada modelagem de equações estruturais visando verificar efeitos integrados da fertilização e dos genótipos sobre a atividade de fosfatase ácida e colonização micorrízica e destas sobre as variáveis de crescimento do experimento em casa de vegetação utilizando

o programa Stata 15. Quando necessário os dados foram transformados para logaritmo base 10 para atender às premissas da estatística paramétrica (normalidade e homoscedasticidade).

4 RESULTADOS

4.1 Linhagens puras em casa de vegetação

O tratamento de fertilização fosfatada aplicado nos vasos foi efetivo, tendo resultado em aumento significativo da concentração de fósforo disponível nos vasos fertilizados. A concentração de ferro (Fe) também apresentou incremento mediante fertilização fosfatada e os demais nutrientes e características do solo não apresentaram diferenças entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias, desvios-padrão (entre parênteses) e resultados do teste t de Student (valores de F e P) para características do solo do experimento em casa de vegetação em vasos sem aplicação de fósforo (Controle) e com 200 mg de P por Kg de solo (Fósforo), N=3.

Atributos	Controle	Fósforo	t	P
N (g/kg)	0.947 (0.07)	0.913 (0.07)	0.32	0.600
P - resina (mg/dm ³)	11.7 (0.58)	71.3 (32.51)	10.10	0.034
MO (g/dm ³)	19.67 (1.15)	19.00 (1.00)	0.57	0.490
pH (CaCl ₂)	4.97 (0.06)	5.10 (0.10)	4.00	0.120
K (mmol _c /dm ³)	0.83 (0.06)	0.77 (0.06)	2.00	0.230
Ca (mmol _c /dm ³)	12.67 (0.06)	12.00 (1.00)	1.00	0.370
Mg (mmol _c /dm ³)	10.33 (0.06)	9.67 (0.58)	2.00	0.230
Al (mmol _c /dm ³)	2.00 (0.00)	1.33 (1.15)	1.00	0.370
SB (mmol _c /dm ³)	23.83 (1.05)	22.40 (1.58)	1.72	0.260
m (%)	7.67 (0.06)	5.67 (4.93)	0.49	0.520
B (mg/dm ³)	0.18 (0.06)	0.11 (0.02)	3.39	0.140
Cu (mg/dm ³)	2.00 (0.00)	2.17 (0.15)	3.57	0.130
Fe (mg/dm ³)	21.33 (2.31)	34.00 (5.57)	13.25	0.022
Mn (mg/dm ³)	23.33 (0.89)	25.53 (1.17)	7.20	0.055
Zn (mg/dm ³)	0.70 (0.00)	0.73 (0.06)	1.00	0.370

Fonte: Elaboração do autor.

Foi observado neste experimento em casa de vegetação (CV), com linhagens puras de milho, efeito significativo da adição de P no solo sobre a atividade de fosfatase ácida quando todas as linhagens foram analisadas em conjunto, sendo esta variável mais elevada no controle em relação ao tratamento com maior disponibilidade de P (Tabela 4). Diâmetro do colmo, massa seca aérea e o teor de água da raiz, ao contrário, apresentaram valores mais elevados quando o P foi

adicionado aos vasos. Para as outras variáveis como altura, número de folhas, massa seca radicular e massa seca total não houve efeito significativo da adição de fósforo em relação ao controle (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias, desvios-padrão (entre parênteses) e significâncias (P) associados ao teste t de Student de oito variáveis em 17 linhagens de milho (*Zea mays*), no estágio de nove folhas desenvolvidas, cultivados em vasos sem fósforo (Controle) e com 200 mg de fósforo por kg de solo (Fósforo). N=3.

Variáveis	Controle	Fósforo	P
Atividade de fosfatase ácida ($\mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	610 (224)	505 (207)	0.003
Altura (cm)	64 (11)	61 (16)	0.170
Número de folhas (unidades)	9.5 (1.2)	10.2 (1.8)	0.055
Diâmetro do colmo (cm)	8.5 (2.2)	9.8 (1.8)	<0.001
Massa seca radicular (g)	1.46 (0.78)	1.74 (1.28)	0.844
Massa seca aérea (g)	2.56 (1.04)	3.24 (1.65)	0.039
Massa seca total (g)	4.03 (1.60)	4.99 (2.71)	0.169
Teor de água (%)	88.31 (2.46)	89.50 (1.52)	0.004

Fonte: Elaboração do autor.

Quando as linhagens foram analisadas separadamente, L4, L8, L9, L10, L12 e L14 exibiram atividades de fosfatase ácida mais elevadas nos controles do que sob fertilização fosfatada ($P < 0.05$) (Tabela 5). As linhagens L1, L2, L3, L5, L6, L7, L11, L13, L15, L16 e L17 não diferiram significativamente em termos de atividade fosfatase ácida em relação aos tratamentos ($P > 0.05$). A atividade de fosfatase ácida foi, em geral, significativamente mais elevada em plantas que não receberam P (Tabela 4; Tabela 5), porém no tratamento com P ocorreu maior diferença entre as linhagens, ao se comparar as médias pelo teste Tukey, sendo possível verificar que as linhagens L3 ($314 \pm 124 \mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e L4 ($303 \pm 34 \mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$) diferiram significativamente das linhagens L1 ($779 \pm 462 \mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$), L9 ($774 \pm 9 \mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e L11 ($772 \pm 305 \mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Tabela 5).

Em geral, as linhagens não responderam à fertilização quanto à porcentagem de colonização micorrízica, com exceção da L4, que apresentou maior colonização no tratamento com adubação fosfatada (Tabela 6).

Tabela 5 – Médias, desvios-padrão (entre parênteses) e significância (P) do efeito da adição de fósforo e das linhagens sobre a atividade de fosfatase ácida radicular ($\mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em 17 linhagens de milho (*Zea mays*) em experimentos em casa de vegetação (Controle: sem aplicação de P; Fósforo: aplicação de 200 mg de P por Kg de solo) e de três linhagens de milho e a população Flintisa em campo (Controle: sem aplicação de fósforo; Fósforo: aplicação de 70 kg P por hectare). Os efeitos da fertilização sobre a atividade de fosfatase ácida foram testados por teste t de Student e diferenças entre as linhagens foram testadas por ANOVA seguida por teste de Tukey. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as linhagens dentro dos respectivos tratamentos ($P < 0.05$). N=3.

Linhagens	Casa de Vegetação			Campo		
	Controle	Fósforo	P	Controle	NPK	P
L1	552 (163) a	779 (462) bc	0.518	.	.	.
L2	526 (108) a	391 (120) abc	0.200	.	.	.
L3	448 (112) a	314 (124) a	0.248	.	.	.
L4	494 (109) a	303 (34) a	0.030	1754 (368)	1386 (359)	0.148
L5	504 (87) a	452 (129) abc	0.555	.	.	.
L6	531 (132) a	649 (233) abc	0.494	.	.	.
L7	491 (51) a	421 (153) abc	0.404	.	.	.
L8	691 (114) a	392 (39) abc	0.007	1173 (260)	1385 (916)	0.720
L9	933 (45) a	774 (9) c	0.003	.	.	.
L10	712 (12) a	506 (52) abc	0.005	.	.	.
L11	861 (747) a	772 (305) bc	0.873	.	.	.
L12	712 (129) a	436 (96) abc	0.044	2649 (1351)	1351 (208)	0.175
L13	469 (26) a	432 (95) abc	0.510	.	.	.
L14	617 (109) a	356 (40) ab	0.010	.	.	.
L15	637 (220) a	527 (17) abc	0.461	.	.	.
L16	601 (139) a	607 (138) abc	0.973	.	.	.
L17	594 (233) a	478 (67) abc	0.595	.	.	.
População	.	.	.	1994 (536)	1637 (652)	0.198
Total	610 (224) .	505 (207)	0.003	1913 (720)	1500 (569)	0.046
Valores de P	P=0.079	P<0.001		P=0.069	P=0.801	
e F (ANOVA)	F=1.790	F=4.051		F=2.831	F=0.333	

Fonte: Elaboração do autor.

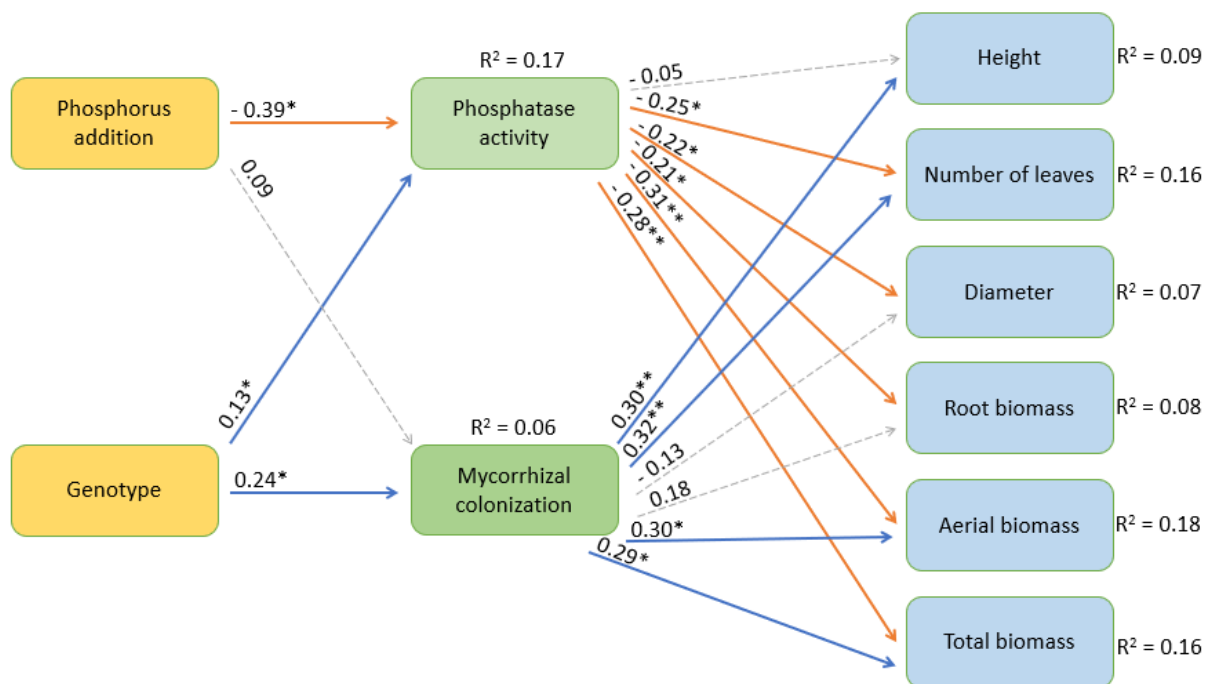
Tabela 6 - Médias, desvios-padrão (entre parênteses) e significância (P) do efeito da adição de fósforo sobre colonização micorrízica (%) em linhagens de milho (*Zea mays*) do experimento em casa de vegetação em solo sem aplicação de fósforo (0) e com 200 mg de P por kg de solo (1) associadas ao teste t de Student (n=3).

Linhagem	Tratamento	Micorriza (%)	F	P
4	0	22.29 (3.64)	22.03	0.009
4	1	43.37 (6.87)		
5	0	55.11 (7.77)	1.19	0.337
5	1	61.75 (7.14)		
6	0	51.65 (14.62)	0.44	0.543
6	1	41.04 (23.45)		
8	0	26.00 (14.3)	2.46	0.192
8	1	43.13 (12.36)		
9	0	46.08 (8.32)	3.15	0.150
9	1	28.93 (14.51)		
12	0	31.67 (8.46)	3.04	0.156
12	1	46.43 (11.97)		
14	0	43.40 (9.77)	2.31	0.203
14	1	34.80 (0.81)		
15	0	50.52 (14.03)	0.27	0.634
15	1	54.82 (3.51)		
16	0	46.47 (17.02)	0.1	0.767
16	1	49.95 (8.48)		
17	0	65.92 (12.96)	1.1	0.353
17	1	54.44 (13.76)		
Total	0	43.91 (16.35)	0.25	0.618
Total	1	45.87 (13.73)		

Fonte: Elaboração do autor.

A modelagem de equações estruturais evidenciou que a adição de fósforo influenciou negativamente a atividade de fosfatase ácida dos genótipos e que identidade do genótipo afetou significativamente tanto a taxa de colonização micorrízica quanto a atividade de fosfatase ácida. Esta influenciou negativamente número de folhas, diâmetro do colmo, massa seca radicular, massa seca aérea e massa seca total, enquanto a taxa de colonização micorrízica influenciou positivamente altura da planta, número de folhas, massa seca aérea e massa seca total (Figura 1).

Figura 1 - Modelo de equação estrutural (SEM) identificando os efeitos da fertilização fosfatada e do genótipo sobre atividade de fosfatase ácida radicular e colonização micorrízica e destes sobre altura da planta, número de folhas, diâmetro do colmo, biomassa radicular, biomassa aérea e biomassa total das 17 linhagens de milho (*Zea mays*) utilizadas no experimento em casa de vegetação. Os números próximos às setas representam os coeficientes padronizados. Linhas azuis e vermelhas representam relações significativas positivas e negativas respectivamente. Linhas cinzas tracejadas indicam relações não significativas ($P > 0.05$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



Fonte: Elaboração do autor.

4.2 Linhagens puras em campo

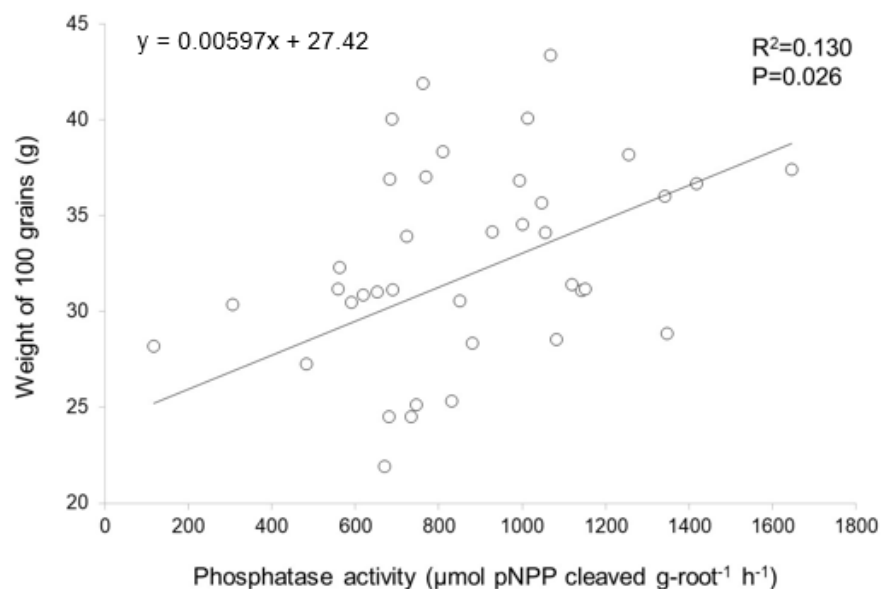
A média geral da atividade de fosfatase ácida das linhagens em campo foi mais elevada no tratamento controle do que sob fertilização, porém nenhuma linhagem individualmente apresentou diferença entre os tratamentos em campo (Tabela 5). A atividade de fosfatase ácida das linhagens foi geralmente mais elevada em campo do que em casa de vegetação (Tabela 5; Apêndice 1).

4.3 Híbridos comerciais simples em campo

Em geral não houve efeito do tratamento de fertilização sobre a atividade de fosfatase ácida para os híbridos estudados, com exceção do híbrido 11, o qual apresentou atividade de fosfatase ácida mais elevada nas parcelas fertilizadas do que no controle. Os híbridos 1 e 9 apresentaram maior massa de 100 grãos no tratamento fertilizado. Para altura da planta, as médias dos híbridos 1, 2, 3, 8, 9, 12 e a média geral foram mais elevadas no tratamento controle. Para altura de espiga o híbrido 2 teve maior média no tratamento controle e os híbridos 4 e 10 maior média no tratamento fertilizado ($P < 0.05$). Não houve diferença para atividade de fosfatase ácida entre os híbridos. Os híbridos diferiram em relação à massa de 100 grãos e altura da espiga em ambos os tratamentos, para altura da planta foram observadas diferenças apenas no tratamento controle (Tabela 7).

O efeito da atividade de fosfatase ácida radicular sobre a massa de 100 grãos dos híbridos nos controles não fertilizados foi significativo (Figura 2), o que não ocorreu para as demais variáveis estudadas (Apêndice 2).

Figura 2 - Efeito da atividade de fosfatase ácida radicular sobre a massa de 100 grãos em parcelas controle (não fertilizadas com fósforo) em 13 híbridos de milho (*Zea mays*) cultivados em campo em Selvíria/MS.



Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 7 - Médias de atividade de fosfatase ácida (P-ase) radicular ($\mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$), massa de 100 grãos (g), altura da planta (cm) e altura da espiga (cm) dos 13 híbridos simples de milho em experimentos em campo com aplicação de 115 kg ha^{-1} da fórmula 8-0-16 NK (Controle) e com 250 kg ha^{-1} da fórmula 8-28-16 de NPK por hectare. Os efeitos da fertilização sobre as variáveis foram testados por teste t de Student ($n=3$) e as diferenças entre os híbridos foram testadas por ANOVA seguida por teste de Tukey ($n=3$), indicadas por asterisco quando significativas (* $P<0.05$, ** $P<0.01$). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre os híbridos dentro dos respectivos tratamentos, letras minúsculas tratamento controle (0) e letras maiúsculas tratamento convencional (1). ($P<0.05$).

Híbrido	Trat	P-ase	Massa 100 grãos	Alt Plan	Alt Esp
H1	0	1012 (341)	35.67 (2.8) bc	222 (5.3)** bcde	127 (12.2) cd
H1	1	885 (138)	40.85 (1.1)* C	200 (2.0)	121 (5.0) B
H2	0	1168 (430)	35.40 (0.6) bc	245 (4.7)** e	130 (11.2)* d
H2	1	1356 (548)	36.26 (2.0) ABC	212 (23.5)	114 (20.0) AB
H3	0	835 (194)	37.93 (5.9) c	215 (2.0)* abcd	96 (5.8) a
H3	1	641 (77)	40.73 (1.4) C	202 (8.7)	103 (3.8) AB
H4	0	840 (435)	31.37 (3.4) abc	195 (14.5) a	95 (9.8) a
H4	1	661 (217)	30.88 (2.2) AB	197 (15.1)	106 (15.5)* AB
H5	0	1067 (244)	35.22 (7.2) bc	227 (9.8) bcde	119 (12.7) bcd
H5	1	929 (374)	37.36 (1.6) BC	217 (14.5)	119 (4.5) B
H6	0	799 (310)	31.93 (0.3) abc	214 (18.8) abc	112 (25.2) abcd
H6	1	885 (60)	30.50 (6.6) AB	205 (6.0)	118 (10.8) B
H7	0	1011 (371)	34.08 (2.8) abc	206 (16.5) ab	96 (14.4) a
H7	1	842 (69)	38.01 (4.0) BC	202 (9.4)	99 (3.5) A
H8	0	774 (290)	26.93 (1.8) ab	214 (6.4)** abc	124 (1.0) cd
H8	1	1199 (429)	33.26 (4.4) ABC	196 (8.7)	120 (13.6) B
H9	0	782 (620)	28.65 (1.3) abc	231 (7.5)** bcde	106 (20.5) abc
H9	1	1090 (542)	32.25 (1.9)* ABC	200 (7.0)	121 (8.3) B
H10	0	575 (85)	30.37 (2.1) abc	210 (15.0) abc	96 (10.4) a
H10	1	715 (213)	29.03 (0.4) AB	201 (8.5)	105 (8.5)*AB
H11	0	727 (90)	24.88 (1.8) a	210 (19.9) abc	99 (13.8) ab
H11	1	947 (66)*	27.28 (3.3) A	193 (27.2)	104 (7.0) AB
H12	0	627 (284)	30.65 (1.1) abc	240 (10.0)** de	132 (4.2) d
H12	1	1150 (368)	29.82 (1.4) AB	215 (24.0)	126 (13.6) B
H13	0	956 (190)	29.49 (2.2) abc	232 (16.7) cde	121 (9.5) bcd
H13	1	1150 (87)	31.77 (4.8) ABC	216 (14.5)	118 (13.2) B
Total	0	860 (313)	31.74 (4.5)	220 (24.7)**	112 (22.1)
Total	1	930 (330)	33.69 (5.1)	204 (25.9)	113 (16.8)
Valores de P		$p=0.001/P<0.001$		$P<0.001$	$P<0.001/P<0.001$
e F (ANOVA)		$f=4.19/F=5.87$		$f = 6.90$	$f=9.87/F=4.57$

*, ** - Significativo em nível de 5% e 1% respectivamente.

Fonte: Elaboração do autor.

4.4 Características do solo entre os experimentos

Não houve diferenças entre as concentrações de fósforo no solo entre os três experimentos (Tabela 8). Nitrogênio, cobre e manganês apresentaram menor disponibilidade no primeiro experimento em comparação ao segundo experimento e este em relação ao terceiro experimento. Matéria orgânica e potássio apresentaram-se mais elevados em ambos os experimentos de campo (experimentos 2 e 3) e menos elevados no solo de casa de vegetação (experimento 1). O pH foi mais elevado em casa de vegetação do que em campo. Cálcio, magnésio e a soma de bases do solo foram mais elevados apenas no experimento 3 e o zinco (Zn) foi menos disponível em casa vegetação em comparação ao experimento 3 realizado em campo.

Tabela 8 - Médias, desvios-padrão (entre parênteses) e significâncias (P) para características de solo nos controles das três áreas experimentais. As diferenças entre os experimentos foram testadas por ANOVA seguida por teste de Tukey (n=3). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as concentrações do respectivo nutriente (P<0.05).

	1° Exp	2° Exp	3° Exp	F	P
N (g/kg)	0.93 (0.07) a	1.39 (0.09) b	1.70 (0.08) c	117.55	<0.001
P - resina (mg/dm ³)	41.5 (38.6)	40 (13.5)	36.3 (7.3)	0.03	0.970
MO (g/dm ³)	19.3 (1.03) a	24.7 (1.15) b	26.3 (2.08) b	31.93	<0.001
pH (CaCl ₂)	5.03 (0.1) b	4.63 (0.15) a	4.73 (0.12) a	13.59	<0.001
K (mmol _c /dm ³)	0.78 (0.08) a	5.06 (0.67) b	4.13 (0.71) b	105.39	<0.001
Ca (mmol _c /dm ³)	12.3 (0.82) a	10 (1.73) a	16.3 (1.15) b	23.34	<0.001
Mg (mmol _c /dm ³)	10 (0.63) a	9.7 (0.58) a	12.7 (1.53) b	10.79	<0.001
Al (mmol _c /dm ³)	1.67 (0.82)	3.33 (1.53)	2.33 (0.58)	2.9	0.110
SB (mmol _c /dm ³)	23.1 (1.43) a	24.7 (2.84) a	33.1 (3.15) b	20.23	<0.001
m (%)	6.7 (3.3)	12 (6.3)	6.3 (2.3)	2.09	0.18
B (mg/dm ³)	0.15 (0.05)	0.19 (0.03)	0.17 (0.04)	0.8	0.48
Cu (mg/dm ³)	20.8 (1.3) a	52.7 (1.5) b	62.7 (2.5) c	725.75	<0.001
Fe (mg/dm ³)	27.7 (7.9)	22.3 (1.1)	26 (0)	0.81	0.470
Mn (mg/dm ³)	24.4 (1.5) a	29.8 (0.5) b	41.6 (0.4) c	221.11	<0.001
Zn (mg/dm ³)	0.72 (0.04) a	3.77 (1.69) ab	6.77 (5.58) b	5.01	0.030

Fonte: Elaboração do autor.

5 DISCUSSÃO

As diferenças significativas no experimento em casa de vegetação em massa seca aérea e diâmetro do colmo devido à adição de P (Tabela 4) já eram esperadas, uma vez que uma maior disponibilidade de P inorgânico no solo gera maior desenvolvimento da planta em geral (COELHO, 2006; PLÉNET *et al.*, 2020), devido a este nutriente ser fundamental para o metabolismo vegetal (MALAVOLTA, 1985).

Sabe-se que em geral uma maior disponibilidade de P pode inibir a atividade de fosfatase ácida (OLDE VENTERINK; GÜSEWELL, 2010) devido ao fato do gasto metabólico para a produção da enzima não ser necessário devido à já existência de fosfato no meio, o que explica as atividades mais baixas em plantas fertilizadas em relação aos controles (Tabela 4). Para o milho, entretanto, observa-se que o efeito da adição de fósforo sobre o crescimento pode variar com o genótipo estudado e com o grau de suscetibilidade do mesmo à deficiência de fósforo no solo (GAUME *et al.*, 2001). O sistema de regulação gênica, em geral, atua no sentido de evitar a expressão desnecessária de genes em órgãos e momentos específicos. Alterações nessa premissa indicam variação nos genes reguladores do sistema. Por exemplo, observa-se tal variação no híbrido 11 (Tabela 7), o qual apresentou atividade enzimática mais elevada mediante fertilização fosfatada, semelhantemente ao genótipo utilizado por Wei *et al.* (2020), onde nos tratamentos com NPK mais palha de milho houve maior atividade de fosfatase ácida do solo em comparação ao tratamento não fertilizado.

As linhagens cultivadas em campo apresentaram atividade de fosfatase ácida consideravelmente mais elevada do que em casa de vegetação (Tabela 5; Apêndice 1). Esta diferença pode ser explicada por dois fatores, um abiótico e outro biótico. A maior disponibilidade de nitrogênio no solo em campo, quando comparado à casa de vegetação (Tabela 8), pode ter estimulado a atividade da enzima nas linhagens em campo, pois este é um dos fatores controladores mais importantes da atividade de fosfatase ácida (OLDE VENTERINK; GÜSEWELL, 2010), uma vez que esta enzima é rica em nitrogênio. Outra explicação para uma maior atividade de fosfatase ácida nas plantas de campo reside na presença de outras plantas próximas, cujo contato de raiz pode estimular a atividade desta enzima, como demonstrado por Lannes *et al.* (2020a) para plantas silvestres viventes no bioma Cerrado.

Tanto no primeiro quanto no segundo experimento que utilizaram linhagens puras foram observados efeitos significativos dos tratamentos sobre a atividade de fosfatase ácida (Tabela 5), confirmando que em geral quanto menor for a disponibilidade de P no solo maior será a atividade de fosfatase ácida no milho. Entretanto, é possível observar que existe variabilidade genética entre as linhagens, pela diferença da atividade de fosfatase ácida entre os genótipos e pelas diferentes formas que os genótipos reagiram à maior e à menor disponibilidade de P, como principalmente a L16 e L11 que não apresentaram diferenças em suas atividades de fosfatase ácidas com e sem P, assim como a L1, L5, L6, L7, L13, L15, L17, não sendo então moduladas pelo P. Isto indica que o genótipo dessas linhagens para os genes reguladores de fosfatase ácida é diferente das demais, não sendo sensíveis à presença de fósforo no solo nas condições de casa de vegetação.

A atividade da enzima nas linhagens cultivadas em campo não diferiu entre os tratamentos de fertilização e controle, ao contrário do observado em casa de vegetação (Tabela 5). Ao comparar a atividade da enzima das linhagens entre estes experimentos, foi constatada maior atividade em campo do que em casa de vegetação, tanto nos controles quanto sob fertilização (Apêndice 1). Especula-se que a disponibilidade de N seja um importante fator de regulação da fosfatase no milho, uma vez que em solo da casa de vegetação com menor disponibilidade de N em comparação ao solo da área de campo (Tabela 8), a estratégia adotada pelas linhagens foi de reduzir a atividade de fosfatase ácida geral e utilizar o N para seu desenvolvimento em ambos os tratamentos. Sob o tratamento controle, entretanto, as linhagens em casa de vegetação investiram mais em fosfatase devido à menor disponibilidade de P no solo, mesmo tendo maior gasto de energia e de N, resultando em maior atividade da enzima, conseqüentemente menor massa seca aérea (Tabela 4). A influência negativa da atividade de fosfatase ácida sobre as variáveis de crescimento no experimento em casa de vegetação (Figura 1) corrobora esta especulação, pois a menor disponibilidade de N no solo prejudica o desenvolvimento da planta quando esta investe mais em fosfatase ácida e não possui quantidade suficiente de N para seu desenvolvimento. Em contrapartida, os efeitos da colonização micorrízica sobre o crescimento foi positivo, com exceção para o diâmetro do colmo, evidenciando a importância desta simbiose fungo-planta para o desenvolvimento da planta em ambas as condições de disponibilidade de P no solo.

As diferenças encontradas entre as linhagens neste trabalho indicam que existe variabilidade genética para a atividade de fosfatase ácida radicular (Tabela 5) concordando com os resultados apresentados por Machado e Furlani (2004) que avaliaram seis genótipos, sendo três variedades comuns e três variedades melhoradas de milho, verificando um genótipo com média significativamente inferior aos demais. A ocorrência de variabilidade genética também foi verificada por Chen *et al.* (2008) que estimaram herdabilidade no sentido amplo em milho para atividade de fosfatase ácida de 52.7%, além de 90.9% para eficiência de absorção de P pela planta. Também relataram que os dois parentais testados diferiram significativamente para atividade de fosfatase ácida, tendo o maior valor o genótipo tolerante à deficiência de P em comparação com o genótipo suscetível à deficiência de P.

Ao analisar a altura da planta nos híbridos comerciais (Tabela 7) é possível verificar que seis híbridos e a média geral diferiram entre os tratamentos, sendo mais altas no tratamento controle. O estudo não determinou qual a razão para tal fato, mas especula-se que o investimento em altura possa ser uma estratégia para condições com menos P disponível no solo, devido à competição com outras plantas presentes em campo em busca de possuir maior área foliar iluminada pelo sol, aumentando assim a eficiência do uso de recursos.

Ao observar a atividade de fosfatase ácida dos híbridos simples comerciais de milho (Tabela 7) verifica-se que não há diferença entre eles, entretanto a média geral da atividade da enzima no tratamento com fertilizante dos híbridos é menor do que das linhagens puras em campo, com tratamento semelhante (1376 ± 478 e 930 ± 330 $\mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente para o segundo e terceiro experimentos, $F=13,06$ e $P=0,001$), evidenciando que a seleção indireta do melhoramento genético apresentou tendência em selecionar genótipos com atividade de fosfatase ácida mais baixa, tal afirmação é corroborada pela grande variabilidade fenotípica e potencial genético das linhagens para a atividade de fosfatase ácida, sendo possível a obtenção de híbridos simples com significativa variabilidade para esta característica, por ser um caráter quantitativo com 33 genes envolvidos no seu controle (GONZÁLEZ-MUNOZ *et al.*, 2015).

Em condições com maior disponibilidade de P no solo a atividade de fosfatase ácida não teve efeito significativo sobre a produtividade, entretanto no tratamento controle com menor disponibilidade de P no solo os híbridos comerciais

apresentaram uma relação positiva entre massa de 100 grãos e atividade fosfatase ácida (Figura 2), evidenciando que a atividade desta enzima é importante para a aquisição de fósforo e para o aumento da produtividade do milho em condições com menor disponibilidade de P. Esta observação indica que a atividade de fosfatase ácida contribui diretamente para o aumento da produtividade em sistema não fertilizado, funcionando como estratégia para aquisição de fósforo e investimento deste diretamente em produtividade em sistemas não fertilizados.

Os experimentos de Lu *et al.* (2016) em arroz transgênico, com a superexpressão dos genes OsPAP10a e OsPAP10c e de Wang *et al.* (2009) em soja transgênica, com a superexpressão e inserção do gene AtPAP15 de *Arabidopsis thaliana*, para aumentar a atividade de fosfatase ácida. Apesar de constatarem melhora na eficiência do uso do P orgânico em solos com menor disponibilidade de P, o rendimento continuou inferior em comparação com os genótipos sem o aumento da atividade de fosfatase ácida, ambos os experimentos não consideraram o N como um importante fator de regulação da atividade de fosfatase ácida. Para o aumento da expressão da atividade de fosfatase ácida resultar em ganhos de produtividade ou melhor desenvolvimento da planta é necessário que se tenha maior disponibilidade e eficiência de uso do N pela planta, levando a crer que o N no solo e atividade de fosfatase ácida aparentam co-limitar o enchimento do grão e o desenvolvimento da planta, pois quanto mais fosfatase a planta produz, mais se utiliza o nitrogênio interno, diminuindo a disponibilidade de nitrogênio para o metabolismo e conseqüentemente afetando seu desenvolvimento e rendimento, necessitando que ambos aumentem de maneira conjunta, independentemente do tipo de solo.

Para sistemas mais sustentáveis de produção com o intuito de reduzir o uso de fertilizantes fosfatados, o aumento da atividade de fosfatase ácida deve ser realizado juntamente com a maior disponibilidade ou eficiência de uso do N, objetivando manter o equilíbrio entre o N e P interno. Outra alternativa para tornar a produção ainda mais sustentável é a utilização de genótipos que realizam a fixação de nitrogênio no solo, como demonstrado ser possível por Van Deynze *et al.* (2018), devido a realização da associação do milho com bactérias diazotróficas, principalmente *Azospirillum brasilense*, representando entre 29% a 82% do N absorvido pelo milho.

Por não ser habitual as empresas de melhoramento genético testarem os híbridos sem o uso de fertilizantes fosfatados ou meios mais sustentáveis de adubação fosfatada e pela grande quantidade de híbridos simples existentes atualmente, há uma possibilidade de já existirem genótipos com maior absorção e/ou melhor eficiência na utilização de N e maiores atividades de fosfatase ácida que possibilitariam a produção do milho em sistemas mais sustentáveis sem a perda de produtividade. Como exemplo, Wei *et al.* (2020) demonstraram que não houve perdas de produtividade mediante redução de 20% de fertilização fosfatada, evidenciando a compensação da fertilização fosfatada pelo incremento da palha do milho e aumento da atividade de fosfatase ácida.

Baseado nos estudos sobre os genes PAPs (TRAN *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2002, ZHANG *et al.*, 2011, Li *et al.*, 2012, GONZALEZ-MUNOZ *et al.*, 2015), as linhagens L16, L9 e L1 podem ser excelentes genótipos para a realização de análises funcionais dos genes PAPs, devido a divergência apresentada quanto plasticidade em relação à adubação fosfatada, seguindo as recomendações de González-Munoz *et al.* (2015), os quais afirmam que isso pode facilitar o uso das PAPs como alvos diretos de seleção e manipulação pelo melhoramento genético. Assim como outras linhagens que divergiram referente a maiores e menores atividade de fosfatase ácida para cada condição de disponibilidade de P no solo, podem ser utilizadas para a realização de cruzamentos com o intuito de verificar a ocorrência de heterose para a atividade de fosfatase ácida, o que permitirá uma melhor base de tomada de decisão sobre a viabilidade de um programa de melhoramento genético voltado para atividade de fosfatase ácida radicular, visando tornar a agricultura mais sustentável, tanto em condições normais de adubação como em condições de agricultura orgânica sem utilização de fertilização fosfatada.

A partir dos resultados deste trabalho, acredita-se que exista a possibilidade de sucesso na seleção de genótipos mais adaptados à baixa disponibilidade de fósforo inorgânico no solo e ao mesmo tempo, genótipos que possuam maior atividade de fosfatase ácida sob condições de fertilização fosfatada como forma de reduzir a quantidade de fertilizante fosfatado necessário à cultura do milho no Cerrado. Futuras pesquisas também se devem dar atenção a melhor compreensão da relação do nitrogênio com a atividade de fosfatase ácida, amplificando-se os testes de híbridos simples em condições sem o uso de fertilizante fosfatado. Considerando os aumentos crescentes na disponibilidade de carbono e nitrogênio

devido a atividades antrópicas não são seguidos por aumentos na disponibilidade de fósforo (PENUELAS *et al.*, 2020) e que estes desbalanços podem acarretar em perdas para a agricultura, recomenda-se a geração de variabilidade genética para a atividade de fosfatase ácida em conjunto com a maior absorção ou/e melhor eficiência de uso do nitrogênio no milho visando o aumento da produtividade por unidade de fósforo e nitrogênio absorvidos em sistema de produção mais sustentável.

6 CONCLUSÕES

1. Há diferenças significativas na atividade de fosfatase ácida radicular entre as linhagens, corroborando a existência de variabilidade genética para esse caráter.

2. A atividade de fosfatase ácida radicular do milho é modulada pela disponibilidade de fósforo inorgânico na maioria das linhagens, indicando diferença na plasticidade fenotípica mediante a fertilização. Já nos híbridos comerciais, a fertilização fosfatada raramente influenciou a atividade de fosfatase ácida. Entretanto nas linhagens a regulação exercida pela disponibilidade de nitrogênio no solo foi maior do que a do fósforo.

3. A colonização micorrízica geralmente não foi modulada pela disponibilidade de fósforo inorgânico, sendo observado em apenas uma linhagem diferença entre os tratamentos.

4. As linhagens regularam a colonização micorrízica que, por sua vez, apresentaram efeito positivo sobre a biomassa radicular e aérea, indicando ser de importância para o desenvolvimento da planta.

5. A atividade de fosfatase ácida exerceu efeitos negativos sobre o desenvolvimento das linhagens e influenciou positivamente o enchimento de grãos nos híbridos em solos com menor disponibilidade de fósforo, no geral apresenta ter uma relação de co-limitação com o nitrogênio para o enchimento do grão e desenvolvimento do milho.

6. A inserção da atividade de fosfatase ácida em programas de melhoramento genético visando o aumento da eficiência do uso de fósforo mostrou-se ser promissora para a obtenção de genótipos mais adaptados a sistemas de produção mais sustentáveis, por possuir grande potencial genético, plasticidade fenotípica e por colaborar para o enchimento do grão e desenvolvimento da planta em solo com menor disponibilidade de fósforo.

REFERÊNCIAS

- ADETUNJI, A. T.; LEWU, F. B.; MULIDZI, R.; NCUBE, B. The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 17, n. 3, p. 794-807, 2017. DOI:10.4067/s0718-95162017000300018
- BALEMI, T.; NEGISHO, K. Management of soil phosphorus and plant adaptation mechanisms to phosphorus stress for sustainable crop production: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 12, n. 3, p. 547-562, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162012005000015>
- BRASIL. Conselho Nacional de Abastecimento – CNA. **Comparativo da área, produção e produtividade**: Safras 2001/2002 e 2002/2003. Brasília, DF: CNA, 2003. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/safras.asp>. Acesso em: 20 out. 2020.
- CAMPOS, D.T. DA S.; ANDRADE, J.A. DA C.; CASSIOLATO, A.M.R. Crescimento e micorrização de genótipos de milho em casa de vegetação. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 555–562, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052010000300006>
- CARVALHO, M. A. C. de.; SORATTO, R. P.; ATHYDE, M. L. F.; ARF, O.; SÁ, M. E. de. Produtividade do milho em sucessão a adubos verdes no sistema de plantio direto e convencional. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.1, p. 47-53, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2004000100007>
- CHAPUIS-LARDY, L.; BROSSARD, M.; QUIQUAMPOIX, H. Assessing organic phosphorus status of Cerrado oxisols (Brazil) using ^{31}P -NMR spectroscopy and phosphomonoesterase activity measurement. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 81, n. 5, p. 591-601, 2001. <https://doi.org/10.4141/S00-079>
- CHEN, J.; XU, L.; CAI, Y.; XU, J. QTL mapping of phosphorus efficiency and relative biological characteristics in maize (*Zea mays* L.) at two sites. **Plant and Soil**, The Hague, v. 313, p. 251–266, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11104-008-9698-x>
- COELHO, A. M. **Nutrição e adubação do milho**. Sete Lagoas: Ed. Embrapa Milho e Sorgo, 2006.
- CONG, W-F.; SURIYAGODA, L. D. B.; LAMBERS, H. Tightening the Phosphorus Cycle through Phosphorus-Efficient Crop Genotypes. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 25, p. 967 - 975, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.04.013>
- CORDELL, D.; ROSEMARIN, A.; SCHRÖDER, J. J.; SMIT, A. L. Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options. **Chemosphere**, Oxford, v. 84, p. 747–758, 2011.
- COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; PICCOLO, A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 129, p. 40–44, 2013.

DHILLON, J.; TORRES, G.; DRIVER, E.; FIGUEIREDO, B.; RAUN, W. R. World Phosphorus Use Efficiency in Cereal Crops. **Agronomy Journal**, Madison, v. 109, n. 4, p. 1670- 1677, 2017. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj2016.08.0483>

FANCELLI, A. L. **Fenologia do milho**. Goiânia: FAEG, 2004. Disponível em: <http://www.faeg.com.br>. Acesso em: 15 maio 2020.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura). **World fertilizer trends and outlook to 2018**. Roma: FAO, 2015. ISBN: 978-92-5-108692-6.

FILARDI, F. L. R.; BARROS, F. D.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E. M.; CAVALCANTI, T. B.; COELHO, M. A. N.; *et al.* Brazilian Flora 2020: innovation and collaboration to meet Target 1 of the Global Strategy for Plant Conservation (GSPC). **Rodriguésia**, Rio de Janeiro, v. 69, n. 4, p. 1513–1527, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201869402>

FILHO, D. R. **Potencial de produção de grãos brasileiros via fertilização e impactos nas emissões de CO_{2eq}**. 2014. Dissertação (MPAGRO) - Escola de Economia de São Paulo, São Paulo, 2014.

GAUME, A.; MÄCHLER, F.; De LEÓN, C.; NARRO, L.; FROSSARD, E. Low-P tolerance by maize (*Zea mays* L.) genotypes: Significance of root growth, and organic acids and acid phosphatase root exudation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 228, p. 253–264, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004824019289>

GILBERT, N. Environment: the disappearing nutrient. **Nature**, London, v. 461, n. 7265, p.716–718, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1038/461716a>

GOEDERT, W. J. Management of the Cerrado soils of Brazil: a review. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 405-428, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1983.tb01045.x>

GONZALEZ-MUNOZ, E.; AVENDANO-VAZQUEZ, A. O.; MONTES, R. A.; FOLTER, S.; ANDRES-HERNANDEZ, L.; ABREU-GOODGER, C.; SAWERS, R. J. The maize (*Zea mays* ssp. *mays* var. B73) genome encodes 33 members of the purple acid phosphatase family. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 6, p. 341, 2015. DOI: 10.3389/fpls.2015.00341

GUIGNARD, M. S.; LEITCH, A. R.; ACQUISTI, C.; EIZAGUIRRE, C.; ELSER, J. J.; HESSEN, D. O.; JEYASINGH, P. D.; NEIMAN, M.; RICHARDSON, A. E.; SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E.; STEVENS, C. J.; TRIMMER, M.; WEIDER, L. J.; WOODWARD, G.; LEITCH, I. J. Impacts of nitrogen and phosphorus: from genomes to natural ecosystems and agriculture. **Frontiers in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 5, n. 70, 2017. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00070>

HAVLIN, J. L.; TISDALE, S. L.; NELSON, W. L.; BEATON, J. D. **Soil fertility and nutrient management**: An introduction to nutrient management. 8. ed. New York: Ed. Pearson, 2014.

- HOU, E.; LUO, Y.; KUANG, Y.; CHEN, C.; LU, X.; JIANG, L.; LUO, X.; WEN, D. Global meta-analysis shows pervasive phosphorus limitation of aboveground plant production in natural terrestrial ecosystems. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14492-w>
- KHAN, A.; LU, G.; AYAZ, M.; ZHANG, H.; WANG, R.; LV, F.; YANG, X.; SUN, B.; ZHANG, S. Phosphorus efficiency, soil phosphorus dynamics and critical phosphorus level under long-term fertilization for single and double cropping systems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s. l.], v. 256, p. 1–11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.01.006>
- KIRCHMANN, H.; THORVALDSSON, G. Challenging targets for future agriculture. **European Journal of Agronomy**, [s. l.], v.12, p. 145–161, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1161-0301\(99\)00053-2](https://doi.org/10.1016/S1161-0301(99)00053-2)
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**, Boston, v. 19, p. 707–713, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00702.x>
- LAMBERS, H.; De BRITTO COSTA, P.; OLIVEIRA, R. S.; SILVEIRA, F. A. O. Towards more sustainable cropping systems: lessons from native Cerrado species. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, [s. l.], v. 32, p. 175-194, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40626-020-00180-z>
- LAMBERS, H.; SHANE, M. W.; CRAMER, M. D.; PEARSE, S. J.; VENEKLAAS, E. J. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching morphological and physiological traits. **Annals of Botany**, London, v. 98, p. 693–713, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcl114>
- LANNES, L. S.; BUSTAMANTE, M. M. C.; EDWARDS, P. J.; OLDE VENTERINK, H. Native and alien herbaceous plants in the Brazilian Cerrado are (co-)limited by different nutrients. **Plant and Soil**, The Hague, v. 400, n. 1, p. 231–243, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2725-9>
- LANNES, L. S.; KARRER, S.; TEODORO, D. A. A.; BUSTAMANTE, M. M. C.; EDWARDS, P. J.; OLDE VENTERINK, H. Species richness both impedes and promotes alien plant invasions in the Brazilian Cerrado. **Scientific Reports**, Tokyo, v. 10, 2020a. doi.org/10.1038/s41598-020-68412-5
- LANNES, L. S.; OLDE VENTERINK, H.; LEITE, M. R.; SILVA, J. N.; OBERHOFER, M. Boron application increases growth of Brazilian Cerrado grasses. **Ecology and Evolution**, v. 10, p. 6364– 6372, 2020 (b). <https://doi.org/10.1002/ece3.6367>
- LI, C.; GUI, S.; YANG, T.; WALK, T.; WANG, X.; LIAO, H. Identification of soybean purple acid phosphatase genes and their expression responses to phosphorus availability and symbiosis. **Annals of Botany**, London, v. 109, p. 275–285, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcr246>

LI, D.; ZHU, H.; LIU, K.; LIU, X.; LEGGEWIE, G.; UDVARDI, M.; WANG, D. Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 277, p. 27772–27781, 2002. DOI: 10.1074/jbc.M204183200

LIMA, M.; Da SILVA JUNIOR, C. A.; RAUSCH, L.; GIBBS, H. K.; JOHANN, J. A. Demystifying sustainable soy in Brazil. **Land Use Policy**, Guildford, v. 82, p. 349–352, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.12.016>

LÓPEZ-CARMONA, D. A.; ALARCÓN, A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PEÑA-CABRIALES, J. J.; LARSEN, J. Maize plant growth response to whole rhizosphere microbial communities in different mineral N and P fertilization scenarios. **Rhizosphere**, [s. l.], v. 9, p. 38-46, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2018.11.004>

LU, L.; QIU, W.; GAO, W.; TYERMAN, S. D.; SHOU, H.; WANG, C. OsPAP10c, a novel secreted acid phosphatase in rice, plays an important role in the utilization of external organic phosphorus. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 39, p. 2247–2259, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/pce.12794>

MACHADO, C. T. de T.; FURLANI, Â. M. C. Root phosphatase activity, plant growth and phosphorus accumulation of maize genotypes. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 2, p. 216-223, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162004000200015>

MALAVOLTA, E. Nutrição mineral. In: FERRI, M. G. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: EPU, 1985. p. 97-116.

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

MARGALEF, O.; SARDANS, J.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, M.; MOLOWNY-HORAS, R.; JANSSENS, I. A.; CIAIS, P.; GOLL, D.; RICHTER, A.; OBERSTEINER, M.; ASENSIO, D.; PEÑUELAS, J. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. **Scientific Reports**. Tokyo, v. 7, P. 1-13, 2017.

MEW, M. C. Phosphate rock costs, prices and resources interaction. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 542, p.1008–1012, 2016.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; Da FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853–858, 2000. <https://doi.org/10.1038/35002501>

NOVAIS, R. F.; FERREIRA, P. R.; NEVES, J. C. L.; BARROS, N. F. Absorção de fósforo e crescimento do milho com sistema radicular parcialmente exposto a fonte de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n.7, p. 749–754, 1985.

OLDE VENTERINK, H. Legumes have a higher root phosphatase activity than other forbs, particularly under low inorganic P and N supply. **Plant and Soil**, The Hague v. 347, p. 137–146, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0834-7>

OLDE VENTERINK, H.; GÜSEWELL, S. Competitive interactions between two meadow grasses under nitrogen and phosphorus limitation. **Functional Ecology**, Oxford, v. 24, p. 877–886, 2010.

PENUELAS, J.; JANNSENS, I.; CIAIS, P.; OBERSTEINER, M.; SARDANS, J. Anthropogenic global shifts in biospheric N and P concentrations and ratios and their impacts on biodiversity, ecosystem productivity, food security, and human health. **Global Change Biology**, Oxford v. 26, p. 1962-1985, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/gcb.14981>

PLAXTON, W. C. Plant response to stress: biochemical adaptations to P deficiency. *In*: GOODMAN, R. M. **Encyclopedia of plant and crop science**. [S. l.]: Marcel Dekker, 2004. p. 976-980.

PLÉNET, D.; MOLLIER, A.; PELLERIN, S. Growth analysis of maize field crops under phosphorus deficiency. II. Radiation-use efficiency, biomass accumulation and yield components. **Plant and Soil**, The Hague, v. 224, p. 259–272, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1004835621371>

RAIJ, B.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001.

RESENDE, J. C. F.; MARKEWITZ, D.; KLINK, C. A.; BUSTAMANTE, M. M. C.; DAVIDSON, E. A. Phosphorus cycling in a small watershed in the Brazilian Cerrado: impacts of frequent burning. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 105, p. 105-118, 2011. doi.org/10.1007/s10533-010-9531-5

RICHARDSON, A. E.; LYNCH, J. P.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E.; HARVEY, P. R.; RYAN, M. H.; VENEKLAAS, E. J.; LAMBERS, H.; OBERSON, A.; CULVENOR, R. A.; SIMPSON, R. J. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. **Plant and soil**, The Hague, v. 349, p. 121–156, 2011.

RILLIG, M. C.; SOSA-HERNÁNDEZ, M. A.; ROY, J.; AGUILAR-TRIGUEROS, C. A.; VÁLYI, K.; LEHMANN, A. Towards an Integrated Mycorrhizal Technology: Harnessing Mycorrhiza for Sustainable Intensification in Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, 2016. DOI:10.3389/fpls.2016.01625

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; BENSON, G. O. **Como a planta de milho se desenvolve**. 103. ed. Piracicaba: Informações Agronômicas, 2003.

SANTOS, H. G.; JACOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBREAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; FILHO, J. C. A.; CUNHA, T. J. F.; OLIVEIRA, J. B. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Revista e Ampliada. 5. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2018. DOI: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1094003>

SMITH, F. W. Plant response to nutritional stresses. In: HAWKESFORD, M. J.; BUCHNER, P. **Molecular analysis of plant adaptation to the environment**. The Netherlands: Springer Netherlands; Ed. Kluwer Academic Publishers Series of Plant Ecophysiology, 2001.

SMITH, S. E.; READ, D. **Mycorrhizal symbiosis**, 3. ed. San Diego: Ed. Academic, 2008.

SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, p. 227–250, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103846>

TARAFDAR, J. C.; CLAASSEN, N. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, [s. l.], v. 164, p. 279-282, 2001.

TEIXEIRA, F. F.; AVELLAR, G. **Considerações sobre a manutenção de germoplasma de milho no Brasil**. Sete Lagoas, MG. Ed. Embrapa Milho e Sorgo. 65, 2008.

TRAN, H. T.; HURLEY, B. A.; PLAXTON, W. C. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. **Plant Science**, Limerick, v. 179, p.14–27, 2010. DOI: [10.1016/j.plantsci.2010.04.005](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.005)

UNITED NATIONS. **Transforming our world: the 2030 agenda for sustainable**. 2015. Disponível em: DOI: <https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld>. Acesso em: 16 jul. 2020.

VAN DEYNZE, A. Van; ZAMORA, P.; DELAUX, P-M.; HEITMANN, C.; JAYARAMAN, D.; RAJASEKAR, S.; GRAHAM, D.; MAEDA, J.; GIBSON, D.; SCHWARTZ, K. D.; BERRY, A. M.; BHATNAGAR, S.; JOSPIN, G.; DARLING, A.; JEANNOTTE, R.; LOPEZ, J.; WEIMER, B. C.; EISEN, J. A.; SHAPIRO, H.; ANÉ, J.; BENNETT, A. B. Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. **PLoS biology**, v. 16, n. 8, 2018. doi.org/10.1371/journal.pbio.2006352

VAN KAUWENBERGH, S. J. **World Phosphate Rock Reserves and Resources**. 1. ed. Muscle Shoals, Alabama. Ed. Technical Bulletin IFDC-T.75, 2010.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, Cambridge, v. 157, p. 423–447, 2003. doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x

VENEKLAAS, E. J.; LAMBERS, H.; BRAGG, J.; FINNEGAN, P. M.; LOVELOCK, C. E.; PLAXTON, W. C.; PRICE, C. A.; SCHEIBLE, W. R.; SHANNE, M. W.; WHITE, P. J.; RAVEN, J. A. Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 195, p. 306–320, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2012.04190.x

VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A. P.; WYSS, U. R. S.; PICHÉ, Y. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 5004–5007, 1998.

WANG, X.; WANG, Y.; TIAN, J.; LIM, B. L.; YAN, X.; LIAO, H. Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 151, p. 233-240, 2009. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138891>

WASSEN, M. J.; OLDE VENTERINK, H.; LAPSHINA, E. D.; TANNEBERGER, F. Endangered plants persist under phosphorus limitation. **Nature**, London, v. 437, n. 7058, p. 547-550, 2005. <https://doi.org/10.1038/nature03950>

WEI, K.; CHEN, Z.; JIANG, N.; ZHANG, Y.; FENG, J.; TIAN, J.; CHEN, X.; LOU, C.; CHEN, L. Effects of mineral phosphorus fertilizer reduction and maize straw incorporation on soil phosphorus availability, acid phosphatase activity, and maize grain yield in northeast China. **Archives of Agronomy and Soil Science**, [s. l.], 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1714031>

ZHANG, Q.; WANG, C.; TIAN, J.; LI, K.; SHOU, H. Identification of rice purple acid phosphatases related to phosphate starvation signalling. **Plant Biology**, Stuttgart v. 13, p. 7–15, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00346.x>

APÊNDICE A – Efeito da atividade de fosfatase ácida

Tabela 9 – Comparação (teste t de Student) entre os valores de atividade de fosfatase ácida ($\mu\text{mol pNPP graiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$) das linhagens no primeiro experimento (n=9) (casa de vegetação) e no segundo experimento (campo) (n=11). Dados referentes somente às linhagens presentes em ambos os experimentos.

Linhagens dos tratamentos sem adição de fertilizante								
	L4		L8		L12		Total	
	1° Exp.	2° Exp.	1° Exp.	2° Exp.	1° Exp.	2° Exp.	1° Exp.	2° Exp.
Média	494,11	1754,71	691,59	1173,53	712,08	2649,16	632,59	1840,15
Desvio Padrão	109,62	368,92	114,06	260,23	129,31	1351,00	145,95	875,48
F	8,29		1,04		3,18		7,189	
P	0,001		0,042		0,069		0,001	
Linhagens dos tratamentos com adição de P (1° Exp.) e NPK (2° Exp.)								
	L4		L8		L12		Total	
	1° Exp.	2° Exp.	1° Exp.	2° Exp.	1° Exp.	2° Exp.	1° Exp.	2° Exp.
Média	303,10	1386,49	392,46	1385,06	436,82	1351,49	377,46	1376,56
Desvio Padrão	34,52	359,56	39,06	916,85	96,04	208,09	80,40	478,28
F	8,20		13,50		1,96		10,11	
P	0,002		0,134		0,002		<0,001	

Fonte: Elaboração do autor.

Tabela 10 – Parâmetros resultantes do efeito linear da atividade de fosfatase ácida sobre variáveis de produtividade e crescimento dos híbridos comerciais em campo com tratamentos analisados em conjunto (total) e separadamente (controle e fósforo) (experimento 3).

	Massa 100 grãos	Altura planta	Altura espiga	Número de folhas
<i>Total</i>				
F	1.997	0.312	1.690	0.884
P	0.162	0.578	0.198	0.350
R ²	0.027	0.040	0.023	-0.012
<i>Controle</i>				
F	5.394	1.127	0.268	0.824
P	0.026	0.295	0.608	0.370
R ²	0.130	0.030	0.007	-0.022
<i>Fósforo</i>				
F	0.032	0.106	1.968	0.736
P	0.858	0.746	0.169	0.397
R ²	0.001	0.003	0.053	-0.021

Fonte: Elaboração do autor.