

## Simbiose tripartite soja-fungos micorrízicos-*Bradyrhizobium* sob efeito do biofertilizante formononetina e de doses de fósforo<sup>(1)</sup>

Jacqueline Savana da Silva<sup>(2)</sup>; Teotonio Soares de Carvalho<sup>(3)</sup>; Maíra Akemi Toma<sup>(4)</sup>; Jessé Valentim dos Santos<sup>(5)</sup>; Paula Rose de Almeida Ribeiro<sup>(6)</sup>; Fatima Maria de Souza Moreira<sup>(7)</sup>

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CNPq

<sup>(2)(3)</sup> Estudantes do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo; Universidade Federal de Lavras; Lavras, MG; jacsavana@yahoo.com.br/teo.decarvalho@gmail.com; <sup>(4)</sup> Estudante de graduação em Agronomia, UFLA, maira\_toma@hotmail.com; <sup>(5)(6)</sup> Estudantes do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, UFLA, js.valentim@hotmail.com/paularose@bol.com.br; <sup>(7)</sup> Professora do Departamento de Ciência do Solo, bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq; UFLA, fmoreira@ufla.br

**RESUMO:** A colonização de nódulos radiculares por FMA é uma interação da simbiose tripartite (soja-FMA-rizóbio) pouco estudada sobretudo, em relação à atividade do nódulo e à influência de fatores externos, como adubação e a aplicação de bioestimulantes da colonização radicular por FMA nativos do solo. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a colonização micorrízica dos nódulos ativos e inativos de soja sob efeito de doses de formononetina e P, em comparação com a colonização micorrízica das raízes. O experimento de campo foi instalado em blocos casualizados, em esquema fatorial 4 x 3, com 5 repetições. Nódulos e raízes foram coletados durante o estágio R2 das plantas, submetidos à metodologia de avaliação da colonização micorrízica e posteriormente avaliados por microscopia. A colonização superficial de nódulos radiculares por FMA não foi restrita a nódulos inativos, sendo maior em nódulos ativos. A formononetina estimulou a colonização micorrízica dos nódulos ativos, principalmente nas menores doses de P, de forma similar à colonização micorrízica das raízes, mas teve efeito nulo em doses médias e altas de P. Desse modo, a aplicação de formononetina aumenta a colonização superficial de nódulos ativos de FMA e das raízes, mas seu efeito é anulado pelo aumento na dose de P e pela inatividade do nódulo.

**Termos de indexação:** *Glycine max*, colonização nodular, simbioses radiculares.

### INTRODUÇÃO

As simbioses de leguminosas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> nodulíferas (BFNN) podem ocorrer simultaneamente. Na raiz, esses microssimbiontes podem interagir de forma indireta, com estímulo de ambos ao crescimento da hospedeira; ou direta, a exemplo da colonização dos nódulos radiculares por FMA. Esta última interação é ainda pouco elucidada, principalmente em relação à atividade do nódulo e à influência de fatores externos como adubação e aplicação de produtos químicos na planta hospedeira. A aplicação de bioestimulantes, como o flavonóide formononetina tem sido indicada para

estimular a colonização radicular por FMA nativos do solo, (Nair et al., 1991), principalmente sob baixa disponibilidade de P. Mas, é possível que em leguminosas, a formononetina aumente não apenas diretamente a colonização micorrízica das raízes, mas também indiretamente a nodulação. O objetivo desse trabalho foi avaliar a colonização micorrízica dos nódulos ativos e inativos de soja sob efeito de doses de formononetina e P, em comparação com a colonização micorrízica das raízes.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foi instalado um experimento de campo no período de dezembro de 2010 a abril de 2011 na fazenda experimental da Universidade Federal de Lavras, localizada em Ijaci, Minas Gerais, a 21°12'17" S, 44°58'49" W, altitude de 957 m e precipitação média anual de 1.411 mm. O solo da área é classificado como Latossolo Vermelho Amarelo.

### Tratamentos e amostragens

O experimento foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 3 x 4, sendo três doses de fósforo (0, 60 e 120 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, correspondentes a 0, 50 e 100% da dose recomendada a partir da análise do solo) quatro doses do bioestimulante formononetina (0, 25, 50 e 100 g ha<sup>-1</sup> de PHC-506) e 5 repetições.

O preparo do solo constituiu-se de uma aração e uma gradagem, seguidas pelas aberturas dos sulcos de plantio. A adubação foi realizada manualmente antes da semeadura aplicando-se as doses recomendadas de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, juntamente com 40 kg de K<sub>2</sub>O kg ha<sup>-1</sup> nos sulcos de plantio. A variedade de soja utilizada foi a FAVORITA RR e as sementes foram inoculadas utilizando inoculante comercial turfoso (100 g de inoculante por 50 kg de semente) contendo *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. Os tratamentos culturais foram realizados uniformemente em todas as parcelas experimentais, conforme a necessidade da cultura.

Durante o estágio R2 procedeu-se a coleta aleatória dos nódulos e das raízes explorando as 60 parcelas presentes no campo originadas pelas

combinações dos teores de P e doses de formononetina. Foram coletadas 3 plantas de cada parcela e 15 nódulos de cada planta, formando uma amostra composta com 45 nódulos por parcela, durante esse processo, amostras compostas de raízes finas também foram coletadas para a avaliação da porcentagem de colonização micorrízica. Os nódulos foram retirados das raízes, lavados em água corrente, seccionados transversalmente e classificados quanto à sua atividade de acordo com a sua coloração interna, em função da presença de leghemoglobina que confere a cor avermelhada. Nódulos avermelhados, com maior proporção de magenta que a cor 0/60/20/0 na escala %ciano/magenta/amarelo/preto foram classificados como ativos, e nódulos com coloração com menores proporções de magenta e maiores proporções de amarelo do que a cor 0/40/40/0 na mesma escala, foram classificados como inativos. Nódulos com cores intermediárias foram descartados para evitar ambiguidade na classificação. Algumas seções de nódulos foram separadas e submetidas a análise de MEV.

Os nódulos selecionados conforme previamente descrito, foram submetidos a aquecimento por 1 hora em KOH (5%), seguido de lavagem em água destilada e imersão em HCl (5%) por 1 hora a temperatura ambiente e, por fim, imersão em fucsina ácida por 1 hora a 90°C. Após esse processo, foram montadas lâminas permanentes com as seções de nódulos para avaliação microscópica. As seções de nódulos foram dispostas em lâminas de microscopia sobre PVLG e esmagadas delicadamente com a lamínula. Portanto, um total de 1200 nódulos coletado das 60 parcelas, foram utilizados na confecção de 240 lâminas sendo 2 lâminas de nódulos ativos e 2 de nódulos inativos representando cada parcela. Após preparadas, as lâminas foram visualizadas em microscópio óptico (Nikon Labophot) para identificação de estruturas fúngicas como hifas, esporos e vesículas, indicativas da colonização superficial. A análise foi realizada em forma de varredura, explorando toda a superfície de todas as seções de nódulos presentes nas lâminas. As lâminas foram fotografadas em microscópio óptico modelo NIKON EFD-3 acoplado à câmera digital Canon A630.

Raízes das plantas foram despigmentadas com KOH (10%), coloridas com Azul Tripan, segundo método de Philips & Hayman (1970) modificado por Koske & Gemma (1989) e a porcentagem de comprimento de raiz colonizada determinada conforme Giovannetti & Mosse (1980).

#### Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o pacote lme4 no R 2.15 (R Development Core Team, 2012). Para número de nódulos colonizados por FMA, foi utilizado modelo linear generalizado com distribuição de Poisson em que o número de nódulos colonizados (variável dependente) foi modelado pela dose de P, dose de formononetina e atividade dos nódulos (variáveis independentes) e suas interações.

Para a colonização micorrízica das raízes um modelo linear generalizado com distribuição binomial foi utilizado, com porcentagem de colonização micorrízica como variável dependente e doses de P e formononetina como variáveis independentes. Devido à superdispersão dos resíduos nesse modelo (106.94 em 56 graus de liberdade) a correção “quasi” foi utilizada. Os modelos foram selecionados pela razão de verossimilhança conforme descrito por Zuur et al. (2009).

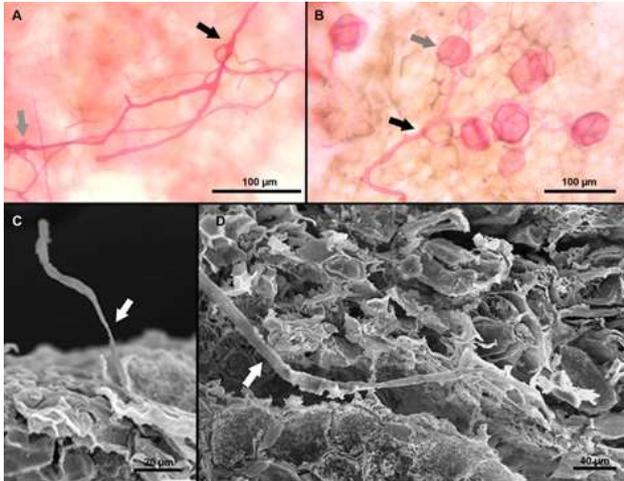
#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A colonização superficial dos nódulos por FMA ocorreu em nódulos ativos e inativos, conforme foi possível observar pela presença de hifas cenocíticas (aseptadas), esporos (exceto para nódulos ativos) e vesículas (**Figura 1**). A existência de aparentes pontos de entrada de hifas na superfície desses nódulos indica uma possível colonização micorrízica interna dos mesmos.

Em relação às estruturas fúngicas encontradas, predominaram hifas e vesículas, tanto em nódulos ativos como em inativos, sendo que para esses últimos esporos também foram visualizados (**Figura 1B**). Não houve diferenciação aparente no formato e tamanho dessas estruturas quanto à atividade do nódulo. Esporos e vesículas estavam presentes em uma quantidade pouco expressiva (menos de 0,1% do total de nódulos analisados, 1200). A esporulação nas raízes foi mais abundante do que nos nódulos, ao contrário do que relatado por Vidal-Dominguez et al. (1994) estudando *Glomus fasciculatum* em *Trifolium repens* e *Medicago Sativa*.

Não foram observados arbúsculos nos nódulos colonizados, embora abundantemente presente nas raízes. Com exceção de Baird e Caruso (1994), que relatam a ocorrência de estruturas similares a arbúsculos degenerados em nódulos de feijão comum, não há outros relatos de ocorrência de arbúsculos nessas estruturas. A amplitude da colonização superficial dos nódulos variou entre 0 e 40%, estando abaixo dos valores relatados por Scheublin et al. (2006), 5 a 74%. Esses autores, entretanto, não encontraram colonização em nódulos ativos, ao passo que em nosso trabalho a maior porcentagem de colonização superficial foi observada nesses nódulos. Todavia, em função do esmagamento dos nódulos para avaliar a taxa de

colonização micorrízica, não foi possível distinguir, em nosso trabalho, hifas externas de internas, embora tenham sido observados pontos de entrada na superfície do nódulo (**Figura 1A**).



**Figura 1-** Imagens de microscopia ótica e de eletromicrografia de varredura de nódulos de *Glycine max* (L.). A) Superfície de nódulo ativo apresentando hifa fúngica (seta preta) e pontos de entradas (seta cinza); B) Superfície de nódulo inativo apresentando hifa fúngica (seta preta), esporo (seta cinza) e vesículas; C) Superfície de nódulo ativo apresentando hifa fúngica (seta branca); D) Corte transversal em nódulo inativo apresentando hifa fúngica (seta branca).

A resposta da colonização micorrízica à formononetina e ao P apresentou tendências similares para raízes e nódulos ativos conforme pode ser observado na (**Figura 2**). Em ambos os casos, houve uma correlação negativa entre o aumento das doses de P e formononetina sobre a colonização micorrízica de raízes e nódulos. Na dose zero de P, a colonização micorrízica aumentou linearmente com o aumento da dose de formononetina para nódulos ativos e para as raízes dentro do intervalo estudado. Mas, em doses altas e intermediárias de P, o efeito positivo da formononetina sobre a colonização de nódulos ativos sofreu uma redução expressiva em relação ao observado na dose zero de P. Tal efeito, em menor grau, foi também verificado para a colonização micorrízica das raízes. Na dose mais alta de P testada ( $120 \text{ Kg ha}^{-1}$ ) o efeito da formononetina foi nulo para colonização micorrízica de nódulos ativos e raízes, com uma tendência de redução da colonização de nódulos inativos com o aumento da dose de formononetina.

O efeito positivo da formononetina sobre a colonização micorrízica de raízes é amplamente relatado (Antunes et al., 2006; Novais & Siqueira, 2009), mas este é o primeiro relato do efeito desse isoflavonoide sobre a colonização de nódulos. Vidal-Domingues et al. (1994) sugere que os FMA são capazes de colonizar diretamente o nódulo, mesmo

quando em raízes não micorrizadas. Assim a formononetina pode atuar estimulando a colonização micorrízica do nódulo de maneira similar à sua ação sobre a raiz. Além disso, o aumento na colonização micorrízica das raízes aumenta a probabilidade de colonização dos nódulos por hifas oriundas das raízes.

Dessa mesma forma, explica-se a similaridade de resposta da colonização micorrízica em relação a doses de P e de formononetina em raízes e nódulos ativos, pois é amplamente relatado que, sob alta disponibilidade de P, a planta regula negativamente a colonização micorrízica das raízes (Siqueira & Colozzi-Filho, 1986; Sheng et al, 2012), mesmo sob aplicação de bioestimulantes (Rodríguez & Gómez, 2011).

A maior colonização superficial observada em nódulos ativos ainda não foi relatada em estudos prévios. A idade do nódulo pode ser uma explicação para esse fenômeno. É provável que os nódulos ativos sejam mais jovens que os inativos e se estabeleceram em raízes previamente colonizadas pelos FMA, aumentando a probabilidade de serem colonizados. Outra possível explicação é que a colonização observada seja apenas superficial, de modo que a superfície do nódulo ativo pode ser mais atrativa para as hifas fúngicas pela presença de compostos nitrogenados oriundos da FBN. Entretanto, dada a escassez de estudos nessa área, nenhuma dessas hipóteses têm suporte na literatura.

### CONCLUSÕES

A colonização superficial de nódulos radiculares em *Glycine max* por FMA não é restrita a nódulos inativos, sendo maior em nódulos ativos.

O aumento nas doses de formononetina aumenta linearmente a colonização de nódulos e raízes de *Glycine max* por FMA, mas seu efeito é reduzido ou anulado, respectivamente, por doses intermediárias e altas de P, ou pela inatividade dos nódulos.

### AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), ao Departamento de Ciência do Solo (DCS), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério de Ciência e Tecnologia (MCT) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

### REFERÊNCIAS

ANTUNES, P.M., RAJCAN, I., GOSS, M.J. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan and soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *Soil biology and Biochemistry*, 38:533–543, 2006.

BAIRD L. M, CARUSO K. J. Development of root nodules in *Phaseolus vulgaris* inoculated with Rhizobium and mycorrhizal fungi. International Journal of Plant Sciences, 155:633–639. 1994.

GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol., 84:482-500, 1980.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. Mycological Research, 92:486-488, 1989.

NAIR, M.G.; SAFIR, G.R.; SIQUEIRA, J.O. Isolation and identification of vesicular-arbuscular mycorrhiza-stimulatory compounds from clover (*Trifolium repens*) roots. Applied and Environmental Microbiology, 57:434-439, 1991.

NOVAIS, C.B.; SIQUEIRA, J.O. Formononetin application on colonization and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi in Brachiaria. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 44, 2009.

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 the British mycological Society, 55:158-161, 1970.

RODRÍGUEZ, N. F., & GÓMEZ, R. Asociación simbiótica entre hongos micorrízicos arbusculares y el sistema radicular de plántulas de cacao (*Theobroma cacao* L.): efecto de la formononetina y la disponibilidad de fósforo en el suelo. Revista Corpoica, 12, 2011.

SCHEUBLIN T.R. & VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize nonfixing root nodules of several legume species. New Phytologist, 172:732-738, 2006.

SHENG, M., LALANDE, R., HAMEL, C. Growth of corn roots and associated arbuscular mycorrhizae are affected by long-term tillage and phosphorus fertilization. Agronomy Journal, 104:1672-1678. 2012.

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, 10:207-211, 1986.

VIDAL-DOMINGUEZ MT, AZCÓN-AGUILAR C, BAREA JM. Preferential sporulation of *Glomus fasciculatum* in the root nodules of herbaceous legumes. Symbiosis 16:65–73. 1994.

ZUUR, A.F., IENO, E.N., WALKER, N.J., SAVELIEV, A.A. & SMITH, G.M. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. 1. ed. New York: Springer, 2009. 553p.

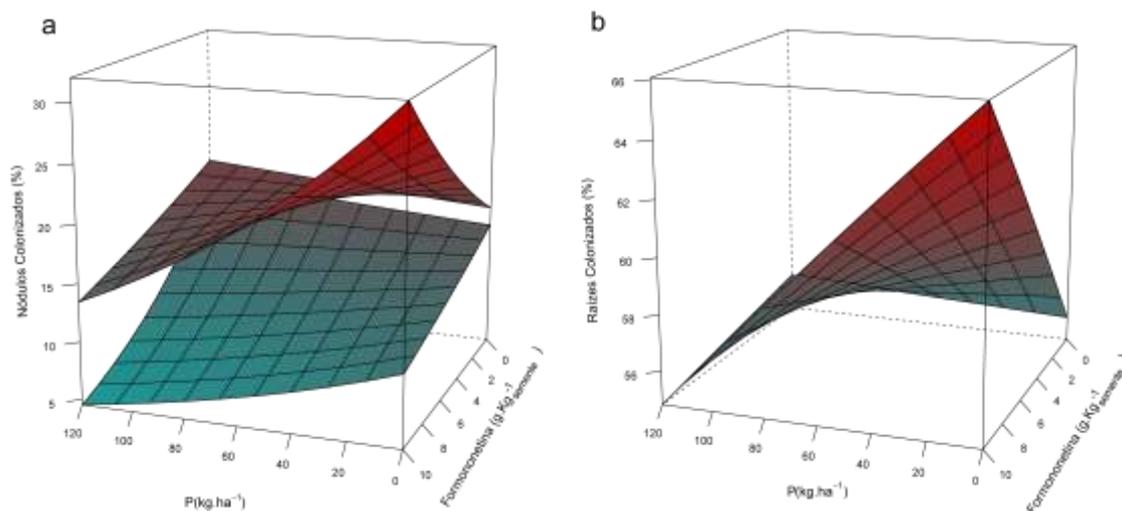


FIGURA 2 - a) Colonização micorrízica de nódulos de *Glycine max* (L.) ativos (superfície superior) e não ativos (superfície inferior) sob doses de P e formononetina; b) Colonização micorrízica das raízes sob doses de P e formononetina.