



José Renato Pereira Cavallazzi

**Seleção de fungos micorrízicos arbusculares (FMA)
para mudas de macieiras micropropagadas
adaptadas a solos ácidos**

CONSULTA LOCAL

Florlanópolis

2000

José Renato Pereira Cavaliazzi

**Seleção de fungos micorrízicos arbusculares (FMA)
para mudas de macieiras micropropagadas
adaptadas a solos ácidos**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
visando à obtenção de grau de Mestre
em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Margarida Matos
de Mendonça

Co-orientador: Dr. Sidney Luiz Stürmer

Florianópolis

2000

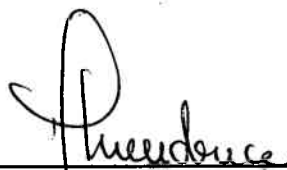
**"SELEÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)
PARA MUDAS DE MACIEIRAS MICROPROPAGADAS
ADAPTADAS A SOLOS ÁCIDOS"**

POR

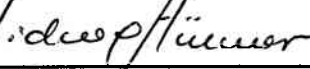
JOSÉ RENATO PEREIRA CAVALLAZZI

**Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final, pelo Orientador e membros
da Comissão Examinadora.**

Comissão Examinadora:



**Prof. Dra. Margarida Matos de Mendonça
Orientadora - MIP/CCB/UFSC**



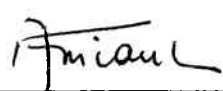
**Dr. Sidney Luiz Stürmer
Co-orientador - MIP/CNPq-Recém Doutor**



**Prof. Dr. Paulo Emilio Dovato
ENR/CCA/UFSC**



**Prof. Dr. Ênio Luiz Pedrotti
FIT/CCA/UFSC**



**Prof. Dra. Ana Maria Viana - BOT/CCB/UFSC
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSC**

Florianópolis, fevereiro de 2000

AGRADECIMENTOS

À professora Margarida Matos de Mendonça, minha orientadora, cujos valiosos ensinamentos transmitidos, o criticismo, a paciência, a dedicação e o apoio foram fundamentais para a transposição desta etapa de minha vida.

À minha família, pelo estímulo e suporte constantes.

À Cheien, pelo constante apoio durante esses dois anos de curso.

Aos professores Alexandre Verzani Nogueira, Paulo Emílio Lovato e Maurício Sedrez dos Reis, pelo auxílio e importantes contribuições a este trabalho.

Ao professor Ênio Luiz Pedrotti e ao agrônomo Afonso Voltolini, do Laboratório de Morfogênese Vegetal, pela produção das plantas de macieiras micropropagadas utilizadas no trabalho.

Ao Dr. Sidney Luiz Stürmer, pelos conselhos e tempo dispensados, que ajudaram a tornar este trabalho melhor.

Ao João Santana, secretário do curso, pela dedicação e auxílio a nós, alunos.

Aos colegas Frederico e Maria Alice, pela amizade e companheirismo.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

A todos aqui não mencionados que, de algum modo, tenham tomado parte na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO.....	vii
SUMMARY	viii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica.....	6
Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA).....	7
Eficiência dos FMA em solos ácidos.....	10
Benefícios dos FMA para as plantas micropropagadas	14
Seleção de FMA.....	17
Referências Bibliográficas	23
CAPÍTULO 2 – Seleção de FMA eficientes para macieiras micropropagadas e transplantadas para solos ácidos esterilizados.....	29
Introdução	30
Material e Métodos	35
1. Características do local e amostragem do solo	35
2. Seleção de pomares com populações infectivas	37
3. Recuperação de espécies de FMA presentes no solo do pomar selecionado	37
3.1. Caracterização taxonômica das espécies recuperadas diretamente do solo e após culturas-armadilha	37
3.2. Estabelecimento das culturas de isolados de FMA.....	39
4. Eficiência dos isolados de FMA em solos ácidos e esterilizados	40
5. Análises estatísticas	44
Resultados	45
1. Potencial de inóculo das populações de FMA	45
2. Caracterização taxonômica das espécies de FMA	45
3. Culturas de isolados de FMA.....	50
4. Eficiência dos isolados de FMA em substratos ácidos.....	50
4.1. Colonização radicular	50
4.2. Parâmetros de crescimento.....	52
4.3. Concentração de minerais.....	52

4.3.1. Parâmetros com interação significativa.....	52
4.3.2. Parâmetros com interação não significativa.....	55
Discussão.....	68
Referências Bibliográficas.....	83
CAPÍTULO 3 – Seleção de FMA eficientes para macieiras micropropagadas e transplantadas para solos de pomar não esterilizados.....	88
Introdução.....	89
Material e Métodos.....	93
1. Coleta do solo e preparo do substrato.....	93
2. Procedimento experimental.....	93
3. Análises estatísticas.....	95
Resultados.....	97
Discussão.....	107
Referências Bibliográficas.....	115
CONCLUSÕES.....	118

RESUMO

O estado de Santa Catarina é o maior produtor nacional de maçã. Os solos das regiões produtoras são álicos, exigindo um aporte de fertilizantes e corretivos, o que eleva consideravelmente os custos de implantação dos pomares. Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), por sua vez, podem auxiliar no estabelecimento das plantas de macieira em tais condições adversas, pois esses fungos são simbiotes e estimulam o crescimento e a absorção de nutrientes pelas plantas, principalmente em solos distróficos. Dois experimentos foram estabelecidos objetivando selecionar isolados de FMA eficientes no estímulo ao crescimento de plantas em solos ácidos, e competitivos em relação à microbiota nativa de FMA de pomares de macieiras. Primeiramente foram coletadas amostras de solos de pomares de macieira em Caçador (CA1 e CA2), Fraiburgo (FR1 e FR2) e São Joaquim (SJ1 e SJ2). Essas amostras foram utilizadas no estabelecimento de um bioensaio com plantas de milho para a seleção da população de FMA com a maior infectividade e capacidade de colonização. As plantas cultivadas em solo do pomar CA1 apresentaram 37% de colonização radicular, e essa comunidade micorrízica foi selecionada para experimentos subsequentes. A comunidade foi caracterizada após recuperação de esporos do solo nativo e após cultura-armadilha. Foram identificadas 11 espécies de FMA, e com os esporos recuperados foram estabelecidas culturas de isolados, visando à obtenção de culturas puras para utilização nos experimentos. Após quatro meses, apenas os isolados *Glomus etunicatum* (GE), *Scutellospora pellucida* (SP), *Scutellospora heterogama* (SH) e *Acaulospora scrobiculata* (AS) produziram micorrizas, e foram utilizados nos dois experimentos subsequentes. No primeiro experimento, plantas de macieiras micropropagadas da espécie *Malus prunifolia*, porta-enxerto Marubakaido, foram cultivadas em substratos com três níveis de pH (4,0, 5,0, e 6,0) e inoculadas com cada um dos isolados. Ao final de 70 dias, as plantas inoculadas com GE e SP estavam 136 e 142% mais altas do que as plantas não inoculadas, respectivamente. Essas plantas também apresentaram uma menor concentração de Al nos substratos com pH 5,0 e 6,0. Conseqüentemente, os isolados GE e SP foram selecionados para o experimento seguinte, no qual foram utilizados solos de pomar de macieira não esterilizado e esterilizado. A maioria das plantas inoculadas neste experimento, ao final de 84 dias, havia crescido mais e produzido mais biomassa da parte aérea do que as plantas não inoculadas. As plantas inoculadas cultivadas em solo esterilizado apresentaram a maior concentração de P, com exceção das plantas inoculadas com 30g de GE e com inóculo misto (GE+SP). De maneira geral, o inóculo misto foi tão ou mais eficiente no estímulo ao crescimento e na concentração de nutrientes do que os outros tratamentos em solo não esterilizado. Os resultados indicam que SP foi mais adequado à inoculação de plantas de macieira micropropagadas com o fim de melhorar a sua adaptação a solos ácidos tanto em condições rotineiras de sistemas de micropropagação (substratos esterilizados) quanto em condições definitivas de pomar, ou seja, em substratos não esterilizados. Já o inóculo misto foi eficiente em condições de substrato não esterilizado.

SUMMARY

The state of Santa Catarina is the largest national producer of apples. Soils from orchard regions include high levels of aluminum and require large inputs of fertilizers and liming which increase considerably the costs of apple production. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) may help the establishment of apple plants in such adverse conditions, as these fungi are symbionts that stimulate the growth and nutrient uptake by plants, especially in low-nutrient soils. Two experiments were established aiming to select AMF isolates effective to stimulate plant growth in acidic soils that are competitive towards the indigenous microbial community of AMF in apple orchards. Soil samples were collected from apple orchards in Caçador (CA1 and CA2), Fraiburgo (FR1 and FR2) and São Joaquim (SJ1 and SJ2). Soil samples were used to establish a corn bioassay to select AMF populations with highest infectivity and root colonization capacity. Plants growing in CA1 orchard soil had 37% of root colonization and this mycorrhizal community was selected for subsequent experiments. Taxonomic characterization of this community was performed after spore recovery from field soil and trap-culture. Eleven AMF species were identified and spores recovered from trap cultures were used to establish isolate cultures to obtain pure culture of AMF to be used in the experiments. Four months later, only the isolates *Glomus etunicatum* (GE), *Scutellospora pellucida* (SP), *Scutellospora heterogama* (SH) and *Acaulospora scrobiculata* (AS) formed mycorrhiza and were used in the two subsequent experiments. In the first experiment, Marubakaido micropropagated apple (*Malus prunifolia*) plants were cultivated in a substrate with three pH levels (4,0, 5,0 and 6,0) and inoculated with each isolate. After 70 days, plants inoculated with GE and SP produced 136% and 142% more biomass than non-inoculated plants, respectively. These plants also had the lowest content of Al when cultured in the substrates with pH 5,0 and 6,0. Consequently, the isolates GE and SP were selected for the next experiment where sterilized and non-sterilized apple orchard soils were used. In the experiment, the majority of inoculated plants were higher and produced highest shoot biomass than non-inoculated plants. After 84 days, inoculated plants grown in the sterilized soil had the highest P concentration, except plants inoculated with 30g of GE and the mixed inoculum (GE+SP) in non-sterilized soil. In general, the mixed inoculum was as effective as, or more, than other treatments in stimulating growth and in concentrating nutrient in non-sterilized soil. Results indicate that the isolate SP was the most adequate to inoculate micropropagated apple plants in order to ameliorate plant adaptation to acid soils either in conventional situations of micropropagation systems (sterilized substrate) or in field situations in orchards (non-sterilized substrate). The mixed inoculum was effective on non-sterilized substrate conditions.

INTRODUÇÃO

Santa Catarina é um dos seis estados com maior produção de alimentos do país. A maçã, de cuja a produção nacional o estado é líder, destaca-se, dentre seus principais produtos, e responde por cerca de 50% da produção total. Até a década de 70, o custo das importações de maçã só era superado por dois outros produtos, o trigo e o petróleo. Naquela década, a área cultivada e a produção aumentaram de forma significativa (Figura 1) devido a incentivos governamentais, fato que levou o país a auto-suficiência em 1990. Atualmente, a produção brasileira anual é de cerca de 707 mil toneladas, sendo a produção catarinense responsável por 372 mil toneladas. O setor projetou para o ano de 1999 a exportação de 55 mil toneladas (ICEPA/SC, 1999).

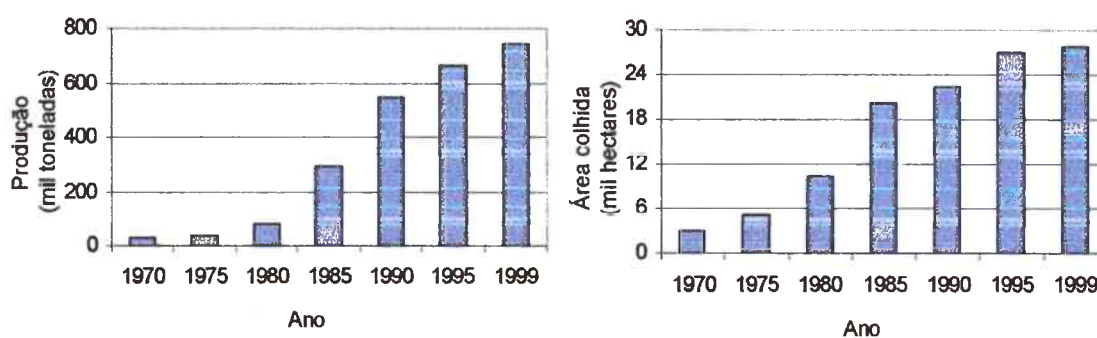


Figura 1. Evolução da cultura da macieira no Brasil

FONTE: ICEPA (1999) e FAO (1999)

Dois aspectos, entretanto, são ainda problemáticos, no desenvolvimento da cultura. O primeiro se refere à elevada incidência de viroses nos pomares estabelecidos a partir de mudas sem qualidade sanitária. Este problema ocorreu principalmente na fase de expansão da cultura quando a demanda por mudas superava a produção. As mudas de macieira, quando produzidas sem critérios sanitários, levam à redução da produtividade dos pomares e

freqüentemente há necessidade de erradicação ou substituição de plantas. O segundo problema refere-se às características edáficas das regiões produtoras em Santa Catarina, cujos solos são naturalmente ácidos e com altos níveis de alumínio. Essas condições são adversas ao crescimento das plantas, o que exige um significativo aporte de corretivos e fertilizantes para o estabelecimento da cultura. Esta necessidade de investimentos torna a maçã um dos produtos agrícolas de mais alto custo de produção no estado, sendo a sua rentabilidade possível apenas devido à alta produtividade da cultura.

Diversas estratégias podem ser utilizadas na produção de plantas de qualidade sanitária e adaptadas a estresses edáficos. A micropropagação, por exemplo, é uma técnica que visa à produção de plantas *in vitro* a partir de microestacas. Esta técnica permite a produção de um clone de macieira em curto prazo de tempo e com menor custo quando comparada à técnica de propagação tradicional. Além disso, a partir de uma planta matriz sadia podem ser produzidos clones livres de doenças, evitando-se os riscos de propagação de diversos problemas sanitários, principalmente as viroses.

Por outro lado, as plântulas produzidas por técnicas de micropropagação podem ter pouca eficiência na absorção de nutrientes do solo e, freqüentemente, apresentam problemas nas fases aclimatização e no transplântio. As condições axênicas e o cultivo em meios especiais usados na produção das plantas micropropagadas não permitem o estabelecimento da associação entre plantas e microrganismos benéficos, fato que prejudica a nutrição e, conseqüentemente, o crescimento das plantas.

Entre os microrganismos simbiontes presentes nos solos que beneficiam o crescimento vegetal, destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares

(FMA). Os FMA residem na rizosfera da maioria das plantas e nos diversos tipos de solos, se associando às raízes e formando as micorrizas arbusculares. As micorrizas arbusculares podem trazer benefícios de vários tipos às plantas, desde os de natureza nutricional até a tolerância a condições de estresses causados por fatores abióticos e bióticos. A maior eficiência na absorção de P e de outros elementos minerais por plantas com micorrizas, em relação às plantas sem micorrizas, tem sido o atributo da simbiose mais amplamente focado na literatura. Mais recentemente, entretanto, os FMA vêm sendo retratados como simbioses com papel multifuncional, destacando-se benefícios adicionais aos nutricionais para o hospedeiro, tais como a melhoria nas relações hídricas, proteção contra metais pesados, contra patógenos e herbívoros. A inoculação de plantas de macieira micropropagadas com FMA selecionados pode ser uma estratégia interessante para permitir a adaptação das plantas a condições de estresses diversos tanto de natureza abiótica, tal como baixo pH, como de natureza biótica, tal como a tolerância a interações competitivas, de hiperparasitismo, dentre outros, por parte da microbiota do solo.

Os FMA dispõem de uma baixa especificidade molecular, associando-se com mais de dois terços das espécies das plantas. Por outro lado a sua especificidade ecológica é marcante, sendo sua eficiência dependente da espécie ou ecotipo. Dessa forma, previamente ao estabelecimento de programas de inoculação de FMA, é importante a seleção de espécies ou isolados eficientes para a espécie vegetal em questão e para as condições ambientais relevantes. Dentre os FMA a serem selecionados, tanto podem ser utilizadas espécies nativas como exóticas. As espécies nativas, no entanto,

caso tenham os atributos requeridos, devem ser preferidas, pelo fato de serem naturalmente adaptadas às condições ambientais. Para além de sua eficiência, ou seja, capacidade de promover o crescimento da planta, a espécie ou isolado deve ser competitiva, isto é, deve ter capacidade de competir com os demais componentes da microbiota rizosférica para que ocorra a colonização do hospedeiro.

O presente trabalho enquadra-se em um projeto mais amplo intitulado "Seleção de clones de porta-enxertos de macieira e de fungos micorrízicos arbusculares tolerante a condições edáficas prevalentes em solos ácidos da região sul – Santa Catarina". Este projeto de pesquisa e desenvolvimento tem como objetivo principal a seleção de clones de porta-enxerto de macieira e de espécies de FMA tolerantes às condições de baixo pH e altos níveis de Al. Em termos de desenvolvimento, o projeto visa à obtenção, por seleção, de material vegetal tolerante a estresses prevalentes em solos ácidos e também à obtenção de mudas micropropagadas de macieira colonizadas por FMA com eficiência para condições de solos ácidos das regiões de Santa Catarina.

O objetivo deste trabalho foi selecionar isolados de fungos micorrízicos arbusculares eficientes na promoção do crescimento de plantas micropropagadas de macieira. Para tal, foram inicialmente realizados estudos das populações de FMA presentes em solos de seis pomares de macieiras visando avaliar a sua infectividade. Culturas-armadilha foram estabelecidas com o solo do pomar que apresentou as populações mais infectivas e assim os esporos obtidos dessas culturas foram utilizados para estabelecer culturas de cada isolado. Os isolados fúngicos foram subsequentemente avaliados em dois experimentos. O primeiro experimento teve como objetivo selecionar isolados

de FMA eficientes para macieiras em solos ácidos. Para isso, macieiras micropropagadas foram inoculadas com 4 isolados fúngicos e cultivadas em vasos com substratos ajustados a 3 níveis de pH (Capítulo 2). Ao final do experimento, foram avaliados parâmetros morfológicos (altura e biomassa) e nutricionais e os dois isolados mais eficientes foram utilizados no experimento seguinte. O objetivo do segundo experimento foi avaliar a competitividade dos dois isolados de FMA em relação à população nativa de fungos micorrízicos de um pomar de macieira, tendo-se utilizado para esta finalidade, um solo não esterilizado (Capítulo 3). Dessa forma, o processo de seleção de FMA envolveu duas etapas que foram, a primeira, em solo esterilizado, situação rotineira do processo de produção de mudas micropropagadas. A segunda etapa, em solo não esterilizado, simulou as condições da muda micropropagada e colonizada transplantada para o pomar.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA)

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) associam-se às raízes das plantas formando as micorrizas arbusculares. Entre os vários tipos de associações micorrízicas, a micorriza arbuscular é a mais freqüente na natureza, ocorrendo em mais de 80% das espécies vegetais (TRAPPE, 1987; BRUNDRETT, 1991). Os fungos simbiotes pertencem à classe dos Zigomicetos, ordem Glomales, abrangendo cerca de 150 espécies divididas em três famílias: Glomaceae, Acaulosporaceae e Gigasporaceae (MORTON & BENNY, 1990). Resultados de estudos morfológicos e moleculares permitem estimar que a origem desses fungos tenha coincidido com o aparecimento das primeiras plantas terrestres, há 415 milhões de anos, na Era Paleozóica (MORTON, 1990; SIMON et al. 1993), e suportam a hipótese de que os FMA teriam sido de crucial importância para a colonização da terra pelas plantas vasculares (PIROZYNSKI & MALLOCH, 1975).

Os FMA são microrganismos biotróficos obrigatórios, porque não completam seu ciclo de vida na ausência de uma planta hospedeira (SMITH & READ, 1997). Embora seus esporos germinem em meio de cultura *in vitro*, na ausência de um hospedeiro, o crescimento do tubo germinativo cessa, após atingir alguns centímetros (SMITH & GIANINAZZI-PEARSON, 1988). Na presença de um hospedeiro, por outro lado, são desencadeados eventos de reconhecimento em ambos os simbiotes, resultando na colonização do córtex radicular da planta hospedeira pelo micobionte (GIANINAZZI-PEARSON, 1986; GIOVANNETTI, SBRANA, LOGI, 1994). Após a colonização, o micélio vegetativo desses fungos se diferencia em arbúsculos, esporos, vesículas, células auxiliares e hifas intra e extra-radulares. Os arbúsculos são estruturas

ramificadas que funcionam como interface para as trocas nutricionais entre os simbiontes. Sua formação cria uma ampla área de contato entre os simbiontes devido à proliferação da membrana plasmática das células do hospedeiro em torno das hifas do fungo (SMITH & GIANINAZZI-PEARSON, 1988). As vesículas, formadas somente pelas espécies da subordem Glomineae, são estruturas geralmente globosas e preenchidas por grânulos de glicogênio e de lipídios, sendo consideradas estruturas de armazenamento de reservas (BONFANTE-FASOLO, 1984; BRUNDRETT, 1991). Outro tipo de estrutura, as células auxiliares, é formada apenas por organismos da subordem Gigasporineae. Sua função não foi, porém, completamente definida (MORTON & BENTIVENGA, 1994). As hifas intra e extra-radiculares são importantes para a aquisição e transporte de nutrientes e para o início da colonização radicular (FRIESE & ALLEN, 1991). Os FMA se reproduzem por meio de esporos assexuados, que atuam como propágulos para sua disseminação e são a base para a identificação das espécies (MORTON, 1988; BRUNDRETT & ABBOTT, 1995).

As plantas associadas aos FMA têm uma maior capacidade de absorção de elementos minerais, sendo o fósforo (P) o nutriente mais freqüentemente estudado (NEWSHAM, FITTER, WATKINSON, 1995b). O fósforo é um dos elementos mais limitantes ao crescimento das plantas devido à sua baixa mobilidade e concentração nos solos, especialmente em regiões tropicais. A absorção do fósforo pela planta diminui sua concentração no solo próximo às raízes, formando uma zona de depleção, onde a concentração deste elemento é menor em relação ao restante do solo (KOSKE & POLSON, 1984; BOLAN, 1991). Esta zona é formada devido à baixa mobilidade deste elemento na

solução do solo. O micélio extra-radicular pode explorar o solo além dessa zona de depleção, permitindo a absorção principalmente de fósforo, zinco e cobre, e translocando estes elementos para o hospedeiro (JONER et al., 1995; MARSCHNER, 1998). Segundo TARAFDAR e MARSCHNER (1994), a associação também pode tornar disponível para a planta o fósforo existente em compostos orgânicos (P_o), através da hidrólise, pela ação de fosfatases produzidas pelo fungo. A associação pode ainda propiciar uma maior absorção de outros elementos, como o cálcio e o magnésio (BORIE & RUBIO, 1999), o nitrogênio (AZCÓN & BAREA, 1992), e o potássio (GEDDEDA, TRAPPE, STEBBINS, 1984), entre outros.

Segundo NEWSHAM et al. (1995b), as micorrizas arbusculares têm papel multifuncional porque elas conferem outros benefícios além do nutricional, embora este último seja o aspecto mais evidenciado na pesquisa. O aumento na absorção de elementos minerais, isoladamente, não permite, entretanto, explicar a ampla ocorrência dos FMA associados às raízes de diversas espécies vegetais. Em regiões tropicais, onde os solos são extremamente pobres em P, tais benefícios são facilmente comprovados. Por outro lado, esta situação não ocorre em solos relativamente mais férteis, como os das regiões temperadas, tendo os fungos outros papéis tais como a proteção contra níveis tóxicos de metais ou agentes patogênicos, dentre outros.

Na bibliografia consultada, vários trabalhos foram realizados demonstrando esse caráter multifuncional dos FMA. Em solos com elevados níveis de metais pesados, por exemplo, a colonização de raízes por FMA pode aumentar significativamente a produção de biomassa vegetal e exercer um efeito protetor pela diminuição da concentração de metais como Fe, Mn, Zn e

Cd na parte aérea das plantas inoculadas (EL-KHERBAWY et al., 1989). Os FMA podem também atuar como agentes de controle biológico, protegendo o hospedeiro contra os efeitos deletérios de microrganismos patogênicos, como *Phytophthora* sp. (CORDIER, GIANINAZZI, GIANINAZZI-PEARSON, 1996; POZO et al., 1999) e nematóides (COOPER & GRANDISON, 1986) dentre outros. As micorrizas arbusculares melhoram as relações hídricas, permitindo a captação de água para o hospedeiro de uma forma mais eficiente que uma raiz não colonizada, mesmo em condições de seca extrema (BETHLENFALVAY et al., 1988; RUIZ-LOZANO & AZCÓN, 1995). A colonização com FMA também afeta positivamente a reprodução das plantas, reduzindo o tempo para o florescimento, melhorando a produção de flores e a frutificação e aumentando o número de sementes por fruto, entre outros aspectos (LU & KOIDE, 1994; SHUMWAY & KOIDE, 1994). Esses benefícios advindos da simbiose micorrízica podem explicar a sua ubiquidade e a ocorrência freqüente dos fungos na maioria dos ecossistemas vegetais (NEWSHAM et al., 1995).

Eficiência dos FMA em solos ácidos

Os solos ácidos compreendem 40% das terras aráveis do planeta, sendo encontrados, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais (KOCHIAN, 1995). A menor fertilidade de solos sujeitos a condições ácidas é o maior fator limitante da produtividade vegetal nos trópicos (SOEDARJO & HABTE, 1993). Além dos solos naturalmente ácidos, existem ainda os solos acidificados por ação antrópica, ambos adversos ao desenvolvimento das espécies vegetais nativas (KIELISZEWSKA-ROKICKA et al., 1998; VOSATKA & DODD, 1998). Segundo MARSCHNER (1991), o baixo pH do solo provoca um aumento na concentração de íons potencialmente tóxicos, como H^+ , Al^{+3} e Mn^{+2} , enquanto a

concentração de nutrientes como Mg, Ca e K e a solubilidade de P e Mo diminuem. As plantas dispõem de vários mecanismos para atenuar os efeitos prejudiciais ao seu crescimento, resultantes das condições adversas existentes em solos ácidos. Esses mecanismos incluem a baixa demanda por nutrientes minerais, a compartimentalização e a recirculação de nutrientes, o aumento na capacidade de absorção de elementos minerais e a tolerância a elementos minerais tóxicos, entre outros (KOCHIAN, 1995). O estabelecimento da simbiose micorrízica com os FMA constitui-se num destes mecanismos (MARSCHNER, 1991).

Vários estudos têm demonstrado que os FMA podem ser eficientes em condições de solos ácidos. Segundo ABBOTT & ROBSON (1981), a eficiência dos FMA é a propriedade desses fungos de estimular o crescimento de uma espécie vegetal mesmo em condições de solos distróficos. RAJU et al. (1988), por exemplo, demonstraram que um isolado de *Glomus deserticola* aumentou significativamente a produção de matéria seca e proporcionou uma maior e mais eficiente absorção de elementos minerais em plantas de sorgo cultivadas em solo com pH 4,1. A inoculação de isolados eficientes de FMA em plantas cultivadas em solos ácidos pode ainda exercer um efeito protetor contra a absorção de elementos potencialmente fitotóxicos. Plantas de trevo inoculadas com combinações de cinco espécies de *Glomus* e cultivadas em solos ácidos apresentaram, em comparação com plantas não inoculadas, 55% e 80% menos Mn^{+2} na parte aérea e na raiz, respectivamente (ARINES, VILARIÑO, SAINZ, 1989). BORIE & RUBIO (1999) observaram que, para plantas de cevada cultivadas em solo ácido (pH 4,6) e com altos níveis de Al^{+3} , inoculação com FMA foi mais eficiente do que o tratamento do solo com $CaCO_3$. Nesse

mesmo estudo, as plantas com micorrizas apresentaram uma maior concentração de P, Ca e Mg, ao mesmo tempo em que as razões Al/P, Al/Ca e Al/Mg diminuíram, reduzindo os problemas de fitotoxicidade. Segundo MARSCHNER (1991), estes benefícios podem ser justificados pelo aumento no volume do solo explorado pelo micélio, e por uma maior eficiência dos FMA na absorção e translocação de nutrientes para as raízes do hospedeiro. Este mecanismo pode compensar a ineficiência do sistema radicular do hospedeiro, cujo crescimento pode ser prejudicado por condições químicas desfavoráveis, como altas concentrações de Al^{+3} na solução do solo.

Em determinadas condições, no entanto, plantas com micorrizas podem ter seu crescimento reduzido ou mesmo suprimido em solos ácidos. Por exemplo, quando fatores como acidez do solo e alta concentração de metais pesados estão combinados, pode haver uma maior absorção desses elementos tóxicos pelas plantas com micorrizas, o que pode ser prejudicial para o crescimento (KILLHAM & FIRESTONE, 1983). Em outras situações, as populações de FMA podem não estar adaptadas às características químicas dos solos, impedindo que ocorra um estímulo no crescimento vegetal. SIEVERDING & HOWELER (1985) observaram que aplicações de P em solos ácidos diminuíram a colonização radicular em mandioca por FMA e em alguns casos houve redução na produção de biomassa, indicando que as populações existentes naqueles solos não estavam adaptados àqueles níveis de fertilização. Os autores concluíram que a composição da população nativa de FMA determinou o nível de resposta à aplicação de P.

Em solos ácidos não esterilizados, e, portanto, incluindo populações indígenas de FMA, a inoculação desses fungos também pode estimular o

crescimento das plantas. MOSSE (1977) inoculou *Glomus fasciculatum* em *Zea mays* e *Stylosanthes guyanensis* em 12 solos não esterilizados, objetivando avaliar os efeitos da inoculação no crescimento, nodulação, fixação e utilização de fosfato de rocha pelos hospedeiros. O isolado fúngico estabeleceu-se nos solos e influenciou o crescimento e a nutrição das duas espécies vegetais. Em plantas de *Stylosanthes*, a inoculação estimulou o crescimento, aumentou a absorção de P, a nodulação por *Rhizobium* sp. e conseqüentemente a fixação de nitrogênio. Por outro lado, em plantas de milho, os efeitos foram similares, aumentando o crescimento e a absorção de P.

KITT, HETRICK e WILSON (1988) avaliaram o efeito da inoculação de *Andropogon gerardii* com *Glomus etunicatum* em 15 tipos de solo, esterilizados ou não. A resposta das plantas cultivadas em solos não esterilizados à inoculação com *Glomus etunicatum* variou conforme a fertilidade do solo, mostrando-se dependente deste fator. AMES et al. (1991) inocularam *Glomus pallidum*, *Glomus aggregatum* e *Sclerocystis microcarpa* juntamente com dois isolados de *Rhizobium* em plantas de *Vigna unguiculata* em solos não esterilizados. A inoculação com os isolados de FMA aumentou a produção de matéria seca da parte aérea, bem como a concentração de P e N no tecido vegetal. Os autores concluíram que isolados fúngicos podem influenciar a eficiência de isolados de *Rhizobium* e que a seleção de fungos micorrízicos eficientes deveria ser feita a partir de experimentos com solos não esterilizados.

Há casos em que a inoculação de espécies vegetais com isolados de FMA em solos não esterilizados não beneficia o hospedeiro em termos de produção de biomassa (HETRICK, KITT, WILSON, 1986). Essa ocasional

supressão do crescimento de plantas inoculadas com FMA em solos não esterilizados geralmente é causada pela competição por nutrientes com outros microrganismos do solo (HETRICK et al., 1986; KITT et al., 1988). As respostas das plantas cultivadas, em solos não esterilizados, à inoculação de isolados de FMA, no entanto, tendem a ser menores do que em solos esterilizados ou em solos cujas camadas superiores tenham sido removidas (MOSSE, 1977).

Benefícios dos FMA para as plantas micropropagadas

A micropropagação vegetativa *in vitro*, ou micropropagação, é uma técnica de propagação de plantas, importante na produção em massa (HOOKER et al., 1994), constituindo-se em uma ferramenta eficiente para a propagação de diversas espécies vegetais (PUTHUR et al., 1998; SUBHAN, SHARMILA, SARADHI, 1998). Através dessa técnica, é possível a propagação de material vegetal isento de doenças, e a diminuição do tempo de propagação vegetativa em comparação com os métodos tradicionais.

Os procedimentos para a micropropagação das espécies são variáveis, pois cada espécie tem suas peculiaridades, e modificações são geralmente necessárias para cada caso. No entanto, os procedimentos contemplam algumas etapas comuns, como a seleção de explantes, a cultura em meio nutritivo em condições assépticas, a multiplicação dos propágulos em meio apropriado e o enraizamento das partes aéreas produzidas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1991). O desenvolvimento de meios de cultura e condições ambientais para o crescimento dos tecidos vegetais *in vitro* permitiu a propagação de um número importante de espécies por meio desta técnica. Através da micropropagação foram produzidas, apenas na Europa, 200

milhões de plantas, entre ornamentais, frutíferas e florestais (LOVATO et al., 1996).

As técnicas assépticas e os substratos estéreis utilizados nos sistemas de micropropagação, e a esterilização dos substratos utilizados nos estádios *post vitro*, impedem que as plantas formem associações com microrganismos simbiotes (HOOKER et al., 1994; RAPPARINI et al., 1994). Por este motivo, as plantas micropropagadas podem apresentar dificuldades na absorção de água e nutrientes, resultando em baixas taxas de sobrevivência e problemas no desenvolvimento das mudas (AZCÓN-AGUILAR et al., 1992). Diversos trabalhos demonstraram que a inoculação com FMA, na fase *post vitro*, pode beneficiar plantas micropropagadas na superação das condições adversas. Na bibliografia consultada, tem sido demonstrado que a inoculação com FMA aumenta a sobrevivência e a produção de biomassa em várias espécies de frutíferas, como ameixeira (FORTUNA et al., 1992), abacateiro (AZCÓN-AGUILAR et al., 1992), plantas de kiwi (SCHUBERT, BODRINO, GRIBAUDO, 1992), morangueiro (WILLIAMS et al., 1992), videira (SCHUBERT et al., 1990) e abacaxizeiro (LOVATO et al., 1992), entre outras. Estes benefícios advindos da inoculação de plantas micropropagadas com fungos micorrízicos arbusculares possibilitam a diminuição do ciclo de produção, com conseqüente redução na adição de fertilizantes e de pesticidas (HOOKER et al., 1994).

A macieira é uma das fruteiras que estabelece associação simbiótica com os FMA. TRAPPE et al. (1973) foram os primeiros pesquisadores a investigar a colonização radicular por FMA em plantas de macieiras cultivadas em solos contaminados com altos níveis de arsênico. A porcentagem de colonização radicular nas macieiras cultivadas em solos não contaminados variou entre 5 e

10%, enquanto que em solos contaminados com arsênico a colonização atingiu valores menores que 1%. Segundo os autores, essa relativa baixa colonização radicular foi relacionada com o menor crescimento das macieiras nestes solos. MILLER et al. (1985a) examinaram amostras de solo rizosférico de macieiras e recuperaram esporos após coleta direta e cultura-armadilha. Foram identificadas 43 espécies de FMA associadas à macieira. Os autores concluíram que a inoculação de plantas de macieira em viveiros constituiu em uma técnica adequada para a introdução de isolados eficientes na cultura.

Alguns estudos foram realizados para a avaliação da dependência micorrízica das plantas de macieira. PLENCHETTE, FURLAN e FORTIN (1981) demonstraram que a inoculação de macieiras com um isolado não identificado de FMA promoveu o desenvolvimento da planta após o transplântio. As plantas previamente inoculadas produziram maior quantidade de biomassa e apresentaram um crescimento mais uniforme, mesmo em condições de solo não esterilizado, em comparação com plantas não inoculadas. GEDDEDA, TRAPPE e STEBBINS (1983) inocularam *Glomus mosseae*, *G. fasciculatum* e *Gigaspora margarita* em macieiras cultivadas em dois tipos de solos. A inoculação resultou em um aumento de mais de 700% na altura de plantas, 1200% no peso de matéria fresca e 1100% no peso de matéria seca quando comparado aos tratamentos não inoculados. Similarmente, GEDDEDA, TRAPPE e STEBBINS (1984) observaram que, comparativamente com plantas não inoculadas, as macieiras associadas a isolados nativos de FMA aumentaram em mais de 1200% a produção de biomassa. MILLER et al. (1985b) observaram que macieiras inoculadas com seis isolados de *Glomus* e um de *Gigaspora* produziram plantas mais altas, com maior peso de parte

aérea e com maiores concentrações de P em comparação às plântulas não inoculadas. Esses resultados indicam que a macieira é uma planta extremamente dependente da associação micorrízica.

A associação com FMA também pode ser benéfica para o estabelecimento e crescimento de plântulas de macieiras micropropagadas. GRANGER, PLENCHETTE e FORTIN (1983) inocularam *Glomus epigaeum* em dois porta-enxertos de macieiras micropropagadas e constataram que a inoculação estimulou o crescimento e a absorção de elementos minerais. Os autores sugeriram que a inoculação de FMA poderia ser utilizada na produção de macieiras propagadas *in vitro*, com a finalidade de produzir plantas mais vigorosas. BRANZANTI, GIANINAZZI-PEARSON e GIANINAZZI (1992) inocularam, em dois porta-enxertos e uma cultivar de macieira, os três isolados de FMA, *Glomus mosseae*, *G. intraradices* e *G. fasciculatum*. As plantas colonizadas pelos fungos produziram maior quantidade de biomassa e apresentaram maior uniformidade em relação à altura, quando comparadas com plantas não inoculadas. Segundo UOSUKAINEN & VESTBERG (1994), a inoculação de macieiras micropropagadas com *Glomus mosseae*, *G. claroideum* e *G. fistulosum* aumentou o crescimento e a uniformidade das plantas reduzindo assim o tempo de produção de uma muda comercial. Estes estudos indicam que a biotecnologia, especialmente a inoculação de FMA, é uma importante ferramenta na produção de espécies frutíferas micropropagadas (BRANZANTI et al., 1992).

Seleção de FMA

A eficiência da simbiose micorrízica depende da interação entre o fungo simbiote, a espécie hospedeira e o ambiente, este último envolvendo fatores

abióticos como características químicas e físicas dos solos e fatores bióticos, que incluem a sua comunidade microbiana. Sendo assim, para que a associação micorrízica seja eficiente em determinadas condições ambientais, deve existir compatibilidade entre o hospedeiro e o fungo. HABTE & SOEDARJO (1996), por exemplo, inocularam *Glomus aggregatum* em plantas de *Acacia mangium* e constataram que o estímulo do isolado ao crescimento de um hospedeiro pode ser dependente da espécie de planta envolvida, e concluíram que houve incompatibilidade entre os simbioses. GUILLEMIN, GIANINAZZI e TROUVELOT (1992) inocularam cinco isolados de *Glomus* sp. em três variedades de abacaxizeiros. As plantas inoculadas produziram mais biomassa do que as não inoculadas, mas houve diferenças marcantes entre as combinações de isolados fúngicos e hospedeiro, indicando certo grau de especificidade dos FMA em relação às variedades de abacaxizeiros.

As condições ambientais, particularmente as características do solo, constituem também fator importante na eficiência dos FMA. RAJU et al. (1988) observaram que a inoculação de *Glomus deserticola* em seis genótipos de sorgo não afetou a produção de biomassa das plantas, e não houve diferenças na concentração de P, Zn, Cu e Ca no tecido vegetal entre plantas inoculadas e não inoculadas. Os autores concluíram que a eficiência do isolado foi inibida devido a fatores edáficos, como os níveis tóxicos de Al, enfatizando a necessidade de seleção de FMA para a tolerância a Al e pH. Em um estudo com macieiras micropropagadas, UOSUKAINEN & VESTBERG (1994) constataram que um isolado de *Glomus hoi* retardou o desenvolvimento de plantas, mostrando um efeito parasítico. Estes resultados, portanto, reforçam a necessidade de seleção de isolados eficientes de FMA, adaptados às

condições edáficas e compatíveis com o hospedeiro, para que sejam otimizados os benefícios provenientes da associação micorrízica.

A inoculação de isolados precedida da seleção de FMA eficientes na promoção do crescimento de plantas pode melhorar a produtividade vegetal e diminuir os custos de produção, uma vez que o processo reduz a utilização de insumos de natureza química (ABBOTT & ROBSON, 1982). No processo de seleção visando a produção de inóculo micorrízico, os isolados fúngicos devem possuir determinadas características que permitam aumentar a eficiência na absorção de nutrientes pelas plantas, tais como, a formação de um micélio extra radicial e bem distribuído no solo, a colonização das raízes recém formadas, e, devem ainda, ser eficientes na absorção de fósforo do solo e dispor de mecanismos de persistência na rizosfera (ABBOTT & ROBSON, 1982). Um fungo selecionado deve, ainda, ter alta infectividade, definida como a capacidade inerente ao isolado de produzir a infecção micorrízica numa planta hospedeira (PLENCHETTE, PERRIN, DUVERT, 1989). O potencial do inóculo a ser utilizado deverá, portanto, propiciar elevada colonização do hospedeiro pelo fungo, fato que dependerá de outros fatores, como a densidade, ou seja, a quantidade de propágulos do fungo, as condições ambientais, para além da infectividade do isolado (CAMPBELL, 1989).

Várias estratégias podem ser utilizadas para selecionar isolados eficientes para a planta hospedeira de interesse visando a sua adaptação às condições edafo-climáticas onde esta será cultivada. Segundo ABBOTT & ROBSON (1982), a etapa inicial consiste no estabelecimento de culturas de isolados de FMA. Em seguida, a seleção inicial deve ser conduzida em condições controladas, visando à avaliação de características do isolado, tais como

infectividade e/ou eficiência, que, subseqüentemente, devem ser avaliadas em condições definitivas. MENGE, LEMBRIGHT e JOHNSON (1977) propuseram uma estratégia para a produção de inóculo para plantas de *Citrus*, que pode ser utilizada para selecionar isolados eficientes de FMA. Segundo os autores, culturas-armadilha foram estabelecidas com solos de pomares de *Citrus* visando à recuperação de esporos de FMA, os quais foram desinfectados e inoculados *in vitro* em um hospedeiro para avaliação da infectividade. As raízes colonizadas foram então utilizadas como inóculo para cultura-armadilha, que foi utilizada como cultura mãe, fornecendo inóculo para plantas de *Citrus* em viveiro. Esse sistema permitiu o estabelecimento de culturas de isolados que foram avaliados em viveiros e no campo. SIEVERDING (1986) propôs um outro modelo com várias etapas que visam à seleção de isolados e produção de inóculo. O autor incluiu inicialmente a coleta de amostras de solo para o estabelecimento de um banco de germoplasma de isolados fúngicos. Após, sugeriu a caracterização dos isolados fúngicos em condições de casa de vegetação quanto à sua eficiência na absorção de fósforo e competição com outros microrganismos do solo. Finalmente, os isolados mais eficientes foram selecionados para condições definitivas. Para selecionar isolados de FMA visando a inoculação em plantas de dunas, a estratégia utilizada por SYLVIA & BURKS (1988) foi a de simularem experimentalmente as condições do ecossistema em questão. Para tal, os autores usaram tanto isolados provenientes de dunas (*Glomus deserticola* S305 e S308 e *Glomus globiferum* S316) como de áreas agrícolas (*Glomus deserticola* S306 e *G. etunicatum* S329) e inocularam *Uniola paniculata* cultivada em areia de dunas em condições de campo (sem sombra).

Embora diversos trabalhos tenham sido realizados com o objetivo de selecionar um ou vários fungos eficientes, poucos foram desenvolvidos para selecionar populações eficientes. Essa estratégia, entretanto, foi adotada por POWELL (1982) que inoculou plantas de azevém com fungos micorrízicos nativos de 20 solos diferentes. Após 8 semanas, as raízes de azevém foram lavadas, cortadas e utilizadas na inoculação de novas plantas de azevém e, subsequente, o autor avaliou a produção de biomassa vegetal em condições de casa de vegetação. Três populações mostraram-se mais eficientes e foram, assim, selecionadas para avaliações em condições de campo.

Na maioria dos estudos de eficiência, pouca importância tem sido dispensada à origem dos isolados fúngicos. Os isolados envolvidos são, geralmente, originados de diferentes comunidades micorrízicas e pouca atenção tem sido dada no sentido de investigar como fungos micorrízicos provenientes de uma mesma comunidade diferem quanto aos seus efeitos no crescimento das plantas do mesmo ecossistema e no mesmo solo (STREITWOLF-ENGEL et al., 1997). *Prunella vulgaris* e *P. grandiflora* foram inoculadas com *Glomus geosporum* (BEG 18), *Glomus sp.* (BEG 19) e *Glomus sp.* (Basel Pi), fungos provenientes e recuperados de solo de uma pradaria (STREITWOLF-ENGEL et al., 1997). Os autores observaram que os isolados não diferiram quanto aos seus efeitos no comprimento total dos estolões e no número de folhas de *P. grandiflora*. Considerando as mesmas características, o isolado Basel Pi foi superior aos outros dois isolados quando inoculado em *P. vulgaris*. Um dos fatores que impedem um estudo mais acurado de isolados provenientes de uma mesma comunidade é a dificuldade de obtenção de

culturas de isolados, embora protocolos para tal tenham sido estabelecidos (MORTON, BENTIVENGA, WHEELER, 1993). Por exemplo, GAVITO & VARELA (1995), tentaram cultivar 14 isolados de uma mesma comunidade, mas obtiveram sucesso apenas com dois, evidenciando que a facilidade de propagação ou multiplicação é um atributo fundamental de um isolado do qual se pretende produzir inóculo.

A utilização de isolados indígenas ou exóticos depende do conhecimento das características dos fungos da população nativa, tais como potencial infectivo, abundância ou densidade de esporos e sua eficiência (DODD & THOMSON 1994). Segundo SIQUEIRA & FRANCO (1988), o potencial para inoculação de isolados em solos com baixa densidade de propágulos viáveis é alto. A eficiência da associação, entretanto, dependerá da eficiência do isolado introduzido e de sua adaptação às condições edafo-climáticas existentes. Em solos com populações de FMA infectivas, a inoculação só será potencialmente interessante se a eficiência da população nativa for baixa.

Referências bibliográficas

- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. - Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum type. **Aust. J. Agric. Res.**, **32**: 631-639, 1981.
- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. - The role of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture and the selection of fungi for inoculation. **Aust. J. Agric. Res.**, **33**: 389-408, 1982.
- AMES, R.N.; THIAGARAJAN, T.R.; AHMAD, M.H.; MCLAUHLIN, W.A. - Co-selection of compatible rhizobia and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for cowpea in sterilized and non-sterilized soils. **Biol. Fertil. Soils**, **12**: 112-116, 1991.
- ARINES, J.; VILARIÑO, A.; SAINZ, M. - Effect of different inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on manganese content and concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.) plants. **New Phytol.**, **112**:215-219, 1989.
- AZCÓN, R. & BAREA, J.M. - Nodulation, N₂ fixation (¹⁵N) and nutrition relationships in mycorrhizal or phosphate-amended alfalfa plants. **Symbiosis**, **12**: 33-41, 1992.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BARCELÓ, A.; VEDAL, M. T.; DE LA VIÑA, G. - Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. **Agronomie**, **12**: 837-840, 1992.
- BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S.; AMES, R.N.; THOMAS R.S. - Effects of drought on host and endophyte development in mycorrhizal soybeans in relation to water and phosphate uptake. **Physiol. Plant.**, **72**:565-571, 1988.
- BOLAN, N.S. - A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant Soil**, **134**:189-207, 1991.
- BONFANTE-FASOLO, P. - Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: . POWELL, C. LI. & BAGYARAJ, D. J. ed. - **VA Mycorrhiza**. Boca Raton, CRC Press, 1984.
- BORIE, F. & RUBIO, R. - Effects of arbuscular mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive barley cultivars. **J. Plant Nutr.**, **22**:121-137, 1999.
- BRANZANTI, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. - Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrient status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage. **Agronomie**, **12**:841-845, 1992.
- BRUNDRETT, M.C. - Mycorrhizas in natural ecosystems. In: MACFAYDEN, A., BEGON, M., FITTER, A.H. (eds.) - **Advances in Ecological Research**. London, Academic Press, 1991. p.171-313.
- BRUNDRETT, M.C. & ABBOTT, L.K. - Mycorrhizal fungus propagules in the jarrah forest. II. Spatial variability in inoculum levels. **New Phytol.**, **131**:461-469, 1995.
- CAMPBELL, R. - **Biological control of microbial plant pathogens**. Cambridge, Cambridge University Press, 1989.

- COOPER, K.M. & GRANDISON, G.S. – Interaction of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and root-knot nematode on cultivars of tomato and white clover susceptible to *Meloidogyne hapla*. *Ann. Appl. Biol.*, **108**:555-565, 1986.
- CORDIER, C.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. - Colonisation patterns of roots tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil*, **185**:223-232, 1996.
- DODD, J.C. & THOMSON, B.D. - The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. In: ROBSON, A. D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. (eds.) – **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. Netherlands, Academic Publishers, 1994. p.150-158.
- EL-KHERBAWY, M.; ANGLE, J.S.; HEGGO, A.; CHANEY, R.L. - Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biol. Fertil. Soils*, **8**:61-65, 1989.
- FORTUNA, P.; CITERNESI, S.; MORINI, S.; GIOVANNETTI, M.; LORETI, F. - Infectivity and effectiveness of different species of arbuscular mycorrhizal fungi in micropropagated plants of Mr S 2/5 plum rootstock. *Agronomie*, **12**:825-829, 1992.
- FRIESE, C.F. & ALLEN, M.F. – The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. *Mycologia*, **83**:409-418, 1991.
- GAVITO, M.E. & VARELA, L. - Response of "criollo" maize to single and mixed species inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, **176**:101-105, 1995.
- GEDDEDA, Y.I.; TRAPPE, J.M.; STEBBINS, R.L. - Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae and phosphorus on apple seedlings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **109**:24-27, 1984.
- GEDDEDA, Y.I.; TRAPPE, J.M.; STEBBINS, R.L. - Vesicular-arbuscular, mycorrhizal fungi associated with apples grown in Oregon. *Hortscience*, **18**:929-930, 1983.
- GIANINAZZI-PEARSON, V. – Cellular modifications during host-fungus interactions in endomycorrhizae. In. BAILEY, J. ed. - **Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interactions**. Springer Verlag, Berlin. 1986. p.29-37.
- GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; LOGI, C. – Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, **127**:703-709, 1994.
- GRANGER, R.L.; PLENCHETTE, C.; FORTIN, J.A. - Effect of a vesicular arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus (*Glomus epigaeum*) on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated *in vitro*. *Can. J. Plant Sci.*, **63**:551-555, 1983.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. – Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BOSO, J.A. ed. – **Cultura de tecidos e**

- transformação genética de plantas.** Brasília, EMBRAPA, 1991. p.183-204.
- GUILLEMIN, J.P.; GIANINAZZI, S.; TROUVELOT, A. - Screening of arbuscular endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants. **Agronomie**, **12**:831-836, 1992.
- HABTE, M. & SOEDARJO, M. - Response of *Acacia mangium* to vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation, soil pH, and soil P concentration in an oxisol. **Can. J. Bot.**, **74**:155-161, 1996.
- HETRICK, B.A.D.; KITT, D.G.; WILSON, G.T. - The influence of phosphorus fertilization, drought, fungal species, and nonsterile soil on mycorrhizal growth response in tall grass prairie plants. **Can. J. Bot.**, **64**:1199-1203, 1986.
- HOOKER, J.E.; GIANINAZZI, S.; VESTBERG, M.; BAREA, J.M.; ATKINSON, D. - The application of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagation systems: an opportunity to reduce chemicals inputs. **Agric. Sci. Finl.**, **3**:227-232, 1994.
- JONER, E.J.; MAGID, J.; GAHOONIA, T.S.; JAKOBSEN, I. - P depletion and activity of phosphatases in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Soil Biol. Biochem.**, **27**:1145-1151, 1995.
- KIELISZEWSKA-ROKICKA, B.; RUDAWSKA, M.; LESKI, T.; KURCZYNSKA, E.U. - Effect of low pH and aluminum on growth of *Pinus sylvestris* L. seedlings mycorrhizal with *Suillus luteus* (L. EX Fr.). **Chemosphere**, **36**:751-756, 1998.
- KILLHAM, K. & FIRESTONE, M.K. - Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. **Plant Soil**, **72**:39-48, 1983.
- KITT, D.G.; HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T. - Relationship of soil fertility to suppression of the growth response of mycorrhizal big bluestem in non-sterile soil. **New Phytol.**, **109**:473-481, 1988.
- KOCHIAN, L. V. - Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **46**:237-260, 1995.
- KOSKE, R.E. & POLSON, W.R. - Are VA mycorrhizae required for sand dune stabilization? **BioScience**, **34**:420-424, 1984.
- LOVATO, P.E.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; TROUVELOT, A.; GIANINAZZI, S. - The state of art of mycorrhizas and micropropagation. **Adv. Hort. Sci.**, **10**:46-52, 1996.
- LOVATO, P.; GUILLEMIN, J.P.; GIANINAZZI, S. - Application of commercial arbuscular endomycorrhizal fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants. **Agronomie**, **12**:873-880, 1992.
- LU, X. & KOIDE, R.T. - The effects of mycorrhizal infection on components of plant growth and reproduction. **New Phytol.**, **128**:211-218, 1994.

- MARSCHNER, H. - Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant Soil**, **134**:1-20, 1991.
- MARSCHNER, H. - Role of root growth, arbuscular mycorrhiza, and root exudates for the efficiency in nutrient acquisition. **Field Crop Res.**, **56**:203-207, 1998.
- MENGE, J.A.; LEMBRIGHT, H.; JOHNSON, E.L.V. - Utilization of mycorrhizal fungi in citrus nurseries. **Proc. Int. Soc. Citriculture**, **1**:129-132, 1977.
- MILLER, D.D.; DOMOTO, P.A.; WALKER, C. - Colonization and efficacy of different endomycorrhizal fungi with apple seedlings at two phosphorus levels. **New Phytol.**, **100**:393-402, 1985b.
- MILLER, D.D.; DOMOTO, P.A.; WALKER, C. - Mycorrhizal fungi at eighteen apple rootstock plantings in the United States. **New Phytol.**, **100**:379-391, 1985a.
- MORTON, J.B. - Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizal fungi in the Endogonaceae. **Mycologia**, **82**:192-207, 1990.
- MORTON, J.B. - Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. **Mycotaxon**, **32**:267-324, 1988.
- MORTON, J.B. & BENNY, G.L. - Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, **37**:471-491, 1990.
- MORTON, J.B. & BENTIVENGA, S.P. - Levels of diversity in endomycorrhizal fungi (Glomales, Zygomycetes) and their role in defining taxonomic and non-taxonomic groups. **Plant Soil**, **159**:47-59, 1994.
- MORTON, J.B.; BENTIVENGA, S.P.; WHEELER, W.W. - Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. **Mycotaxon**, **48**:491-528, 1993.
- MOSSE, B. - Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. X. Responses of *Stylosanthes* and maize to inoculation in unsterile soils. **New Phytol**, **78**:277-288, 1977.
- NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. - Arbuscular mycorrhiza protect an annual grass from root pathogenic fungi in the field. **J. Ecol.**, **83**:991-1000, 1995a.
- NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. - Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Tree**, **10**:407-411, 1995b.
- PIROZYNSKI, K.A. & MALLOCH, D.W. - The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **BioSystems**, **6**:153-164, 1975.
- PLENCHETTE, C.; FURLAN, V.; FORTIN, J. A. - Growth stimulation of apple trees in unsterilized soil under field conditions with VA mycorrhiza inoculation. **Can. J. Bot.**, **59**:2003-2008, 1981.

- PLENCHETTE, C.; PERRIN, R; DUVERT, P. - The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. *Can. J. Bot.*; **67**:112-115, 1989.
- POWEL, C.L. - Selection of efficient VA mycorrhizal fungi. *Plant Soil*, **68**:3-9, 1982.
- POZO, M.J.; AZCÓN-AGUILAR, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BAREA, J.M. - Beta-1, 3-Glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or *Phytophthora parasitica* and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science*, **141**:149-157, 1999.
- PUTHUR, J.T.; PRASAD, K.V.S.K.; SHARMILA, P.; SARADHI, P.P. - Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated *Leucaena leucocephala* plantlets. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, **53**:41-47, 1998.
- RAJU, P.S.; CLARK, R.B.; ELLIS, J.R.; MARANVILLE, J.W. - Effects of VA mycorrhizae on mineral uptake in sorghum genotypes grown on acid soil. *Commun. In Soil Sci. Plant Anal.*, **19**:909-918, 1988.
- RAPPARINI, F.; BARALDI, R.; BERTAZZA, G.; BRANZANTI, B.; PREDIERI, S. - Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated fruit trees. *J. Hort. Sci.*, **69**:1101-1109, 1994.
- RUIZ-LOZANO, J.M. & AZCÓN, R. - Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. *Physiol. Plant.*, **95**:472-478, 1995.
- SCHUBERT, A.; BODRINO, C.; GRIBAUDO, I. - Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of kiwifruit (*Actinia deliciosa*) micropropagated plants. *Agronomie*, **12**:847-850, 1992.
- SCHUBERT, A.; MAZZITELLI, M.; ARIUSSO, O.; EYNARD, I. - Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on micropropagated grapevines: Influence of endophyte strains, P fertilization and growth medium. *Vitis*, **29**:5-13, 1990.
- SHUMWAY, D.L. & KOIDE, R.T. - Reproductive responses to mycorrhizal colonization of *Abutilon theophrasti* Medic. plants grown for two generations in the field. *New Phytol.*, **128**:219-224, 1994.
- SIEVERDING, E. - Research model towards practical application of VA mycorrhizal fungi in tropical agriculture. *Mycorrhizae: physiology and genetics*. Dijon, 1986. P. 475-478.
- SIEVERDING, E. & HOWELER, R.H. - Influence of species of VA mycorrhizal fungi on cassava yield response to phosphorus fertilization. *Plant Soil*, **88**:213-221, 1985.
- SIMON, L.; BOUSQUET, J.; LÉVESQUE, R.C.; LALONDE, M. - Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature*, **363**:67-69, 1993.
- SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. - Micorrizas. In: _____ - *Biotecnologia do solo. fundamentos e perspectivas*. Brasília, Ministério da Educação, 1988. p. 125-177.

- SMITH, S.E. & GIANINAZZI-PEARSON, V. - Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, **39**:221-244, 1988.
- SMITH, S.E. & READ, D.J. - **Mycorrhizal Symbiosis**. London, Academic Press, 1997. 605p.
- SOEDARJO, M. & HABTE, M. - Vesicular-arbuscular mycorrhizal effectiveness in an acid soil amended with fresh organic matter. **Plant Soil**, **149**:197-203, 1993.
- STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. - Clonal growth traits of two *Prunella* species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi from calcareous grasslands. **J. Ecol.**, **85**:181-191, 1997.
- SUBHAN, S.; SHARMILA, P.; SARADHI, P.P. - *Glomus fasciculatum* alleviates transplantation shock of micropropagated *Sesbania sesban*. **Plant Cell Rep.**, **17**:268-272, 1998.
- SYLVIA, D.M. & BURKS, J.N. - Selection of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus for practical inoculation of *Uniola paniculata*. **Mycologia**, **80**:565-568, 1988.
- TARAFDAR, J.C. & MARSCHNER, H. - Efficiency of VAM hyphae in utilisation of organic phosphorus by wheat plants. **Soil Sci. Plant Nutr.**, **40**:593-600, 1994.
- TRAPPE, J.M. - Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G. R. - **Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants**. Boca Raton, CRC, 1987. p.5-25.
- TRAPPE, J.M.; STAHLY, E.A.; BENSON, N.R.; DUFF, D.M. - Mycorrhizal deficiency of apple trees in high arsenic soils. **HortScience**, **8**:52-53, 1973.
- UOSUKAINEN, M. & VESTBERG, M. - Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizas on rooting, weaning and subsequent growth of micropropagated *Malus* (L.) Moench. **Agric. Sci. Finl.**, **3**:269-279, 1994.
- VOSATKA, M. & DODD, J.C. - The role of different arbuscular mycorrhizal fungi in the growth of *Calamagrostis villosa* and *Deschampsia flexuosa*, in experiments with simulated acid rain. **Plant Soil**, **200**:251-263, 1998.
- WILLIAMS, S.C.K.; VESTBERG, M.; UOSUKAINEN, M.; DODD, J.C.; JEFFRIES, P. - Effects of fertilizers and arbuscular mycorrhizal fungi on the *post-vitro* growth of micropropagated strawberry. **Agronomie**, **12**:851-857, 1992.

CAPITULO 2

SELEÇÃO DE FMA EFICIENTES PARA MACIEIRAS MICROPROPAGADAS E TRANSPLANTADAS PARA SOLOS ÁCIDOS ESTERILIZADOS

INTRODUÇÃO

O estado de Santa Catarina é o maior produtor de maçãs do Brasil, sendo responsável por aproximadamente 53% da produção nacional, que corresponde a cerca de 707.000 toneladas (ICEPA/SC, 1999). Os solos predominantes nas regiões de cultivo de macieiras no estado são, em geral, ácidos (BASSO & SUZUKI, 1992; SUZUKI & BASSO, 1997). Em solos ácidos, o crescimento das plantas pode ser limitado por vários fatores, como a concentração de íons potencialmente tóxicos como Al^{+3} , Mn^{+2} e H^{+} e a concentração e solubilidade de elementos essenciais, especificamente P, Mg e Ca (MARSCHNER, 1991). A correção da acidez dos solos para propiciar o cultivo da macieira implica na aplicação de quantidades de calcário suficientes para elevar o pH a 6,0, em uma camada de solo de cerca de 40cm. Estes investimentos contribuem para que a maçã seja um dos produtos agrícolas com mais alto custo de produção no estado (KREUZ, 1992).

A associação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) com plantas cultivadas pode aumentar a absorção de nutrientes ao mesmo tempo em que exerce um efeito protetor contra elementos potencialmente fitotóxicos. Esses fungos ocorrem naturalmente nos solos e colonizam as raízes da maioria das plantas (TRAPPE, 1987), estimulando a sua sobrevivência e o seu crescimento (PLENCHETTE, FORTIN, FURLAN, 1983; HABTE & AZIZ, 1985). Particularmente, em solos ácidos, foi evidenciado experimentalmente que a colonização de plantas por FMA estimulou a produção de biomassa vegetal (SIEVERDING & HOWELER, 1985; O'DONNELL et al., 1992; SOEDARJO & HABTE, 1993) e a absorção de nutrientes essenciais, como P (BOLAN, 1991; HABTE & SOEDARJO, 1996), K e Mg (RAJU et al., 1988; SIQUEIRA et al.,

1990; BORIE & RUBIO, 1999). A associação micorrízica arbuscular pode ainda exercer um efeito protetor contra elementos potencialmente tóxicos às plantas, como Fe e Cd (EL-KHERBAWY et al., 1989), Mn (ARINES, VILARIÑO, SAINZ, 1989) e Al (BORIE & RUBIO, 1999), diminuindo a sua absorção e, conseqüentemente, a sua concentração nos tecidos vegetais.

A associação micorrízica na macieira pode ser mais eficiente na promoção do crescimento do que a aplicação de fertilizantes. A inoculação com FMA produziu um aumento médio na altura e na produção de matéria seca pelas plantas de 735 e 1161%, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas, superando o estímulo ao crescimento promovido pela aplicação de P (GEDDEDA, TRAPPE, STEBBINS, 1984). Os autores registraram ainda uma correlação negativa entre níveis de P no solo e a colonização radicular, evidenciando uma redução no efeito da associação pela adição de fertilizantes. MILLER, DOMOTO e WALKER (1985a) inocularam seis isolados de *Glomus* e um de *Gigaspora* em macieiras cultivadas em solos esterilizados, e com dois níveis de fertilização, e observaram que apenas as plantas cultivadas em substrato sem a aplicação de P foram responsivas à associação micorrízica. A fertilização resultou em baixas taxas de colonização radicular (5%) comparadas àquelas (superiores a 75%) registradas nas plantas cultivadas em solos não fertilizados. PLENCHETTE, FURLAN e FORTIN (1981) inocularam plantas de macieira (*Malus pumila*) com raízes colonizadas em solo esterilizado com pH 4,7. As macieiras associadas aos FMA foram significativamente mais altas e mais uniformes em comparação com as plantas controle sem micorrizas. Isso resultou num incremento no peso de matéria seca do caule, superfície foliar e matéria seca foliar de 335, 153 e 204%, respectivamente, nas plantas com

micorrizas relativamente às plantas controle. A associação micorrízica também promoveu um aumento nas concentrações de K, N, P, Ca e Cu nas raízes comparado às plantas controle.

A produção em grande escala de mudas de macieiras de qualidade e livres de vírus requer a utilização de técnicas de propagação eficientes, tal como a micropropagação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1991). Contudo, os substratos esterilizados utilizados nesses sistemas impedem a associação das plântulas com microrganismos simbiotes, o que pode ocasionar problemas na sobrevivência e no crescimento das mudas após o transplante (RAVOLANIRINA et al., 1989). A inoculação com FMA na fase *post vitro* em sistemas de micropropagação pode aumentar a sobrevivência das plantas e minimizar os efeitos deletérios resultantes do sistema. BRANZANTI, GIANINAZZI-PEARSON e GIANINAZZI (1992) observaram que a aplicação de P eliminou as respostas de macieiras micropropagadas à micorrização, enquanto a associação com FMA produziu plantas significativamente mais uniformes e mais altas do que aquelas cultivadas em substrato fertilizado. GRANGER, PLENCHETTE e FORTIN (1983) observaram que clones de macieira Malling 7 (M7) micropropagados e inoculados com *Glomus epigaeum* produziram maior quantidade de biomassa e apresentaram maiores concentrações de P e Cu em relação às plantas não micorrizadas. A associação micorrízica beneficiou as plantas de macieira micropropagadas, ainda, na tolerância a estresses diversos nos estádios de enraizamento e de aclimatização, reduzindo o tempo necessário para a produção da muda (UOSUKAINEN & VESTBERG, 1994). A maioria dos estudos realizados com macieiras micropropagadas associadas a FMA, no entanto, utilizam isolados

fúngicos de diferentes comunidades micorrízicas e freqüentemente não nativos, ou seja, provenientes de outros ecossistemas. Além disso, pouca atenção tem sido dada à seleção de isolados considerando as condições edáficas desejadas, tal como o nível de acidez no solo.

A eficiência de uma associação endomicorrízica pode ser afetada por vários fatores, como as características do isolado de FMA inoculado (GEDDEDA et al., 1984; MILLER et al., 1985; UOSIKAINEN & VESTBERG, 1994), a variedade da planta hospedeira (GRANGER et al., 1983; BRANZANTI et al., 1992; GUILLEMIN, GIANINAZZI, TROUVELOT, 1992), e as condições ambientais que envolvem aspectos abióticos, tais como características físico-químicas do solo e fatores bióticos, como as interações fungo-biota nativa (HABTE & SOEDARJO, 1996).

Os programas de inoculação, portanto, devem ser precedidos por programas de seleção de isolados de FMA, assegurando que estes sejam eficientes para a planta hospedeira nas condições ambientais desejadas, otimizando-se assim os efeitos benéficos da associação (SCHUBERT & HAYMAN, 1986; MEDINA, SYLVIA, KRETSCHMER, 1988). A maioria dos programas de seleção vêm geralmente utilizando populações de fungos (POWELL, 1988) ou isolados fúngicos de várias procedências, que são submetidos às condições para as quais se deseja selecionar, quer em termos do uso de determinados hospedeiros (SYLVIA & BURKS, 1988) quer especificando-se as condições ambientais (MEDINA et al., 1988). A primeira etapa de um programa de seleção é a identificação de sítios responsivos à introdução de fungos através do conhecimento do potencial de infectividade dos isolados nativos (DODD & THOMSON, 1994). O objetivo deste estudo foi

identificar e recuperar FMA de pomares de macieira e posteriormente avaliar os isolados quanto à sua eficiência na promoção do crescimento e na absorção mineral de plantas de porta-enxerto de macieiras (*Malus prunifolia*) cultivar Marubakaido micropropagadas e cultivadas em solos esterilizados e atendendo a um dos fatores edáficos mais restritivos ao crescimento das plantas, a acidez do solo.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Características do local e amostragem do solo

Em três regiões produtoras de maçã em Santa Catarina, localizadas nos municípios de São Joaquim (Planalto Serrano), Fraiburgo (Vale do Rio do Peixe) e Caçador (Planalto Norte) (Figura 1), foram selecionados aleatoriamente pomares com idades variáveis e cultivados com diferentes cultivares de macieiras (Tabela 1). As regiões situam-se em altitudes entre 900 e 1500m acima do nível do mar e os solos são ácidos e álicos. O clima é mesotérmico úmido e caracteriza-se por verões frescos e invernos rigorosos, com temperaturas médias em torno de 10°C, sendo que temperaturas negativas são freqüentemente registradas.

Dois pomares de macieira foram aleatoriamente selecionados em cada região, e em cada pomar 10 amostras de solo foram coletadas em torno de 10 plantas. De cada planta foram retiradas 4 sub-amostras pesando cerca de 0,5Kg fazendo-se quatro covas de até 20cm de profundidade na projeção da copa das macieiras, à distância de 20 a 40cm do tronco. O solo coletado foi acondicionado em sacos plásticos e transportado para o Laboratório de Endomicorrizas da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foi estocado em geladeira (4°C) por um período não superior a uma semana.

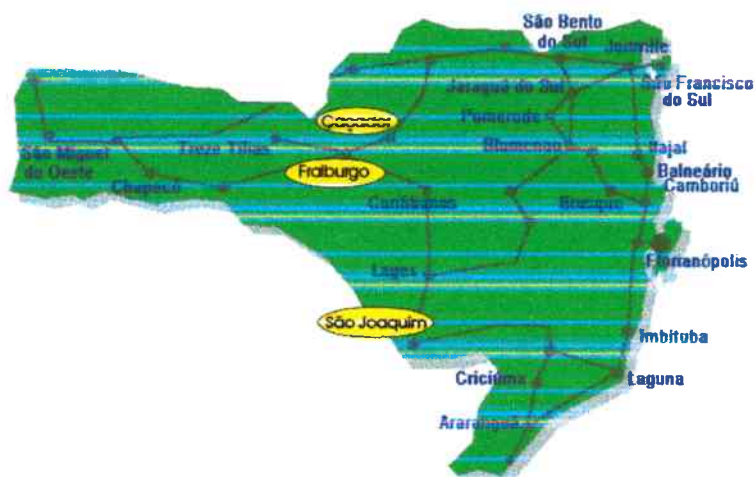


Figura 1. Mapa do Estado de Santa Catarina apresentando a localização das regiões dos pomares de macieiras selecionados para coleta dos solos.

Tabela 1. Localização e características dos pomares de macieiras selecionados

Localização		Características		Código
Região	Local	Idade do pomar (anos)	Cultivares	
Caçador	Estação Experimental EPAGRI	3	Fuji e Gala	CA1
		18	Fuji	CA2
São Joaquim	Estação Experimental EPAGRI	17	Rome Beauty e Fuji	SJ1
		4	Fuji	SJ2
Fraiburgo	Empresa Fischer	12	Belgolden	FR1
		7	Fuji	FR2

2. Seleção de pomares com populações infectivas

O potencial de inóculo em cada pomar foi avaliado com o objetivo de selecionar o pomar com população mais infectiva e/ou abundante. O método utilizado foi o do bioensaio com milho (MOORMAN & REEVES, 1979). As amostras de solo foram homogeneizadas e misturadas na proporção de 1:1 (v/v) com areia lavada e esterilizada e colocadas em vasos de 0,5L. Uma plântula de milho híbrido (Agroeste-AS 532) com idade de seis dias e pré-germinada em areia esterilizada foi transplantada para cada vaso. Foram utilizados vinte e quatro vasos com solo de cada pomar e dentre estes foram obtidas seis amostras em cada período, correspondente aos 10, 20, 30 e 40 dias após o transplante, para avaliação da porcentagem de colonização radicular. As raízes foram separadas do solo, lavadas e coradas pela técnica de KOSKE & GEMMA (1989). Posteriormente, a colonização radicular foi avaliada pela técnica das linhas quadriculadas descrita por GIOVANNETTI & MOSSE (1980) e utilizada como estimativa do potencial de inóculo das comunidades de FMA de cada solo. O pomar com a população mais infectiva foi selecionado para a obtenção de espécies/isolados de FMA.

3. Recuperação de espécies de FMA presentes no solo do pomar selecionado

3.1. Caracterização taxonômica das espécies recuperadas diretamente do solo e após culturas-armadilha

As amostras do solo do pomar com população mais infectivas foram homogeneizadas, e uma sub-amostra (50g) foi retirada para recuperação de esporos de FMA através da técnica de peneiragem úmida (GERDEMANN & NICOLSON, 1963) seguida de centrifugação em solução de 50% de sacarose.

As sub-amostras foram colocadas em um béquer de 2L, e o volume foi completado com água e agitado com uma espátula por 10 segundos. A suspensão foi então vertida três vezes em duas peneiras sobrepostas com malhas de 2mm e 53 μ m. O material coletado na peneira de 53 μ m foi centrifugado em água, durante 5 minutos, e o sobrenadante, descartado. O material precipitado foi suspenso em solução de sacarose (50%) e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente vertido em peneira de 53 μ m e os esporos e resíduos recolhidos foram lavados em água de torneira, colocados em placa de Petri e examinados sob microscópio estereoscópio com aumento de 400 vezes. Os esporos foram então coletados com pipeta de Pasteur, colocados sobre discos de papel filtro, e agrupados de acordo com caracteres tais como dimensão, cor e características morfológicas (MORTON, 1988). Os esporos foram fixados em lâminas e acondicionados em frascos com solução de azida sódica que foram enviados para o International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM, West Virginia University, EUA) para identificação das espécies.

Para o estabelecimento das culturas-armadilha, solo do pomar foi misturado na proporção de 1:1 (v/v), com areia lavada e esterilizada e acondicionado em vasos de 1,5L. Em cada vaso foram semeadas 50 sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.), que subseqüentemente foram cobertas com uma camada de cerca de 1cm de vermiculita esterilizada. As culturas foram mantidas em casa de vegetação irrigadas com água destilada diariamente e não receberam solução nutritiva. Após quatro meses, três sub-amostras de 100g de cada vaso foram coletadas e os esporos extraídos do substrato, conforme descrito e identificados taxonomicamente segundo os critérios

estabelecidos anteriormente. Os esporos recuperados das culturas-armadilha foram utilizados no estabelecimento das culturas dos isolados de FMA.

3.2. Estabelecimento das culturas de isolados de FMA

Previamente à extração de esporos das culturas-armadilha para o estabelecimento das culturas de isolados de FMA, foi preparado um substrato misturando-se solo podzólico vermelho-amarelo (PVA) e areia lavada na proporção de 1:2 (v/v). O substrato foi submetido a dois tratamentos em autoclave a 121°C durante 1 hora com um intervalo de 24 horas entre tratamentos e em seguida o solo foi acondicionado em tubetes de 120mL. Os esporos foram, então, recuperados das culturas-armadilha por peneiragem úmida seguida de centrifugação de sacarose, como descrito no item 3.1, e foram separados em morfotipos levando-se em consideração características como cor, tamanho, opacidade e presença de célula bulbo. Os esporos de cada morfotipo foram inoculados em plantas de sorgo e paspalum para obtenção de isolados, definidos como quaisquer propágulos fúngicos obtidos de uma única amostragem (MORTON, 1993).

As culturas foram mantidas por um período de 4 meses em casa de vegetação e irrigadas com água destilada, diariamente, sem aplicação de solução nutritiva. Após esse período, as plantas foram cortadas ao nível do colo e o substrato deixado secar *in situ* durante 4 dias. Finalmente, o inóculo (substrato + raízes colonizadas) correspondente a cada isolado de FMA foi acondicionado em sacos de plástico e armazenado em geladeira. Uma amostra de 30g de cada inóculo foi enviada para o INVAM (West Virginia University, EUA) para identificação e detecção de contaminantes nas culturas.

O volume de inóculo obtido foi multiplicado para os experimentos de eficiência misturando-se solo inóculo proveniente das culturas de cada isolado com o substrato solo PVA:areia (1:1, v/v). Essa mistura foi acondicionada em vasos de 1,5L e novamente semeado com paspalum e com sorgo. Com a finalidade de obter um tratamento controle para os experimentos foram utilizados alguns vasos contendo o mesmo substrato esterilizado e semeados com ambos os hospedeiros para produzir inóculo não micorrízico. Após 4 meses o substrato dos vasos juntamente com as raízes das plantas foi retirado, homogeneizado e armazenado em geladeira.

4. Eficiência dos isolados de FMA em solos ácidos e esterilizados

A espécie de macieira utilizada foi *Malus prunifolia*, porta enxerto Marubakaido. As plântulas foram produzidas no Laboratório de Morfogênese Vegetal do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina a partir de meristemas apicais em meio Murashige-Skoog (MS) modificado, segundo metodologia desenvolvida por NUNES et al. (1999).

As plantas foram transferidas das condições *in vitro* para bandejas de isopor com células de 60mL, contendo como substrato casca de arroz carbonizada e vermiculita esterilizada misturadas na proporção de 1:1 (v/v). As bandejas de isopor contendo as plântulas micropropagadas foram inseridas em bandejas de plástico com uma lâmina de água de altura aproximada de 1cm no fundo da bandeja para controle da umidade. As bandejas foram então cobertas com uma tampa de vidro com uma abertura de 2cm em uma das extremidades e colocadas em câmara de crescimento, à temperatura de 27°C, até o desenvolvimento do sistema radicular completo.

Após vinte dias, as plantas foram transferidas para bandejas de isopor com células maiores (120mL) contendo uma mistura (1:1:1, v/v/v) de terra roxa, areia lavada e composto vegetal (Tabela 2). Este substrato foi tratado na autoclave duas vezes a 121°C durante 1 hora com um intervalo de 24 horas entre si. O inóculo (esporos, hifas, pedaços de raízes colonizadas) foi adicionado as células, em camada com cerca de 30g, entre duas camadas de solo esterilizado. A mesma quantidade de substrato sem a presença dos FMA foi utilizada para inocular os vasos do tratamento controle. As plantas foram então transplantadas, irrigadas com água destilada sem a aplicação de solução nutritiva, e permaneceram nas bandejas durante período de 30 dias até o estabelecimento da colonização. Nesse momento foram transplantadas para os vasos com diferentes níveis de pH, iniciando-se o experimento de eficiência.

O substrato utilizado neste experimento foi preparado pela mistura de um latossolo bruno álico coletado na região de Fraiburgo (SC), com pH original de 4,0. O solo foi misturado com areia lavada e esterilizada na proporção de 1:1 (v/v). O volume de substrato foi então dividido em três porções, para alteração do pH, sendo duas com o pH corrigido, para 5,0 e 6,0, com carbonato de cálcio através do método de incubação com curvas de neutralização conforme descrito por MELO (1985) e a terceira com pH 4,0 (original). Os substratos, então, foram submetidos a dois tratamentos na autoclave a 121°C durante 1 hora com um intervalo de 24 horas entre si. As características químicas de cada substrato são apresentadas na Tabela 3.

As plantas de macieira micropropagadas, assim como o substrato de cultivo com os três níveis de pH, foram transferidos das bandejas para vasos

de 1,5 Kg. Após o transplântio foi colocada uma camada de 1cm de vermiculita esterilizada na superfície dos vasos.

O delineamento experimental foi um fatorial totalmente casualizado com três níveis de pH, cinco tratamentos de inoculação (quatro fungos e controle não inoculado) com 8 repetições. As plantas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas com água destilada até ser atingida a capacidade de campo do solo. Não foi adicionada solução nutritiva ao substrato durante o cultivo. Após 70 dias, a altura das plantas foi avaliada e as plantas coletadas, lavadas e a parte aérea foi separada da raiz. O tecido vegetal foi, então, colocado em estufa a 60°C durante 3 dias para a determinação do peso de matéria seca do sistema radicular e da parte aérea. A dependência micorrízica, definida como o grau de dependência da planta da condição micorrízica para crescimento numa determinada fertilidade do solo (GERDEMANN, 1975) foi calculada pelo índice DMR (dependência micorrízica relativa) proposto por PLENCHETTE et al. (1983), que atinge o valor máximo de 100%. O valor do peso de matéria seca total das plantas não inoculadas é subtraído, para o cálculo, do valor do peso das plantas inoculadas, e então multiplicado por 100. O valor é a seguir dividido pelo peso das plantas inoculadas. As plantas que apresentarem DMR=100% não tiveram condições para crescer sem a associação, enquanto valores de DMR=0% indicam que as plantas não tiveram necessidade da simbiose para o seu crescimento.

Tabela 2. Características físico-químicas do substrato¹ utilizado no experimento sobre eficiência de isolados

Textura	pH	P	K	MO²	Al	Ca	Mg
% argila		----- ppm -----	-----	%	-----	cmol/dm ³	-----
19	6,0	> 50,0	> 150,0	9,8	---	7,5	2,8

¹ Substrato constituído por terra roxa, areia lavada e composto vegetal (1:1:1, v/v/v).

² MO = matéria orgânica

Tabela 3. Características físico-químicas do solo natural (pH 4,0) e solo corrigido (pH 5,0 e 6,0) utilizados no experimento sobre eficiência de isolados de FMA

Amostra	Textura	P	K	MO¹	Al	Ca	Mg
	% argila	----- ppm -----	-----	%	-----	cmol/dm ³	-----
pH 4,0	28	5,1	99	6,4	2,7	2,0	1,0
pH 5,0	22	2,7	78	6,0	0,3	2,7	1,6
pH 6,0	26	4,1	72	5,6	---	4,7	2,0

¹ MO = matéria orgânica

O tecido da parte aérea das plantas foi, então, moído e enviado para o Laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foi analisado para a determinação da concentração de elementos químicos (N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Fe, Mn, Na, B e Al). As análises foram efetuadas segundo a metodologia descrita por TEDESCO et al. (1995). Amostras do sistema radicular (0,3-0,5g) foram utilizadas para determinação da porcentagem de colonização segundo GIOVANETTI & MOSSE (1980).

5. Análises estatísticas

Os resultados foram avaliados quanto à homogeneidade de variância de acordo com o teste de Burtlett. Os valores das porcentagens de concentração dos elementos N, P, K, Ca, Mg e S foram transformados usando \sqrt{x} , previamente à análise da variância, com exceção da porcentagem de colonização, que foi transformada usando $\sqrt{x + 1}$. A porcentagem de colonização obtida no bioensaio com milho foi submetida à análise da variância simples e as médias separadas pelo teste DMS à 5% de significância. Os resultados obtidos no experimento sobre eficiência dos FMA em solos ácidos foram submetidos a uma análise da variância bifatorial. O teste de separação de médias foi o DMS a 5% de significância. Os parâmetros que apresentaram interação estatisticamente significativa entre os fatores fungo e acidez foram apresentados em tabelas que combinam os dois fatores, enquanto os parâmetros que não apresentaram interação foram submetidos a uma separação de médias para cada fator separadamente. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa STATGRAPHICS® Plus, versão 2.1 (Manugistics, Inc., 1995).

RESULTADOS

1. Potencial de inóculo das populações de FMA

Aos dez dias após o início do bioensaio, todas as plantas de milho haviam sido infectadas pelas populações de FMA nativos (Figura 2), e a porcentagem de colonização variou de 0,2 (pomar CA2) até 2,2% (pomar SJ1). Aos 20 dias, a população do solo do pomar SJ1 foi a que apresentava a maior capacidade de colonização (12,2%), seguida dos solos de Caçador. Aos 30 dias, a população de FMA do solo CA1 já havia colonizado 17,91% das raízes das plantas de milho, ultrapassando a do pomar SJ1. A população fúngica com a menor capacidade de colonização foi a do pomar FR1. Finalmente, quarenta dias após o transplântio, a colonização micorrízica do milho cultivado no solo do pomar de Caçador (CA1) foi significativamente maior do que os restantes solos, seguida da colonização radicular das plantas dos solos SJ1 e CA2. A colonização radicular não diferiu estatisticamente entre os solos de FR1, FR2 e SJ2. Dessa forma, o solo do pomar CA1, correspondente a população de FMA mais infectiva, foi selecionado para a continuidade dos trabalhos visando a seleção de espécies.

2. Caracterização taxonômica das espécies de FMA

No solo do pomar de CA1, esporos de quatro espécies, representantes de duas famílias da ordem Glomales, foram recuperados diretamente do campo, quais sejam, *Gigaspora decipiens* Hall & Abbott, *Scutellospora heterogama* (Nicol. & Gerd.) Koske & Walker, *Acaulospora mellea* Spain & Schenck e *A. spinosa* Walker & Trappe. A espécie mais abundante foi *Acaulospora mellea*, com oito esporos por 100g de solo, seguida por *Scutellospora heterogama*, com seis, *Gigaspora decipiens*, com quatro, e,

finalmente, *Acaulospora spinosa*, que apresentou apenas dois esporos por 100g de solo (Figura 3). Após quatro meses de cultura-armadilha, estabelecidas com este solo, foram recuperadas nove espécies de FMA, sete das quais não tinham sido previamente detectadas a campo. Representantes da família Glomaceae foram recuperados do solo apenas após a cultura-armadilha (Tabela 4).

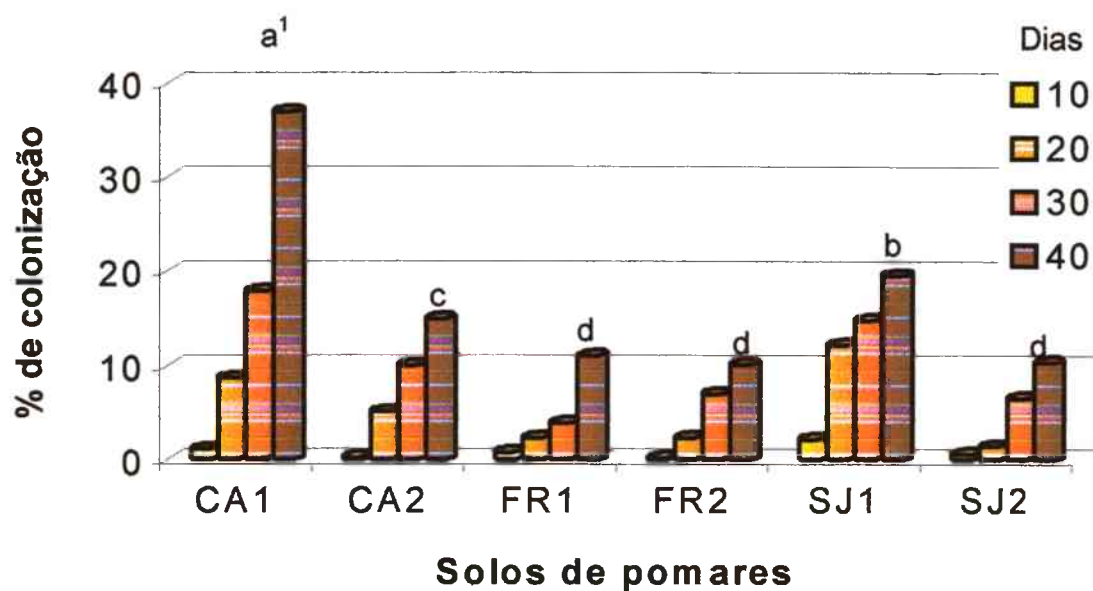


Figura 2. Porcentagem de colonização radicular obtida em bioensaio com milho em solos de diferentes pomares de macieira aos 10, 20, 30 e 40 dias após o plantio.

* Apenas os resultados obtidos aos 40 dias após o plantio foram submetidos à análise estatística.

¹ Valores seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste DMS ao nível de 5% de significância.

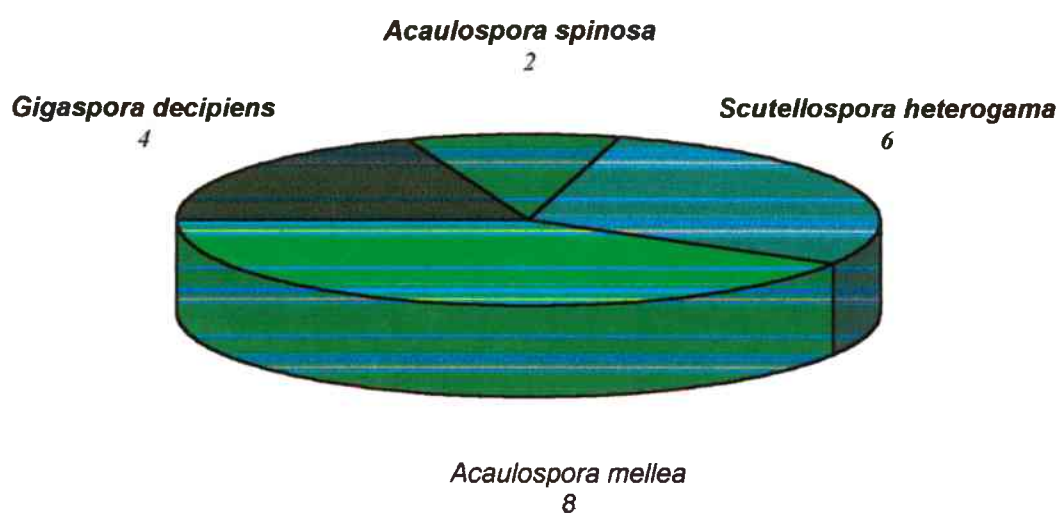


Figura 3. Abundância de esporos de espécies de FMA por 100g de solo de pomar de macieira da cidade de Caçador, Santa Catarina, Brasil.

Tabela 4. Presença de espécies de FMA detectada em solo de pomar de macieira após coleta direta de esporos e após cultura-armadilha

Famílias / Espécies de FMA	Sistema de coleta de esporos	
	Direta	Após cultura-armadilha
Gigasporaceae		
<i>Gigaspora decipiens</i> Hall & Abbott	+	+
<i>Scutellospora heterogama</i> (Nicol. & Gerd.) Koske & Walker	+	+
<i>S. pellucida</i> Nicolson & Schenck		+
<i>S. persica</i> Koske & Walker		+
Acaulosporaceae		
<i>Acaulospora mellea</i> Spain & Schenck	+	
<i>A. morrowae</i> Spain & Schenck		+
<i>A. scrobiculata</i> Trappe		+
<i>A. spinosa</i> Walker & Trappe	+	
Glomaceae		
<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerdemann		+
<i>G. clarum</i> Nicolson & Schenck		+
<i>G. occultum</i> Walker		+

(+) Presença da espécie.

3. Culturas de isolados de FMA

Após quatro meses de cultivo, quatro das nove espécies estabeleceram simbiose com as plantas-armadilha, formando micorrizas e produzindo quantidades elevadas de esporos. Estas espécies foram: *Scutellospora heterogama* (SH), *S. pellucida* (SP), *Glomus etunicatum* (GE) e *Acaulospora scrobiculata* (AS). Isolados destas espécies foram utilizados subsequente no experimento de eficiência. A quantidade de esporos por 100g de substrato após a multiplicação resultante das culturas-armadilha foi a seguinte: 4.524 para *Scutellospora heterogama*, 311 para *S. pellucida*, 37 para *Glomus etunicatum* e 54 para *Acaulospora scrobiculata*.

4. Eficiência dos isolados de FMA em substratos ácidos

4.1. Colonização radicular

A colonização radicular foi influenciada significativamente pelos isolados fúngicos e pela interação fungo x acidez. Após 70 dias, todas as plantas inoculadas com FMA apresentavam colonização radicular que variou de 23,8 a 68,1% (Tabela 5). As maiores porcentagens de colonização radicular foram de 68,1, 65,6 e 64,9% em plantas inoculadas com SP em pH 4,0, 5,0 e 6,0, respectivamente. O pH afetou a colonização radicular apenas de SH, cuja porcentagem de colonização no pH 4,0 foi significativamente maior do que nos pH 5,0 e 6,0. As plantas controle (CO) não apresentaram evidências de colonização.

Tabela 5. Médias de porcentagem de colonização radicular de macieiras inoculadas com FMA em três níveis de pH após 70 dias de cultivo.

Código dos isoiados ¹	----- pH -----		
	4,0	5,0	6,0
GE	27,4 ² b ³ A	35,5 b A	27,9 c A
SP	64,9 a A	65,6 a A	68,1 a A
SH	62,2 a A	44,4 b B	46,5 b B
AS	23,8 b A	26,4 c A	31,5 c A
CO	0,0 c A	0,0 d A	0,0 d A

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

² Os valores representam médias de 8 repetições.

³ Valores seguidos pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS ao nível de 5% de significância.

4.2. Parâmetros de crescimento

A acidez influenciou significativamente a altura, peso de biomassa total (PST), o peso seco da raiz (PSR) e a relação raiz parte aérea (R/PA), mas não exerceu influência significativa na produção de biomassa da parte aérea (Tabela 6). Já o fungo teve um efeito significativo em todos os parâmetros, e a interação entre fungo e acidez afetou significativamente apenas a R/PA.

As plantas mais altas foram aquelas inoculadas com GE e SP, representando um incremento de 132 e 146%, respectivamente, na altura em comparação com as plantas sem micorrizas (Tabela 7). As plantas inoculadas com GE e SP também apresentaram os maiores valores de PST e PSPA, o que representou um aumento de 128 e 134% e 187 e 219%, respectivamente, relativo ao controle. O menor valor de PSPA detectado nas plantas não inoculadas (1,46g), não diferiu estatisticamente do valor das plantas inoculadas com AS (Tabela 7). As plantas inoculadas com GE e SP apresentaram também os maiores valores de PSR, 1,99 e 1,70g, respectivamente, e o PSR das plantas sem micorrizas não diferiu daquelas com micorrizas formadas por SH e AS (Tabela 7). Não houve influência do pH no PSPA, enquanto a altura, o PST e o PSR foram significativamente maiores no pH 4,0.

As plantas controle apresentaram uma maior relação entre raiz e parte aérea em todos os pH, e no pH 6,0 essa relação não foi significativamente diferente das plantas inoculadas com AS (Tabela 8). Plantas inoculadas com SH no pH 4,0 tiveram significativamente uma menor R/PA do que nos demais pH, e quando as plantas foram inoculadas com AS, a R/PA foi significativamente maior no pH 6,0 do que nos pH 4,0 e 5,0.

Tabela 6. Resumo de análise de variância bifatorial para altura, peso da biomassa seca total (PST), peso da matéria seca da parte aérea (PSPA) e da raiz (PSR) e relação raiz–parte aérea (R/PA) de macieiras inoculadas com FMA em três níveis de pH do solo.

----- Quadrado médio -----				
Fatores				
Parâmetros	Acidez (A)	Fungo (B)	Interação	Resíduo
Altura	312,6 **	1733,0 **	30,44 ñs	38,77
PST	6,62 *	72,72 **	1,72 ñs	1,87
PSPA	3,56 ñs	48,14 **	1,41 ñs	1,22
PSR	0,48 *	3,16 **	0,07 ñs	0,14
R/PA	0,13 *	0,93 **	0,06 *	0,028

* = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$, ñs = não significativo. Graus de liberdade: fator A = 2, fator B = 4, interação = 8, resíduo = 105.

Tabela 7. Altura, peso de biomassa seca total (PST), peso de matéria seca de parte aérea (PSPA) e peso de matéria seca de raiz (PSR) em plantas de macieira inoculadas com FMA em três níveis de pH.

Tratamento / Códigos dos isolados ¹	Altura (cm)	PST -----	PSPA (g) -----	PSR
Fungo				
GE	31,74 ² a ³	6,19 a	4,20 a	1,99 a
SP	33,63 a	6,35 a	4,65 a	1,70 b
SH	23,89 b	3,72 b	2,53 b	1,19 c
AS	18,58 c	3,05 bc	1,85 c	1,19 c
CO	13,65 d	2,71 c	1,46 c	1,25 c
Acidez				
pH 4,0	27,47 a	4,87 a	3,28 a	1,59 a
pH 5,0	23,25 b	4,18 b	2,79 a	1,40 b
pH 6,0	22,18 b	4,16 b	2,75 a	1,41 b

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

² Os valores representam médias de 24 repetições para o tratamento fúngico e 40 repetições para o tratamento acidez.

³ Valores na mesma coluna em um mesmo tratamento seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si segundo o teste DMS ao nível de 5% de significância.

Tabela 8. Médias de relação raiz–parte aérea de *Malus prunifolia* inoculadas com FMA em três níveis de pH.

Código dos isolados	----- pH -----					
	4,0		5,0		6,0	
GE ¹	0,51 ²	bc ³ A	0,46	c A	0,46	b A
SP	0,38	c A	0,50	c A	0,38	c A
SH	0,38	c B	0,60	bc A	0,58	b A
AS	0,60	b B	0,70	b B	0,88	a A
CO	0,84	a A	0,98	a A	0,85	a A

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

² Os valores representam médias de 8 repetições.

³ Valores seguidos pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS ao nível de 5% de significância.

As plantas de macieiras micropropagadas apresentaram uma taxa de crescimento relativamente baixa nas quatro primeiras semanas após o transplântio para os vasos (Figura 4). O maior aumento na taxa de crescimento pode ser observado no período de 29 até 42 dias após o transplântio, com exceção das plantas inoculadas com o isolado AS. As plantas inoculadas com GE e SP apresentaram taxas de crescimento semelhantes, com uma redução observada no período de 43 até 56 dias. As plantas inoculadas com SH apresentaram uma taxa de crescimento nas duas últimas semanas de cultivo estatisticamente igual àquela observada nas plantas inoculadas com SP. De uma maneira geral, as taxas de crescimento observadas nas plantas inoculadas apresentaram valores semelhantes, com exceção daqueles registrados no período de 29 até 42 dias, e foi este diferencial que proporcionou maior altura às plantas inoculadas com GE e SP. Ao contrário das plantas inoculadas, aquelas do tratamento controle mantiveram ininterrupto o aumento nos valores da taxa de crescimento. O baixo relativo crescimento produziu, no entanto, plantas significativamente menores em comparação com aquelas inoculadas.

As plantas inoculadas cultivadas em pH 4,0 e 6,0 tiveram um crescimento mais uniforme do que as plantas não inoculadas (Figura 5), com exceção das plantas inoculadas com AS em pH 4,0. No pH 5,0, porém, as plantas não associadas cresceram de maneira mais uniforme. As plantas com crescimento menos uniforme no pH 5,0 foram aquelas inoculadas com AS e SP, que apresentaram coeficientes de variação 144 e 116% maiores do que as plantas controle. Em média, as plantas cultivadas no pH 4,0 apresentaram crescimento

mais uniforme seguidas das plantas cultivadas no pH 6,0 e finalmente as plantas cultivadas no pH 5,0.

Os maiores valores de dependência micorrízica relativa (DMR) foram obtidos em plantas inoculadas com GE (52-58,3%) e com SP (50,3-63,6%) (Tabela 9). Em contraste, os valores do DMR não ultrapassaram os 38% para os outros dois isolados e variaram de 19,2 a 37,4% para plantas inoculadas com SH e 3,7 a 14,1% para plantas colonizadas por AS (Tabela 8). Os maiores valores de DMR para plantas colonizadas por GE e SP foram obtidos no pH 5,0, enquanto que esses valores foram maiores no pH 4,0 para plantas colonizadas por SH e AS.

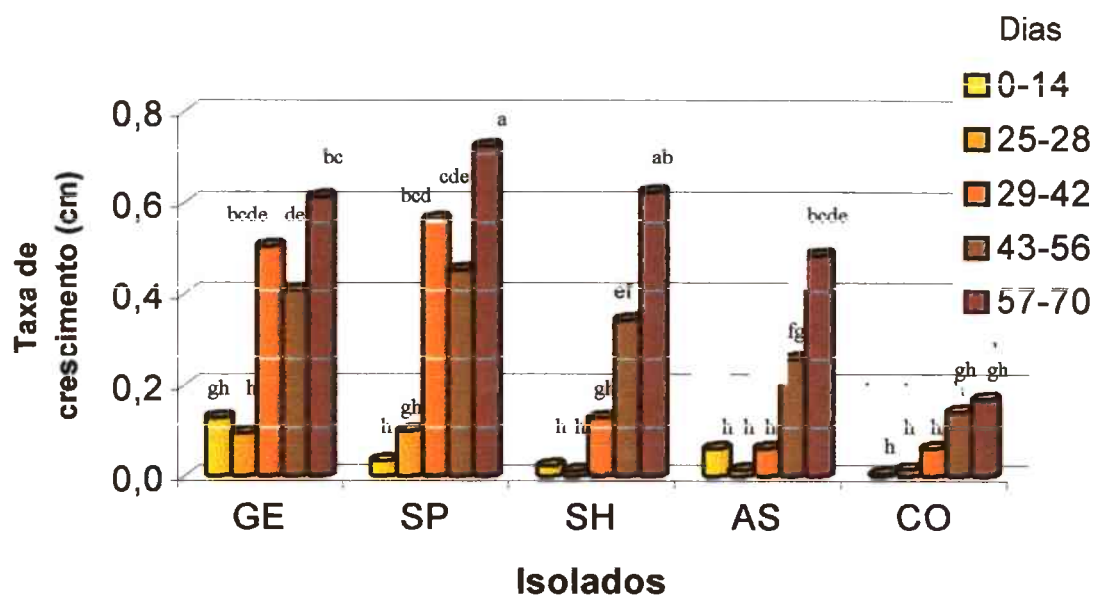


Figura 4. Taxa de crescimento diário de planta de *Malus prunifolia* cultivadas em três níveis de pH.

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

* Os valores representam médias de 24 repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste DMS (P=0,05).

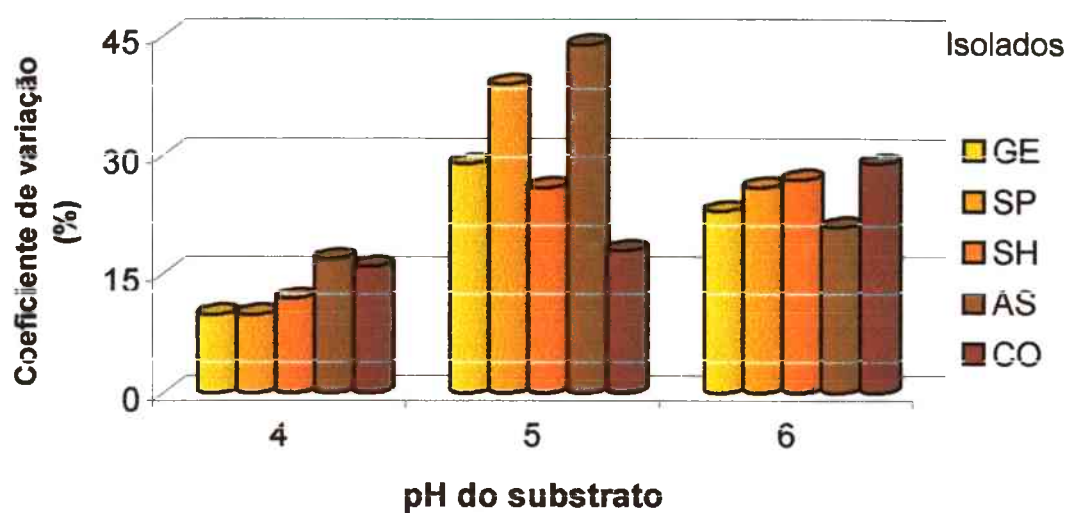


Figura 5. Coeficiente de variação de altura de plantas de macieira inoculadas com FMA em três níveis de pH.

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

Tabela 9. Dependência micorrízica relativa (%) de plantas de macieiras inoculadas com FMA em três níveis de pH

Códigos dos isolados ¹	pH		
	4,0	5,0	6,0
GE	52,0 ²	58,3	57,9
SP	50,3	63,6	57,1
SH	37,4	19,2	22,3
AS	14,1	13,5	3,7

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

² Os valores foram calculados utilizando-se a biomassa total das plantas não inoculadas em cada substrato (pH 4,0, 5,0 e 6,0) e a biomassa total de cada um dos tratamentos fúngicos em cada substrato.

4.3. Concentração de minerais

Dos 13 elementos analisados, apenas N, Mg e Fe não foram significativamente influenciados pela acidez dos substratos. Por outro lado, a inoculação exerceu um efeito significativo nas concentrações de P, Zn, Cu, Ca, S, Na, N, K, Fe e Al. A interação entre os fatores acidez e fungo, foi significativa para 8 dos elementos analisados, quais sejam P, Zn, Cu, Ca, S, Na, Mn e Al (Tabela 10)

4.3.1. Parâmetros com interação significativa

As plantas colonizadas apresentaram uma maior concentração de P em todos os níveis de acidez em comparação com as plantas não inoculadas, e no pH 5,0 não houve diferenças entre isolados (Tabela 11). A maior diferença entre tratamentos na concentração de P ocorreu entre as plantas controle e aquelas inoculadas com SP no pH 6,0 (146%). A absorção de P por plantas colonizadas não foi influenciada pelo pH, com exceção de SH, cuja porcentagem de P foi menor no pH 6,0 em relação aos restantes valores.

As plantas inoculadas com GE apresentaram uma concentração de Zn significativamente maior que as plantas dos outros tratamentos no pH 6,0 (Tabela 11). A concentração de Zn nas plantas sem micorrizas não foi significativamente diferente das plantas inoculadas com SH no pH 6,0 e inoculadas com AS no pH 5,0. No pH 5,0, contudo, as plantas inoculadas com SH apresentaram a maior concentração deste elemento, representando um incremento de 82,5% em relação às plantas sem micorrizas.

Tabela 10. Resumos da análise de variância bifatorial para concentração de 13 elementos na parte aérea de plantas de macieira inoculadas com FMA em três níveis de pH.

----- Quadrado médio -----				
Fatores				
Elemento	Acidez (A)	Fungo (B)	Interação	Resíduo
Fosforo (P)	0,008 *	0,033 **	0,005 *	0,0018
Zinco (Zn)	419,3 **	496,6 **	476,8 **	41,03
Cobre (Cu)	176,2 **	191,4 **	27,8 **	2,15
Cálcio (Ca)	0,118 **	0,008 **	0,005 **	0,001
Enxofre (S)	0,013 **	0,006 **	0,007 **	0,0013
Sódio (Na)	43158 **	11359 **	13905 **	1713,12
Manganês (Mn)	183617 **	10294 ñs	46504 **	13013
Alumínio (Al)	50,68 **	21,73 **	24,74 **	5,98
Nitrogênio (N)	0,03 ñs	0,03 *	0,018 ñs	0,011
Magnésio (Mg)	0,007 ñs	0,013 ñs	0,014 ñs	0,009
Potássio (K)	0,201 **	0,025 **	0,007 ñs	0,006
Ferro (Fe)	6527,76 ñs	14750,8 **	1143,07 ñs	2885,7
Boro (B)	2308,91 **	113,75 ñs	117,29 ñs	125,5

* = $P \leq 0,05$, ** = $P \leq 0,01$, ñs = não significativo.

Graus de liberdade: fator A = 2, fator B = 4, interação = 8, resíduo = 105.

Graus de liberdade do resíduo de: Mg = 97; K = 95, B = 87; N = 95 e Na = 104.

Tabela 11. Médias de concentração de seis elementos na parte aérea de plantas de macieira inoculadas com FMA em três níveis de pH.

	Código dos Isolados ¹	pH		
		4,0	5,0	6,0
P (%)	GE	0,121 ² b ³ A	0,133 a A	0,133 a A
	SP	0,160 a A	0,157 a A	0,160 a A
	SH	0,166 a A	0,146 a A	0,123 b B
	AS	0,126 b A	0,130 a A	0,101 b A
	CO	0,085 c A	0,068 b B	0,065 c B
Zn (ppm)	GE	37,13 bc B	35,88 b B	44,13 a A
	SP	40,38 ab A	30,63 bc B	31,00 b B
	SH	44,25 a B	52,00 a A	24,00 c C
	AS	36,38 bc A	27,75 c B	33,50 b AB
	CO	33,00 c A	28,50 c AB	26,13 c B
Cu (ppm)	GE	7,21 c B	9,05 bc A	8,13 b AB
	SP	15,14 a A	10,88 a B	9,88 a B
	SH	16,18 a A	9,88 ab B	7,85 b C
	AS	8,83 b A	7,20 c B	4,70 c C
	CO	7,60 bc A	4,93 d B	3,64 c B
Ca (%)	GE	0,373 b C	0,541 a B	0,574 b A
	SP	0,403 ab C	0,564 a B	0,638 a A
	SH	0,404 ab B	0,546 a A	0,511 c A
	AS	0,424 a B	0,526 a A	0,508 c A
	CO	0,388 ab A	0,468 b A	0,468 c A
S (%)	GE	0,070 b B	0,088 ab B	0,121 a A
	SP	0,083 ab B	0,070 b B	0,139 a A
	SH	0,100 a A	0,090 a A	0,091 b A
	AS	0,079 b A	0,076 ab A	0,089 bc A
	CO	0,075 b A	0,078 ab A	0,085 c A
Na (ppm)	GE	49,00 bc B	56,88 a B	148,63 a A
	SP	67,50 b B	46,25 ab B	130,38 a A
	SH	64,13 bc A	61,63 a A	54,63 b A
	AS	163,75 a A	13,00 b B	143,14 a A
	CO	24,75 bc B	48,13 ab AB	79,25 b A

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

² Os valores representam médias de 8 repetições.

³ Valores seguidos pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS ao nível de 5% de significância.

As plantas inoculadas com SH e SP apresentaram concentração de Cu duas vezes maior que as plantas sem micorrizas em todos os níveis de pH (Tabela 11). As plantas inoculadas com SP apresentaram também uma maior concentração deste elemento nos pH 5,0 e 6,0. A concentração de Cu na parte aérea foi significativamente maior no pH 4,0 do que nos demais pH para todos os tratamentos, com exceção do GE (Tabela 11).

A porcentagem de Ca foi maior nas plantas com micorrizas do que nas plantas sem micorrizas no pH 5,0 (Tabela 11). No pH 6,0, as plantas inoculadas com GE e SP tiveram as maiores porcentagens de Ca, superando as plantas controle em 23 e 36%, respectivamente, enquanto que a porcentagem de Ca nas plantas inoculadas com SH e AS não diferiu do tratamento controle. O pH influenciou a concentração de Ca nos tecidos vegetais, com exceção das plantas controle. Para todas as plantas inoculadas com GE e SP, a concentração deste elemento foi significativamente maior em pH 6,0 e menor em pH 4,0, com exceção das plantas sem micorrizas.

As plantas inoculadas com GE e SP e cultivadas no pH 6,0 apresentaram concentração de enxofre superior às dos demais tratamentos, com um incremento de 42 e 67% em relação às plantas controle (Tabela 11). A concentração deste elemento foi influenciada pelo pH do substrato apenas nas plantas inoculadas com GE e SP, que apresentaram uma concentração maior deste elemento no pH 6,0.

A concentração de Na nas plantas inoculadas com AS foi significativamente maior em relação aos demais tratamentos no pH 4,0, superando as plantas não micorrizadas em 560% (Tabela 11). No pH 5,0, essa relação foi inversa e as plantas controle apresentaram uma concentração de

Na 270% maior do que as plantas inoculadas com AS. A inoculação com GE e SP aumentou significativamente a concentração de Na no pH 6,0 em relação aos outros pH. O pH não influenciou a concentração de Na em plantas colonizadas por SH e no pH 5,0 a concentração de Na foi menor nas plantas colonizadas por AS do que nos pH 4,0 e 6,0.

A concentração de Mn não diferiu significativamente entre plantas com micorrizas e sem micorrizas nos pH 4,0 e 6,0 (Tabela 12). No pH 5,0, plantas inoculadas com SH apresentaram o maior valor de Mn quando comparados aos demais tratamentos. No pH 4,0 a concentração de Al das plantas controle não diferiu daquelas inoculadas com GE, SP e AS, e as plantas inoculadas com AS apresentaram uma concentração de Al maior que as plantas controle (Tabela 12). Nos pH 5,0 e 6,0, a inoculação micorrízica diminuiu a concentração de Al na parte aérea e as plantas não inoculadas apresentaram uma absorção deste elemento 75 e 200%, em média, maior do que as plantas inoculadas.

4.3.2. Parâmetros com interação não significativa

As plantas inoculadas com SP, SH e AS tiveram uma maior porcentagem de N na parte aérea do que as plantas controle e não houve diferenças na porcentagem de N entre plantas inoculadas com GE e plantas sem micorrizas (Tabela 13). A concentração de Mg e B não foi afetada pelos FMA. Relativamente ao controle, a inoculação com FMA aumentou a concentração de K e diminuiu a concentração de Fe nas plantas. Com exceção de K e B, o pH dos substratos não exerceu influência na concentração desses cinco elementos na parte aérea das plantas.

Tabela 12. Concentração de manganês (Mn) e alumínio (Al) na parte aérea de macieiras inoculadas com FMA em três níveis de pH.

	Códigos dos Isolados ¹	pH -----		
		4,0	5,0	6,0
Mn (ppm)	GE	306,13 ² a ³ A	210,13 b AB	127,88 a B
	SP	338,75 a A	147,88 b B	113,00 a B
	SH	250,75 a A	359,13 a A	114,25 a B
	AS	262,50 a A	131,50 b B	119,71 a B
	CO	240,75 a A	191,50 b AB	124,00 a B
Al (ppm)	GE	5,15 ab A	5,65 b A	1,62 b B
	SP	5,38 ab A	4,28 b A	3,05 b A
	SH	3,17 b B	5,68 b A	3,31 b AB
	AS	7,56 a A	4,78 b B	2,35 b B
	CO	4,03 b B	8,80 a A	7,14 a A

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

² Os valores representam médias de 8 repetições.

³ Valores seguidos pela mesma letra minúscula em uma mesma coluna ou pela mesma letra maiúscula em uma mesma linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste DMS ao nível de 5% de significância.

Tabela 13. Concentração de nitrogênio (N), magnésio (Mg), potássio (K), ferro (Fe) e boro (B) na parte aérea de plantas de macieira inoculadas com FMA em três níveis de pH.

Códigos dos Isolados ¹	N	Mg	K	Fe	B
	----- (%) -----			----- (ppm) -----	
Fungo					
GE	1,38 ² ab ³	0,205 a	1,054 a	65,83 b	22,08 a
SP	1,40 a	0,244 a	1,064 a	78,92 b	24,58 a
SH	1,44 a	0,207 a	1,051 a	90,67 b	23,89 a
AS	1,39 a	0,206 a	0,993 a	92,92 b	28,18 a
CO	1,32 b	0,187 a	0,855 b	132,00 a	24,50 a
Acidez					
pH 4,0	1,41 a	0,220 a	1,107 a	106,48 a	33,74 a
pH 5,0	1,36 a	0,203 a	1,085 a	87,60 a	22,98 b
pH 6,0	1,40 a	0,207 a	0,819 b	82,13 a	17,22 c

¹ GE: *Glomus etunicatum*; SP: *Scutellospora pellucida*; SH: *Scutellospora heterogama*; AS: *Acaulospora scrobiculata*; CO: plantas não inoculadas.

² Os valores representam médias de 24 repetições para o tratamento fúngico e 40 repetições para o tratamento acidez.

³ Valores na mesma coluna em um mesmo tratamento seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si segundo o teste DMS ao nível de 5% de significância.

DISCUSSÃO

O bioensaio com milho foi uma técnica adequada para selecionar o solo de pomar com potencial de inóculo mais elevado. Após 40 dias, as plantas de milho cultivadas no solo do pomar CA1 apresentaram a maior porcentagem de colonização radicular (37%), enquanto a porcentagem de colonização nas plantas cultivadas nos solos dos outros pomares variou de 10-19% (Figura 2). Dessa forma, o solo do pomar CA1 foi selecionado por possuir o maior potencial de inóculo entre os solos estudados, apesar da sua baixa densidade de esporos (20 esporos/100g de solo). Considerando que o potencial de inóculo depende da infectividade do fungo e da densidade dos seus propágulos, pode-se conjecturar que os FMA presentes no solo de CA1 dispunham de uma alta infectividade e foram, conseqüentemente, aptos a colonizarem rapidamente as raízes, características fundamentais para a seleção (ABBOTT & ROBSON, 1981). Por outro lado, o elevado potencial de inóculo do solo CA1 pode ter resultado dos outros propágulos além dos esporos, tais como segmentos de raízes colonizadas e hifas extra-radiciais presentes no solo, cuja densidade não foi determinada e podem também ter sido responsáveis pela infecção inicial nas plantas. A baixa densidade de esporos em agrossistemas não é esperada, segundo SIQUEIRA, COLOZZI-FILHO e OLIVEIRA (1989), que recuperaram duas vezes mais esporos de FMA em agrossistemas do que em ecossistemas naturais. Contrastando com os resultados obtidos nesse estudo, MILLER, DOMOTO e WALKER (1985b), encontraram quantidades de esporos que variaram de 62 a 2150/ 100 g de solo em 18 pomares de macieira nos Estados Unidos.

O baixo número de esporos encontrado no pomar CA1 pode ter comprometido a identificação das espécies e dificultado o estabelecimento de culturas de isolados de FMA e, nesta situação é recomendado o uso de culturas-armadilha para aumentar a quantidade de esporos (STUTZ & MORTON, 1998). Das 11 espécies de FMA detectadas no solo do pomar CA1, sete foram encontradas apenas após cultura-armadilha, indicando que a ausência de esporulação não indica a ausência do fungo (STUTZ & MORTON, 1998). Alguns estudos têm demonstrado a eficiência desta técnica para a detecção de FMA que não esporulam em condições de campo. MILLER et al. (1985b), por exemplo, recuperaram esporos de 41 espécies em pomares de macieiras dos Estados Unidos, sendo que 17 espécies foram recuperadas apenas após cultura-armadilha. Um nível mínimo de colonização radicular parece ser necessário para que o processo de esporulação seja desencadeado em espécies de *Scutellospora* (FRANKE & MORTON, 1998) e *Acaulospora* (GAZEY, ABBOTT, ROBSON, 1992) e essa poderá ter sido uma das causas da ausência de esporulação por certas espécies no campo. Neste estudo, os dois isolados mais eficientes, *Glomus etunicatum* e *Scutellospora pellucida*, não estavam presentes no solo na forma de esporos e foram recuperados apenas após cultura-armadilha. Pode-se sugerir que, a campo, esses dois fungos não tenham investido na produção de esporos e tenham alocado recursos para a produção de micélio extra-radicular e intra-radicular, e arbúsculos, estruturas diretamente relacionadas com a eficiência de um fungo (GRAHAM, LINDERMAN, MENGE, 1982; SMITH & READ, 1997). Por outro lado, BEVER et al. (1996) sugerem que a esporulação de um isolado pode depender da espécie vegetal a qual está associado. Dessa maneira, o hospedeiro utilizado

nas culturas-armadilha pode ter estimulado a esporulação de determinadas espécies de FMA ao mesmo tempo em que inibiu a esporulação de outras.

O aumento do pH do solo original (4,0) para 5,0 e 6,0 não influenciou significativamente a colonização radicular, com exceção das plantas inoculadas com SH, que tiveram a colonização reduzida com a diminuição da acidez. Este fato indica que os isolados de FMA selecionados para o experimento estavam adaptados às variações de pH no solo. Uma das razões para essa plasticidade no crescimento vegetativo dentro da raiz pode ser o histórico do manejo do solo nos pomares de macieira. Na região de Caçador, os solos são originalmente ácidos e foram corrigidos com a adição de calcário para o estabelecimento dos pomares. Desta forma, a comunidade micorrízica pode estar adaptada à variação de pH. Em outros estudos, a variação no pH exerceu significativa influência na colonização radicular de isolados de FMA. MAMO & KILLHAM (1987), por exemplo, inocularam *Glomus macrocarpum* e *G. mosseae* em plantas de *Eragrostis tef* e verificaram que a colonização foi significativamente maior com a aplicação de calcário. Segundo SIEVERDING (1991), no entanto, a sensibilidade de isolados de FMA em relação à calagem, pode ser uma característica da espécie. Entre todos os isolados usados neste experimento, os maiores valores de colonização radicular em todos os níveis de pH foram apresentados por *Scutellospora pellucida*, o que corrobora o fato de que *S. pellucida* poderá preferencialmente investir seus recursos na produção de estruturas vegetativas ao invés de esporos.

A inoculação das plantas com isolados de FMA, no estágio *post vitro*, foi eficiente no estímulo ao crescimento da macieira. Ao final de 70 dias, as plantas inoculadas com GE e SP foram significativamente maiores que as dos

outros tratamentos. As plantas inoculadas com SH apresentaram altura maior do que as inoculadas com AS, e as plantas sem micorriza foram as menores. Às avaliações de altura das plantas foram obtidas na ocasião do transplântio e subsequente a cada duas semanas. A média de incremento diário foi de 0,045cm nas primeiras quatro semanas (0-28 dias) e 0,26cm entre os 29 e 42 dias, o que representou um aumento de 478%, e atingiu o valor máximo de 0,52cm nas duas últimas semanas de cultivo. Segundo FORTUNA et al. (1992), a baixa taxa de crescimento inicial das plântulas pode ter duas causas: a primeira corresponderia à fase *lag* do crescimento do isolado fúngico, responsável pelo retardamento da colonização, e, conseqüentemente, dos benefícios às plantas; a segunda causa, poderia resultar de um bloqueio no crescimento apical das plantas micropropagadas devido a um "choque" causado pelo transplântio. Neste experimento, o potencial de inóculo de cada cultura não foi estimado antes do experimento, e o único dado coletado foi número de esporos por 100g de substrato (GE=37, SP=311, SH=4.524 e AS=54). Como o número de esporos presentes no substrato aparentemente não foi limitante para a infecção e para a colonização radicular, parece mais provável que a baixa taxa de crescimento das plântulas tenha sido resultado do transplântio das mudas de um substrato fértil nas bandejas para um substrato menos fértil e ácido. Outra constatação que reforça esta segunda hipótese é o fato de que as plantas não inoculadas também apresentaram crescimento inferior nas duas semanas iniciais.

A inoculação de isolados de FMA aumentou a uniformidade das plantas de macieiras micropropagadas em pH 4,0 e 6,0 como demonstrado na figura 4. Nestes níveis de acidez, todas as plantas com micorrizas exceto aquelas

inoculadas com AS no pH 4,0 apresentaram um coeficiente de variação menor do que as plantas sem micorrizas. Estes resultados confirmam o fato já evidenciado por outros pesquisadores, que verificaram que plantas inoculadas são mais uniformes do que plantas sem micorrizas (PLENCHETTE et al. 1981; BRANZANTI et al. 1992; UOSUKAINEN & VESTBERG, 1994).

A produção de biomassa pelas plantas de macieira acompanhou a tendência dos resultados de avaliação de incremento em altura. As plantas inoculadas com GE e SP produziram quantidades de matéria seca de parte aérea (PSPA) e de raiz (PSR) maiores do que as dos outros tratamentos, enquanto as plantas inoculadas com SH e AS tenderam a não diferir das plantas do tratamento controle. Estes resultados confirmam a hipótese de BRANZANTI et al. (1992), segundo a qual a inoculação com FMA garante o máximo crescimento de plântulas de macieiras sob condições de solo com baixa fertilidade, embora a eficiência dependa do isolado fúngico. GUILLEMIN et al. (1992) inocularam abacaxizeiros micropropagados com um isolado de *Scutellospora pellucida* (LPA20), três isolados de *Glomus* sp. (LPA21, LPA22 e LPA25) e um de *Glomus clarum* (LPA16) e observaram que o isolado de *Scutellospora pellucida* não foi eficiente na promoção do crescimento das plantas em relação aos outros isolados. No presente trabalho, porém, o isolado de *S. pellucida* foi um dos fungos mais eficientes, tanto na promoção do crescimento vegetativo como na absorção de P pelas plantas de macieira micropropagadas. Esses resultados reforçam a hipótese que a espécie de FMA não é a unidade taxonômica apropriada para explicar os processos que envolvem a associação micorrízica, tais como a absorção de nutrientes e a

eficiência do fungo na promoção do crescimento do hospedeiro (MORTON, 1993).

Apesar de 11 espécies de FMA terem sido recuperadas do pomar CA1, apenas quatro isolados foram cultivados. Dentre os fungos cultivados, três foram mais eficientes no aumento da biomassa da parte aérea e total em comparação ao tratamento sem micorriza. Apenas o isolado de *Acaulospora scrobiculata* não foi mais eficiente no estímulo à produção de biomassa em comparação ao inóculo sem micorriza. A fertilização do solo por um longo período de tempo pode selecionar isolados de FMA menos eficientes (JOHNSON, 1993). Segundo esta pesquisadora, esta situação pode ocorrer quando o fungo se adapta à sobrevivência na rizosfera com níveis baixos de exudatos radiculares, como ocorre em plantas fertilizadas, não investindo, assim, na produção de micélio extra-radicial, fato que poderá reduzir os efeitos benéficos da simbiose. Embora nem todos os fungos da comunidade micorrízica do solo de CA1 tenham sido avaliados quanto à sua eficiência, os resultados neste estudo não respaldam a hipótese de JOHNSON (1993).

A inoculação dos isolados de FMA nas plantas de macieiras influenciou a relação raiz/parte aérea (R/PA) das plantas. Em todos os substratos, as plantas não inoculadas apresentaram valores de R/PA significativamente maiores em comparação com as inoculadas, com exceção daquele a pH 6,0 onde não houve diferenças entre AS e plantas controle. A diminuição da R/PA devido à inoculação com isolados de FMA foi constatada por diversos autores em diversas espécies de hospedeiros (SCHUBERT & HAYMAN, 1986; RAJU et al., 1988; GUILLEMIN et al. 1992). Por outro lado, BRANZANTI et al. (1992) observaram que a inoculação com FMA aumentou, reduziu ou não teve

nenhum efeito na R/PA de macieiras micropropagadas. Esta redução relativa na quantidade de massa radicular produzida pode ser benéfica para o hospedeiro, uma vez que pode também reduzir o gasto de carbono pelos exudatos radiculares em comparação a uma planta do mesmo tamanho sem micorriza (JOHNSON, GRAHAM, SMITH, 1997). Um resultado interessante é que as plantas inoculadas com *A. scrobiculata*, um dos isolados menos eficientes, tiveram os valores R/PA similares aos das plantas controle. Isso sugere que AS pode não ser um fungo eficiente para macieira, podendo mesmo desenvolver uma relação parasítica ao invés de mutualística.

Os diferentes isolados de FMA influenciaram o crescimento das plantas de diferentes maneiras. Os valores de dependência micorrízica relativa (DMR) indicam que as plantas de macieira foram mais dependentes quando associadas com GE (52-58,3%) e SP (50,3-63,6%) em todos os níveis de pH e menos dependentes quando associadas com AS (3,7-14,1%). Essas diferenças se devem a estímulos diferenciados dos isolados de FMA em relação aos hospedeiros, o que reforça a necessidade de seleção de isolados eficientes (GUILLEMIN et al., 1992). Os valores de dependência encontrados são inferiores àqueles registrados na literatura. GEDDEDA et al. (1984) observaram que os valores de dependência de macieira variaram de 81-92%. Para macieiras micropropagadas, BRANZANTI et al. (1992) registraram valores de dependência variando de 63-90% em plantas cultivadas em 4 e 8 ppm de P. Os mesmos autores observaram que, em plantas cultivadas com 40 ppm de P no solo, a dependência foi apenas de 6,2%, um valor comparável ao das macieiras inoculadas com AS no pH 6,0 neste experimento.

Os três elementos cujas concentrações são mais freqüentemente aumentadas pela inoculação com FMA são P, Zn e Cu (BOLAN, 1991). Neste experimento, a concentração de fósforo na planta foi significativamente estimulada pela inoculação, e as plantas associadas aos isolados de FMA apresentaram níveis deste elemento superiores aos das plantas controle em todos os níveis de pH. Esses valores diferem dos resultados de BRANZANTI et al. (1992), que não observaram variação na concentração de P devido à inoculação com FMA. A maior absorção deste elemento pode ser explicada pelos baixos níveis de fósforo nos solos (pH 4,0=3,4ppm; pH 5,0=2,7ppm; pH 6,0=4,1ppm), que não foram suficientemente altos para inibir a colonização e a atividade das micorrizas. Tal inibição foi observada por HABTE & SOEDARJO (1996) em experimento com *Acacia mangium* cultivada em substrato irrigado com uma solução de 0,8ppm de P (KH_2PO_4). Outros autores verificaram que altos níveis de P inibiram a resposta do hospedeiro à inoculação. SIEVERDING & HOWELER (1985) inocularam plantas de mandioca com *Glomus occultum*, *G. manihotis* e *Entrophospora colombiana*, e verificaram que, quando quantidades equivalentes a 200Kg de P/ha foram aplicadas, não ocorreram diferenças no estímulo dos isolados no crescimento de plantas, ao contrário do que aconteceu quando doses menores (50 e 100 Kg de P/ha) foram aplicadas. SAINZ & ARINES (1988) não observaram resposta de trevo vermelho à inoculação com uma população natural de FMA quando doses de 200mg/Kg de P foram adicionadas.

Neste experimento, a maior concentração de fósforo foi detectada em plantas inoculadas com SH em substrato com pH 4,0 (0,166%), enquanto o menor valor foi registrado em plantas não inoculadas cultivadas no pH 6,0

(0,065%). As plantas com micorriza apresentaram média de 0,138%, enquanto as plantas não associadas registraram um valor médio de 0,073%. Em experimentos com macieiras, PLENCHETTE et al. (1981), GEDDEDA et al. (1984) e BRANZANTI et al. (1992) encontraram os valores máximos de 0,18, 0,19 e 0,18% (análise foliar) de concentração de P, respectivamente. Os valores encontrados neste experimento estão abaixo daqueles recomendados por BASSO, WILMS e SUZUKI (1986), segundo os quais a concentração ideal de P no tecido foliar das macieiras deverá ser de 0,15 até 0,30%. Apenas as plantas inoculadas com SP apresentaram concentrações de P ideais em todos os níveis de pH. As análises de elementos neste experimento, contudo, foram efetuadas utilizando-se o caule e folhas, portanto, comparações diretas não devem refletir o real estado nutricional das plantas. Além disso, as concentrações consideradas ideais são esperadas em plantas cultivadas com níveis ótimos de todos os nutrientes, diferentemente deste experimento, cujos substratos utilizados apresentavam baixos níveis de fósforo e da maioria dos elementos.

As concentrações de P do tecido de parte aérea das plantas de macieira não acompanharam o efeito do isolado no estímulo à produção de biomassa. As plantas inoculadas com os isolados GE e SP apresentaram níveis similares deste elemento em seus tecidos em comparação com plantas inoculadas com AS e SH, respectivamente. No entanto, GE e SP foram mais eficientes do que AS e SH no estímulo ao crescimento e na produção de biomassa aérea e radicular.

A inoculação com FMA aumentou as concentrações de Zn e Cu na maioria dos tratamentos. As plantas inoculadas com SP e SH apresentaram

concentrações de Cu superiores às das plantas controle em todos os substratos e a concentração desse elemento foi mais alta no pH 4,0, com exceção das plantas inoculadas com GE (Tabela 10). A concentração de zinco também foi maior nas plantas dos tratamentos SP e SH em pH 4,0. Neste experimento, as concentrações máximas e mínimas foram de 52 e 24 ppm para Zn e 16,1 e 3,6 ppm para Cu. A maioria dos resultados para esses dois elementos, portanto, ficou dentro da faixa normal para plantas de macieira, que é de 20 até 100ppm para Zn e 5 a 30ppm para Cu (BASSO et al., 1986). Segundo KILLHAM & FIRESTONE (1983), tais concentrações são consideradas normais, haja vista maior solubilidade e biodisponibilidade destes elementos em solos ácidos.

O Ca na macieira tem um papel importante, visto que plantas deficientes alocam menores quantidades desse elemento para os frutos, influenciando a qualidade comercial (BASSO et al., 1986). Neste trabalho, o maior efeito da inoculação ocorreu nos solos corrigidos com pH 5,0 e 6,0. A inoculação com todos os isolados fúngicos no pH 4,0 não diferiu das plantas controle enquanto que no pH 5,0 resultou a maior absorção de Ca quando comparado com plantas controle. No pH 6,0, plantas inoculadas com GE e SP tiveram maiores concentrações de Ca do que os outros tratamentos. Esse efeito diferenciado da inoculação pode ser devido ao conteúdo de K e Mg no solo, que foram médio e alto nos pH 5,0 e 6,0 e suficiente e médio no pH 4,0, respectivamente. A maior disponibilidade de K e Mg pode induzir à falta de Ca na planta (BASSO et al., 1986) como ocorreu nos pH 5,0 e 6,0 onde a associação micorrízica promoveu uma maior absorção desse elemento. Apesar do efeito da inoculação, os valores de Ca encontrados nas macieiras são ainda

insuficientes visto estarem abaixo de 0,80% (BASSO et al., 1986). Não pode ser descartado também o efeito do pH na disponibilidade de Ca, visto que a concentração desse elemento tendeu a aumentar do pH 4,0 para o pH 6,0, embora isso tenha sido observado nas plantas controle.

As plantas inoculadas com AS apresentaram os maiores valores de concentração de Al no pH 4,0. Nos substratos com pH 5,0 e 6,0 (para GE e SP apenas), no entanto, as plantas sem micorrizas apresentaram concentrações deste elemento superiores às plantas inoculadas com os quatro isolados. Dessa forma, a inoculação micorrízica apresentou um efeito protetor no pH 5,0 e 6,0, e o isolado SP foi o mais eficiente na proteção das plantas contra a absorção de Al em todos os níveis de acidez. Resultados semelhantes foram registrados por MENDOZA & BORIE (1998) que inocularam *Glomus etunicatum* em cevada cultivada em substrato álico, com pH 4,8 e verificaram que as plantas não inoculadas apresentaram uma concentração de Al maior tanto na parte aérea quanto nas raízes. Em outros trabalhos, não foi verificada uma maior absorção de Al em plantas inoculadas. BORIE & RUBIO (1999), por outro lado, usando duas variedades de cevada (tolerante e sensível ao Al), e inoculadas com *G. etunicatum*, observaram que a inoculação aumentou a concentração de Al nas plantas sensíveis em relação às plantas não inoculadas, mas não nas plantas tolerantes. Após a correção da acidez, no entanto, a concentração deste elemento nas plantas com micorrizas e sensíveis foi a metade do valor presente nas plantas sem micorrizas. Estes resultados demonstram que o efeito protetor contra os altos níveis de Al do solo não dependem exclusivamente da comunidade micorrízica, mas também da

sensibilidade natural da planta a este elemento, bem como do pH do substrato de cultivo.

Alguns resultados interessantes em relação à concentração de elementos no tecido foliar das macieiras e sua relação com a produção de biomassa vegetal devem ser ressaltados. As plantas inoculadas com SH, por exemplo, aumentaram a absorção de alguns nutrientes essenciais (N, P e K) em relação às plantas controle. Além disso, as plantas inoculadas com este isolado apresentaram as maiores concentrações, em valores absolutos, de diversos elementos em relação às plantas inoculadas com os outros isolados, como Zn (em pH 4,0 e 5,0), Cu (em pH 4,0), S (em pH 4,0 e 5,0) e Na (em pH 5,0). No entanto, a eficiência deste isolado em estimular a produção de biomassa vegetal foi relativamente menor em comparação com SP e GE. Isso indica que outros mecanismos além da absorção de nutrientes são determinantes para a produção de biomassa nas plantas inoculadas com SH. Além disso, isso pode ser uma evidência do papel multifuncional desempenhado pelos FMA numa comunidade vegetal (NEWSHAM, FITTER, WATKINSON, 1985). Esses autores sugerem que a absorção de nutrientes, apesar de ser o processo mais pesquisado, não é o benefício mais importante advindo da simbiose em determinados ecossistemas. Em ecossistemas temperados, por exemplo, a proteção da espécie hospedeira contra patógenos é tão ou mais importante para as plantas do que a absorção de nutrientes. Pode-se especular que, no sistema de pomar de macieira estudado, o isolado SH não seja eficiente em promover o acúmulo de biomassa vegetal, porém desempenhe o papel de aumentar a absorção de certos nutrientes do solo.

Embora a associação micorrízica seja freqüentemente considerada um exemplo de uma associação mutualística, existe um *continuum* quanto à resposta das plantas à colonização micorrízica que pode variar entre uma resposta positiva (mutualismo) passando por neutra (comensalismo) até negativa (parasitismo) (JOHNSON et al., 1997). Neste trabalho, esse *continuum* é evidenciado quando se analisam os efeitos dos diferentes isolados fúngicos no acúmulo de biomassa e absorção de nutrientes nas plantas. Num extremo, o isolado de *Acaulospora scrobiculata* se aproximou da resposta parasítica, uma vez que seu efeito na produção de biomassa total e absorção da maioria dos nutrientes não foi significativamente diferente das plantas não inoculadas, além de ter absorvido a maior quantidade de Al em condições de baixo pH. Já a inoculação com *Scutellospora heterogama* proporcionou valores superiores às plantas controle no PSPA e biomassa total, mas não no PSR; além disso, a absorção de alguns nutrientes em determinados pH (Zn, S, Mn) foi a maior. Finalmente, os isolados GE e SP foram os mais benéficos para as plantas e se aproximaram do extremo mutualístico. As macieiras inoculadas com estes fungos foram mais altas, produziram mais biomassa do que as plantas não inoculadas, e as inoculadas com SP, apresentaram níveis normais de P, Zn, Cu, Fe e Mn na parte aérea em todos os níveis de pH. Esse tipo de análise é fundamental na identificação da proporção de fungos eficientes e não-eficientes que compõem uma comunidade micorrízica. Os resultados da análise proporcionam uma maior compreensão de como a simbiose micorrízica funciona em sistemas naturais, um pré-requisito necessário para o manejo e uso dos FMA na agricultura (JOHNSON et al., 1997).

Os quatro isolados de FMA utilizados neste experimento estavam bem adaptados a variações de pH. Apesar das diferenças significativas entre os isolados, não houve variações marcantes na eficiência de cada um nos diferentes substratos. O estímulo de cada um dos isolados na produção de matéria vegetal aérea, por exemplo, não foi significativamente afetado pelo pH. Tais características são importantes quando se objetiva a produção de um inóculo comercial para a inoculação a campo, pois nestas condições a variabilidade é regra, ao contrário do que ocorre nos experimentos em vasos e em casa de vegetação. O inoculante ideal deve ser eficiente sob influência de diversos fatores, tais como as condições ambientais, principalmente as características do solo e espécie vegetal (LOVATO et al., 1992). Em condições de campo, por outro lado, outras características são importantes para os isolados além da eficiência, quais sejam a capacidade reprodutiva e persistência, além de capacidade de competir com a biota indígena (LAMBERT, COLE JR, BAKER, 1980). Nessas condições, um inóculo de FMA composto por mais de um isolado poderá ser mais eficiente, pois terá mais plasticidade para se adaptar às diversas variáveis existentes em um ecossistema natural. De acordo com SCHREINER & BETHLENFALVAY (1997), uma comunidade de isolados pode beneficiar mais eficientemente a relação fungo-hospedeiro-ambiente em comparação com um único isolado. Neste experimento, foi possível demonstrar a existência de isolados de FMA eficientes no estímulo ao crescimento e na absorção de nutrientes em plantas de macieiras cultivadas em substratos ácidos. Contudo, estudos subseqüentes devem ser conduzidos com o objetivo de avaliar a eficiência dos isolados a campo, de modo a constatar se, em tais condições, a sua eficiência será ou

não mantida. Além desse aspecto, combinações de diferentes isolados devem ser experimentadas, com o fim de se produzir um inóculo misto mais benéfico ao hospedeiro que cada isolado isoladamente. Dessa forma, poderá ser produzido um inóculo composto por isolados eficientes com mecanismos diversificados de atuação, e com grande potencial para inoculações a campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. - Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum type. **Aust. J. Agric. Res.**, **32**: 631-639, 1981.
- ARINES, J.; VILARIÑO, A.; SAINZ, M. - Effect of different inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on manganese content and concentration in red clover (*Trifolium pratense* L.) plants. **New Phytol.**, **112**:215-219, 1989.
- BASSO, C. & SUZUKI, A. - Resposta da macieira cv. Golden Delicious à adubação nitrogenada. **R. bras. Ci. Solo**, **16**:223-227, 1992.
- BASSO, C.; WILMS, F.W.W.; SUZUKI, A. - Fertilidade do solo e nutrição da macieira. In: EMPRESA CATARINENSE DE PESQUISA AGROPECUÁRIA S.A. - **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, EMPASC, 1986.
- BEVER, J.D.; MORTON, J.D.; ANTONOVICS, J.; SCHULTZ, P.A. - Host-dependent sporulation and species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in a mown grassland. **J. Ecol.**, **84**:71-82, 1996.
- BOLAN, N.S. - A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. **Plant Soil**, **134**:189-207, 1991.
- BORIE, F. & RUBIO, R. - Effects of arbuscular mycorrhizae and liming on growth and mineral acquisition of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive barley cultivars. **J. Plant Nutr.**, **22**:121-137, 1999.
- BRANZANTI, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. - Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrient status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage. **Agronomie**, **12**:841-845, 1992.
- DODD, J.C. & THOMSON, B.D. - The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K., MALAJCZUK, N., ed. - **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. Holanda, 1994. p.149-158.
- EL-KHERBAWY, M.; ANGLE, J. S.; HEGGO, A.; CHANEY, R. L. - Soil pH, rhizobia, and vesicular-arbuscular mycorrhizae inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Biol. Fertil. Soils**, **8**:61-65, 1989.
- FORTUNA, P.; CITERNESI, S.; MORINI, S.; GIOVANNETTI, M.; LORETI, F. - Infectivity and effectiveness of different species of arbuscular mycorrhizal fungi in micropropagated plants of Mr S 2/5 plum rootstock. **Agronomie**, **12**:825-829, 1992.
- FRANKE, M. & MORTON, J.B. - Ontogenetic comparisons of arbuscular mycorrhizal fungi *Scutellospora heterogama* and *Scutellospora pellucida*: revision of taxonomic character concepts, species descriptions, and phylogenetic hypotheses. **Can. J. Bot.**, **72**:122-134, 1994.
- GAZEY, C.; ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. - The rate of development of mycorrhizas affects the onset of sporulation and production of external hyphae by two species of *Acaulospora*. **Mycol. Res.**, **96**:643-650, 1992.

- GEDDEDA, Y.I.; TRAPPE, J.M.; STEBBINS, R.L. – Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae and phosphorus on apple seedlings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **109**:24-27, 1984.
- GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. - Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. mycol. Soc.*, **46**:235-244, 1963.
- GERDEMANN, Y.I. – Vesicular-arbuscular mycorrhizae. In: TORREY, J.G. & CLARKSON, D.T. eds. - **The development and function of roots**. New York, Academic Press, 1975. p.757-591.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. – An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, **84**:489-500, 1980.
- GRAHAM, J.H.; LINDERMAN, R.G.; MENGE, J.A. – Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal fungi *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of troyer citrange. *New Phytol.*, **91**:183-189, 1982.
- GRANGER, R.L.; PLENCHETTE, C.; FORTIN, J.A. - Effect of a vesicular arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus (*Glomus epigaeum*) on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated *in vitro*. *Can. J. Plant Sci.*, **63**:551-555, 1983.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. – Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BOSO, J.A. – **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília, EMBRAPA, 1991. p.183-204.
- GUILLEMIN, J.P.; GIANINAZZI, S.; TROUVELOT, A. – Screening of arbuscular endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants. *Agonomie*, **12**:831-836, 1992.
- HABTE, M. & AZIZ, T. – Response of *Sesbania grandiflora* to inoculation of soil with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environm. Microbiol.*, **52**:701-703, 1985.
- HABTE, M. & SOEDARJO, M. - Response of *Acacia mangium* to vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation, soil pH, and soil P concentration in an oxisol. *Can. J. Bot.*, **74**:155-161, 1996.
- JOHNSON, N.C. – Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? *Ecol. Applic.*, **3**:749-757, 1993.
- JOHNSON, N.C.; GRAHAM, J.H.; SMITH, F.A. – Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism-parasitism continuum. *New Phytol.*, **135**:575-585, 1997.
- KILLHAM, K. & FIRESTONE, M.K. – Vesicular arbuscular mycorrhizal mediation of grass response to acidic and heavy metal depositions. *Plant Soil*, **72**:39-48, 1983.
- KOSKE, R.E. & GEMMA, J.N.- A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycol. Res.*, **92**:486-505, 1989.
- KREUZ, C.L. - Custo de produção de maçã. *PAB*, **27**:721-726, 1992.

- LAMBERT, D.H.; COLE JR, H.; BAKER, D.E. – Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. **New Phytol.**, **85**:513-520, 1980.
- LOVATO, P.; GUILLEMIN, J. P.; GIANINAZZI, S. - Application of commercial arbuscular endomycorrhizal fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants. **Agronomie**, **12**:873-880, 1992.
- MAMO, T. & KILLHAM, K.S. – Effect of soil liming and vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth and micronutrient content of the teff plant. **Plant Soil**, **102**:257-259, 1987.
- MARSCHNER, H. - Mechanisms of adaptation of plants to acid soils. **Plant Soil**, **134**:1-20, 1991.
- MEDINA, O.A.; SYLVIA, D.M.; KRETSCHMER JR., A.E., - Response of siratro to vesicular-arbuscular fungi: I. Selection of effective vesicular-arbuscular fungi in amended soil. **Soil Sci. Soc. Amer. J.**, **52**:416-423, 1988.
- MELLO, F.A.F. – Origem, natureza e componentes da acidez do solo: critérios para calagem. In: MALAVOLTA, E. (coord.) – **Seminário sobre corretivos agrícolas**. Piracicaba, Fundação Cargill, 1985.
- MENDOZA, J. & BORIE, F. – Effect of *Glomus etunicatum* on aluminum, phosphorus, calcium and magnesium uptake of two barley genotypes with different aluminum tolerance. **Commun. Soil Sci. Plant Anal.**, **29**:681-695, 1998.
- MILLER, D. D.; DOMOTO, P. A.; WALKER, C. - Mycorrhizal fungi at eighteen apple rootstock plantings in the United States. **New Phytol.**, **100**:379-391, 1985b.
- MILLER, D.D.; DOMOTO, P.A.; WALKER, C. - Colonization and efficacy of different endomycorrhizal fungi with apple seedlings at two phosphorus levels. **New Phytol.**, **100**:393-402, 1985a.
- MOORMAN, T. & REEVES, F.B. - The role of endomycorrhizae in revegetation practices in the semi-arid west. II. A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal populations. **Amer. J. Bot.**, **66**:14-18, 1979.
- MORTON, J.B. - Problems and solutions for the integration of glomalean taxonomy, systematic biology, and the study of endomycorrhizal phenomena. **Mycorrhiza**, **2**:97-109, 1993.
- MORTON, J.B. - Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. **Mycotaxon**, **32**:267-324, 1988.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. – A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.**, **15**:473-497, 1962.
- NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. – Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Tree**, **10**:407-410, 1995.
- NUNES, J.C.O.; BARPP, A.; SILVA, F.C.; PEDROTTI, E.L. – Micropropagação do porta-enxerto Marubakaido (*Malus prunifolia*) a partir da cultura de meristemas. **Rev. Bras. Frutic.**, **21**:191-195, 1991.

- O'DONNELL, J.J.; SYLVIA, D.M.; PITMAN, W.D.; RECHCIGL, J.E. – Inoculation of *Vigna parkeri* with mycorrhizal fungi in acid Florida spodosol. **Trop. Grass.**, **26**:120-129, 1992.
- PLENCHETTE, C.; FORTIN, J.A.; FURLAN, V. – Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P – fertility. **Plant Soil**, **70**:199-209, 1983.
- PLENCHETTE, C.; FURLAN, V.; FORTIN, J. A. - Growth stimulation of apple trees in unsterilized soil under field conditions with VA mycorrhiza inoculation. **Can. J. Bot.**, **59**:2003-2008, 1981.
- POWELL, C.L. – Selection of efficient VA mycorrhizal fungi. **Plant Soil**, **68**:3-9, 1988.
- RAJU, P. S.; CLARK, R. B.; ELLIS, J. R.; MARANVILLE, J. W. - Effects of VA mycorrhizae on mineral uptake in sorghum genotypes grown on acid soil. **Commun. In Soil Sci. Plant Anal.**, **19**:909-918, 1988.
- RAVOLANIRINA, F.; GIANINAZZI, S.; TROUVELOT, A; CARRE, M. – Production of endomycorrhizal explants of micropropagated grapevine rootstocks. **Agric, Ecos. and Environm.**, **29**:323-327, 1989.
- SAINZ, M.J. & ARINES, J. – Effects of native vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate fertilizer on red clover growth in acid soils. **J. agric. Sci.**, **111**:67-73, 1988.
- SCHREINER, R.P. & BETHLENFALVAY, G.J. – Plant and soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stress. **Appl. Soil Ecol.**, **7**:93-102, 1997.
- SCHUBERT, A. & HAYMAN, D.S. – Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XVI. Effectiveness of different endophytes at different levels of soil phosphate. **New Phytol.**, **103**:79-90, 1986.
- SIEVERDING, E. – Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical ecosystems. **Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH**, Eschborn, 1991.
- SIEVERDING, E. & HOWELER, R.H. – Influence of species of VA mycorrhizal fungi on cassava yield response to phosphorus fertilization. **Plant Soil**, **88**:213-221, 1985.
- SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI-FILHO, A.; OLIVEIRA, E. DE – Ocorrência de micorrizas vesicular-arbusculares em agro e ecossistemas do estado de Minas Gerais. **PAB**, **24**:1499-1506, 1989.
- SIQUEIRA, J.O.; ROCHA JR., W.F.; OLIVEIRA, E.; COLOZZI-FILHO, A. – The relationship between vesicular-arbuscular mycorrhiza and lime: associated effects on the growth and nutrition of brachiaria grass (*Brachiaria decumbens*). **Biol. Fertil. Soils**, **10**:65-71, 1990.
- SMITH, S. E. & READ, D. J. - **Mycorrhizal Symbiosis**. London, Academic Press, 1997. 605p.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO - **Recomendação de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3 ed. Passo Fundo, SBCS - Núcleo Regional Sul, 1994.

- SOEDARJO, M. & HABTE, M. - Vesicular-arbuscular mycorrhizal effectiveness in an acid soil amended with fresh organic matter. **Plant Soil**, **149**:197-203, 1993.
- STUTZ, J.C. & MORTON, J.B. - Successive pot cultures reveal high species richness of arbuscular endomycorrhizal fungi in arid ecosystems. **Can. J. Bot.**, **74**:1883-1889, 1996.
- SUZUKI, A. & BASSO, C. - Orientações básicas para adubação e nutrição da macieira. **Agropecuária Catarinense**, **10**:41-46, 1997.
- SYLVIA, D. M. & BURKS, J. N. - Selection of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus for practical inoculation of *Uniola paniculata*. **Mycologia**, **80**:565-568, 1988.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. - **Análise de solo, planta e outros materiais**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.
- TRAPPE, J. M. - Phylogenetic and ecologic aspects of mycotrophy in the angiosperms from an evolutionary standpoint. In: SAFIR, G. R. - **Ecophysiology of VA Mycorrhizal Plants**. Boca Raton, CRC, 1987. p.5-25.
- UOSUKAINEN, M. & VESTBERG, M. - Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizas on rooting, weaning and subsequent growth of micropropagated *Malus* (L.) Moench. **Agric. Sci. Finl.**, **3**:269-279, 1994.

CAPÍTULO 3

**SELEÇÃO DE FMA EFICIENTES PARA MACIEIRAS
MICROPROPAGADAS E TRANSPLANTADAS PARA
SOLOS DE POMAR NÃO ESTERILIZADOS**

INTRODUÇÃO

Um dos principais benefícios nutricionais da associação entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMA) é o aumento da biomassa vegetal resultante da maior capacidade de absorção de nutrientes, principalmente o fósforo, devido à presença de micélio extra-radicular do fungo que explora o solo de forma mais eficiente do que as raízes (FRIESE & ALLEN, 1991). Para além dos benefícios nutricionais, no entanto, a simbiose micorrízica beneficia as espécies vegetais por meio de diversos mecanismos. A associação com os FMA melhora as relações hídricas e protege o hospedeiro contra patógenos radiculares e metais pesados, evidenciando seu caráter multifuncional (NEWSHAM, FITTER, WATKINSON, 1995). Desta forma, os FMA podem ser potencialmente benéficos nos sistemas de micropropagação, nos quais os substratos esterilizados e as práticas assépticas utilizadas impedem o estabelecimento de associações simbióticas com microorganismos (LOVATO, GUILLEMIN, GIANINAZZI, 1992). Em macieiras micropropagadas, a inoculação com FMA pode aumentar a altura, melhorar a uniformidade, a produção de biomassa, a área foliar e o volume radicular em relação às plantas não inoculadas (GRANGER, PLENCHETTE, FORTIN, 1982), substituir os efeitos da adubação fosfatada (BRANZANTI, GIANINAZZI-PEARSON, GIANINAZZI, 1992) e diminuir o tempo para a produção de mudas (UOSUKAINEN & VESTBERG, 1994). Apesar desses benefícios, não existem informações na literatura sobre os efeitos da inoculação de FMA na produção de biomassa vegetal e na absorção de nutrientes minerais em macieiras micropropagadas e transplantadas para solos não esterilizados. A avaliação da eficiência de isolados de FMA em solo não esterilizado, incluindo a biota nativa

poderá fornecer informações fundamentais sobre a competitividade dos isolados introduzidos na fase pré transplântio e a viabilidade da inoculação.

Na maioria das publicações, a eficiência dos isolados fúngicos foi avaliada apenas em substratos esterilizados ou pasteurizados (MOHANDAS, 1992; SIDHU & BEHL, 1997; SYLVIA & BURKS, 1988), não fornecendo informação sobre sua eficiência em condições de campo. Em solo não esterilizado, a resposta das plantas à inoculação de FMA não é tão previsível e tende a ser menor do que a de plantas cultivadas em solos esterilizados (MOSSE, 1977). Em vários estudos a inoculação de FMA em solo não esterilizado foi ineficiente no estímulo ao crescimento de vários hospedeiros, como trevo subterrâneo (ABBOTT, ROBSON, HALL, 1983), *Acacia albida* e *A. nilotica* (OSONUBI, BAKARE, MULONGOY, 1992) e *Andropogon gerardii* (KITT et al., 1988). HETRICK, KITT e WILSON (1986) inocularam *Glomus etunicatum* em *Andropogon gerardii*, *Sorghastrum nutans*, *Petalostemum purpureum* e *Liatris punctata* e observaram que nenhuma das espécies vegetais foi beneficiada pela inoculação, e as espécies *A. gerardii* e *S. nutans*, na presença de FMA, produziram menos quantidade de biomassa do que as plantas sem micorrizas. Esses estudos indicam que as populações nativas de FMA podem ser mais eficientes do que os fungos introduzidos.

Em outros estudos, as plantas cultivadas em solos não esterilizados tiveram o crescimento significativamente estimulado pela inoculação com FMA, como *Stylosanthes* sp. (MOSSE, 1977) e trevo subterrâneo (ABBOTT & ROBSON, 1981). VESTBERG (1992) inoculou *Glomus mosseae* em plantas de morangueiro micropropagadas e cultivadas em solo não esterilizado e constatou que o isolado introduzido foi competitivo e persistiu no novo

ambiente, estimulando a produtividade das plantas por pelo menos 2 anos após a inoculação. PLENCHETTE et al. (1981a) inocularam plantas de macieira cultivadas em solo não esterilizado com um isolado não identificado de FMA. O isolado introduzido foi mais eficiente que a população indígena, estimulando a produção de matéria vegetal e a absorção de nutrientes. Nestas situações em que uma população nativa de FMA está presente, outras características são fundamentais para um isolado introduzido, como a competitividade, a capacidade reprodutiva e a persistência (LAMBERT, COLE JR, BAKER, 1980), sendo muitas vezes necessária a utilização de inóculo misto para que as características dos diversos isolados se complementem.

A utilização de um inóculo misto, isto é, aquele que inclui dois ou mais isolados fúngicos, pode ser uma estratégia para se atingir um inóculo mais eficiente. Diferentes isolados de FMA afetam de modo distintos, isto é, recorrendo a diversos mecanismos, a produção de biomassa pelas plantas assim como seus padrões de crescimento vegetativo (STAHL & SMITH, 1984; STREITWOLF-ENGEL et al., 1997), e, portanto, a inoculação com uma mistura de isolados poderá beneficiar mais uma espécie vegetal do que cada isolado isoladamente (SCHREINER & BETHLENFALVAY, 1997). Estudos com macieira (GEDDEDA, TRAPPE, STEBBINS, 1984) e mandioca (SIEVERDING & HOWELER, 1985) demonstraram que a inoculação com uma mistura de isolados foi mais eficiente na promoção do crescimento e na absorção de fósforo do que a inoculação de cada isolado isoladamente. Por outro lado, TRENT, SVEJCAR e BETHLENFALVAY (1993), inocularam *Glomus etunicatum*, *G. mosseae* e *G. pallidum* isoladamente ou de forma combinada, em *Oryzopsis hymenoides*, e constataram que o inóculo misto foi menos

eficiente no estímulo da absorção de N e P em relação aos isolados inoculados isoladamente. Estes resultados indicam que, em certos casos, a inoculação de plantas com uma mistura de isolados pode ser mais eficiente no aumento da biomassa e da quantidade de P absorvido pelos hospedeiros.

Em programas de seleção de FMA que objetivam inoculações a campo ou transplântio de mudas para solos não esterilizados, é importante verificar se o isolado fúngico selecionado estabelece a associação micorrízica e se é persistente e eficiente em condições de solo não esterilizado (GUILLEMIN, GIANINAZZI, TROUVELOT, 1992).

A eficiência da associação micorrízica depende de três fatores, quais sejam, o fungo simbiote, o hospedeiro e as condições ambientais. A influência destes fatores deve ser investigada quando se pretende desenvolver um programa de inoculação de FMA.

No experimento previamente estabelecido (Capítulo 2), o uso de um substrato esterilizado não permitiu o estudo da influência da microbiota nativa na simbiose e entre os isolados de FMA e as plantas de macieira. Os isolados selecionados naquele experimento mostraram-se eficientes em substratos esterilizados, porém, não foi analisada a sua eficiência em solos com populações nativas de FMA, situação que as mudas enfrentarão subseqüentemente. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dois isolados de FMA aplicado em diferentes doses de inóculo na produção de matéria seca e absorção de nutrientes em macieiras micropropagadas e cultivadas em solo não esterilizado, incluindo a microbiota indígena de um pomar de macieiras.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do solo e preparo do substrato

O solo utilizado no experimento foi coletado em um pomar, de 5 anos de idade, cultivado com macieiras das variedades Fuji e Gala, localizado na Estação Experimental da EPAGRI de Caçador na localidade da Taperinha. O solo foi coletado na projeção da copa das árvores, a uma distância de 20 a 40cm do tronco, a uma profundidade de até 20cm. Após a coleta, o solo foi embalado em sacos plásticos e imediatamente enviado para o Laboratório de Endomicorrizas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC. O solo foi misturado na proporção 1:1 (v/v) com areia lavada e esterilizada. A mistura apresentou 57% de argila, 9,0% de matéria orgânica e pH 4,7. A concentração de fósforo foi de 17,8ppm, a de potássio 112ppm, a de magnésio 2,1 cmol/dm³, a de cálcio 4,3 cmol/dm³ e a de alumínio 1,7cmol/dm³.

2. Procedimento experimental

Os isolados de FMA utilizados neste experimento foram *Glomus etunicatum* e *Scutellospora pellucida*, selecionados entre quatro fungos endomicorrízicos em experimento apresentado (Capítulo 2). Os isolados selecionados foram mais eficientes na promoção do crescimento de plantas de macieiras micropropagadas e cultivadas em substratos com pH 4,0, 5,0 e 6,0 do que os outros isolados avaliados.

O inóculo de cada isolado produzido resultou da homogeneização de 50g de solo inóculo das culturas de *Glomus etunicatum* (GE) e de *Scutellospora pellucida* (SP) com um substrato esterilizado composto por solo podzólico vermelho-amarelo (PVA) e areia misturados na proporção de 1:1 (v/v). Vasos contendo uma mistura do inóculo esterilizado com o substrato PVA:areia (1:2,

v/v) foram usados na produção do inóculo denominado controle, e que incluiu solo com raízes sem micorrizas. As misturas foram acondicionadas em vasos de 1,0L e semeadas com paspalum e sorgo. Após quatro meses em casa de vegetação, o solo inóculo foi retirado dos vasos, homogeneizado e armazenado em geladeira. Os tratamentos consistiram de diferentes inóculos com GE e SP em solo esterilizado e não esterilizado, assim como o uso de diferentes níveis de inóculo (Tabela 1). O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com 11 tratamentos e seis repetições.

A espécie de macieira selecionada *Malus prunifolia* (cultivar Marubakaido) e as plântulas foram produzidas no Laboratório de Morfogênese Vegetal do Departamento de Fitotecnia da UFSC. A metodologia de micropropagação e de aclimatização *post vitro* das plantas, assim como a inoculação e a transferência das plantas para os vasos foram conduzidos de acordo com a descrição apresentada no capítulo 2 (item 6).

A fim de restabelecer a microbiota não micorrízica nativa do solo, uma amostra de 50g de cada um dos substratos (esterilizado e não esterilizado) foi misturada com 500mL de água esterilizada e agitada por um minuto. A suspensão foi então filtrada usando-se em filtro Whatman N° 42 e em seguida 20mL do filtrado foram adicionados a cada vaso.

A análise dos parâmetros de crescimento das plantas e da concentração de minerais na parte aérea foi realizada de acordo com a descrição apresentada no capítulo 2. Após 84 dias do transplântio, a altura das plantas foi medida e a parte aérea e as raízes coletadas e secas a fim de se efetuar a determinação do peso de matéria seca. A dependência micorrízica relativa

(DMR), calculada segundo PLENCHETTE et al. (1983b) foi avaliada para as plantas cultivadas em substrato esterilizado e não esterilizado separadamente.

O tecido da parte aérea das plantas foi então moído e enviado para o Laboratório de Análises da EPAGRI de Caçador (SC), onde foi analisada a concentração de elementos químicos, P, K, Ca, Mg, Zn, Fe e Mn. Estas análises foram efetuadas segundo a metodologia descrita por TEDESCO et al. (1995). Uma amostra de cerca de 0,5g do sistema radicular das plantas foi utilizada para determinação da porcentagem de colonização (GIOVANETTI & MOSSE, 1980).

3. Análises estatísticas

Previamente à análise da variância, os resultados foram estudados quanto à homogeneidade de variância de acordo com o teste de Burtlett. Os parâmetros cujas variâncias não foram homogêneas foram transformados usando-se $\log(x+1)$ e \sqrt{x} e novamente testados quanto à homogeneidade da variância. Apenas para os parâmetros altura e porcentagem de colonização radicular a homogeneidade das variâncias foi atingida, e tais parâmetros foram submetidos ao teste DMS para separação de médias. Os parâmetros restantes foram colocados em ordem crescente e uma posição (*rank*) atribuída a cada um. A análise da variância foi efetuada levando-se em consideração os *ranks*. A separação de médias foi feita utilizando-se o teste DMS. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico JMP® (versão 3.1).

Tabela 1. Código dos tratamentos, composição do inóculo e dosagem utilizada no experimento.

Códigos dos tratamentos	Composição do inóculo	Dose de inóculo (g)
Solo esterilizado		
C-E	Sem micorriza	30
GE30-E	<i>Glomus etunicatum</i>	30
SP30-E	<i>Scutellospora pellucida</i>	30
Solo não esterilizado		
C-NE	Controle	30
GE10-NE	<i>G. etunicatum</i>	10
GE20-NE	<i>G. etunicatum</i>	20
GE30-NE	<i>G. etunicatum</i>	30
SP10-NE	<i>S. pellucida</i>	10
SP20-NE	<i>S. pellucida</i>	20
SP30-NE	<i>S. pellucida</i>	30
GE+SP	<i>G. etunicatum</i> + <i>S. pellucida</i>	15 + 15

RESULTADOS

A porcentagem de colonização radicular (PCR) das plantas inoculadas em solo não esterilizado foi maior do que a da população natural (C-NE), com exceção daquelas inoculadas com SP20-NE (Tabela 2). As plantas inoculadas com GE apresentaram uma colonização radicular significativamente maior em solo não esterilizado. Já as plantas inoculadas com SP apresentaram uma colonização radicular maior em solo com população nativa. No entanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos SP30-E e SP30-NE. A dose de inóculo não exerceu uma influência significativa na colonização micorrízica de plantas inoculadas com SP, embora houvesse uma tendência a aumentar a PCR com o aumento da dose de inóculo. Já nas plantas inoculadas com SP, houve uma diferença significativa entre as plantas inoculadas com SP10-NE e SP30-NE em relação àquelas inoculadas com SP20-NE.

A inoculação de FMA exerceu efeitos significativos na alturas das plantas (Tabela 3), após 84 dias. Em solo esterilizado, a inoculação com os isolados GE e SP produziu aumentos em altura de 127 e 562%, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas. Em solo com população nativa de FMA, a resposta das plantas à inoculação foi menor que em solo esterilizado. As plantas inoculadas com GE em solo não esterilizado não cresceram mais do que as plantas controles. Aquelas inoculadas com SP, por outro lado, apresentaram uma resposta menor à inoculação em relação ao crescimento obtido em solo esterilizado, mas exerceram um estímulo no crescimento maior do que o da população nativa. O inóculo misto foi tão eficiente em estimular a produção de biomassa quanto o isolado SP inoculado separadamente.

Tabela 2. Porcentagem de colonização radicular (PCR) de plantas de macieiras micropropagadas cultivadas em solo de pomar esterilizado e não esterilizado.

Tratamentos ¹	PCR (%)	
Solo esterilizado		
C-E	0 ²	e ³
GE30-E	20.80	d
SP30-E	67.80	a
Solo não esterilizado		
C-NE	30.50	d
GE10-NE	63.17	a
GE20-NE	60.80	ab
GE30-NE	57.40	abc
SP10-NE	52.33	bc
SP20-NE	15.50	d
SP30-NE	57.40	abc
GE+SP	48.17	c

¹ C-E: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Glomus etunicatum*; SP30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Scutellospora pellucida*; C-NE: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *G. etunicatum*; GE20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *G. etunicatum*; GE30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *G. etunicatum*; SP10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *S. pellucida*; SP20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *S. pellucida*; SP30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *S. pellucida*; GE+SP: plantas inoculadas com mistura de 15g de inóculo de cada um dos isolados *G. etunicatum* e *S. pellucida*.

² Os valores representam médias de 6 repetições.

³ Valores na mesma coluna seguidos de uma mesma letra não diferem entre si segundo o teste DMS.

As plantas inoculadas com SP30-E e SP30-NE produziram maior quantidade de PSPA e PSR (Tabela 3). A variação da quantidade de inóculo exerceu efeitos diferentes na eficiência dos isolados em solo não esterilizado. As plantas inoculadas com GE10-NE apresentaram PSPA e PSR maiores do que as inoculadas com GE30-NE, mas a diferença foi significativa apenas para PSPA (Tabela 3). Para as plantas inoculadas com SP30-E, houve uma tendência dos valores de PSPA e PSR serem maiores com o aumento na quantidade de inóculo. A inoculação mista (GE+SP) estimulou a produção de PSPA e PSR em relação às plantas controles não inoculadas. Os valores de PSPA e PSR das plantas inoculadas com GE+SP foram significativamente maiores em relação àquelas inoculadas com GE30-E, mas foram da mesma magnitude do que aquelas inoculadas com o isolado SP em solo não esterilizado (Tabela 3).

A R/PA foi influenciada significativamente pela inoculação micorrízica nas plantas cultivadas em solo esterilizado (Tabela 3). Nestas condições, as plantas inoculadas com os isolados GE e SP apresentaram valores de R/PA 140 e 300% maiores do que o controle não inoculado, respectivamente. A concentração de inóculo de GE e SP em solo não esterilizado não exerceu um efeito significativo nos valores de R/PA. A inoculação mista não exerceu um efeito significativo na R/PA das plantas em relação aos outros tratamentos em solo não esterilizado (Tabela 3).

Tabela 3. Peso de matéria seca de parte aérea (PSPA), peso de matéria seca de raiz (PSR) e relação raiz parte aérea (R/PA) de plantas de macieiras micropropagadas cultivadas em solo de pomar esterilizado e não esterilizado.

Tratamentos ¹	Altura (cm)	PSPA (g)	PSR (g)	R/PA
Solo esterilizado				
C-E	3.25 ² e ³	0,05 ² g ³	0,10 f	0,45 d
GE30-E	7.38 cd	0,58 de	0,42 de	1,08 bc
SP30-E	21.52 a	2,25 a	1,31 a	1,80 a
Solo não esterilizado				
C-NE	5.78 de	0,23 ef	0,18 ef	1,20 bc
GE10-NE	7.75 cd	0,34 de	0,30 de	1,06 bc
GE20-NE	3.21 e	0,10 fg	0,10 f	1,35 bc
GE30-NE	3.25 e	0,05 g	0,08 e	0,85 cd
SP10-NE	9.18 bc	0,47 cde	0,38 cd	1,25 ab
SP20-NE	9.92 bc	0,50 cd	0,50 bc	1,03 bc
SP30-NE	10.76 b	0,81 ab	0,68 ab	1,23 abc
GE+SP	10.17 bc	0,62 bc	0,51 bc	1,21 abc

¹ C-E: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Glomus etunicatum*; SP30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Scutellospora pellucida*; C-NE: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *G. etunicatum*; GE20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *G. etunicatum*; GE30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *G. etunicatum*; SP10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *S. pellucida*; SP20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *S. pellucida*; SP30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *S. pellucida*; GE+SP: plantas inoculadas com mistura de 15g de inóculo de cada um dos isolados *G. etunicatum* e *S. pellucida*.

² Os valores representam médias de 6 repetições.

³ Valores na mesma coluna seguidos de uma mesma letra não diferem entre si segundo o teste de DMR.

Tabela 4. Dependência micorrízica relativa (DMR) de plantas de macieira micropropagadas cultivadas em solo de pomar esterilizado e não esterilizado.

Tratamentos¹	DMR (%)
Solo esterilizado	
C-E	----
GE30-E	85,0
SP30-E	95,8
Solo não esterilizado	
GE10-NE	35,9
GE20-NE	-105,0
GE30-NE	-215,4
SP10-NE	51,8
SP20-NE	59,0
SP30-NE	72,5
GE+SP	63,7

¹ C-E: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Glomus etunicatum*; SP30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Scutellospora pellucida*; C-NE: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *G. etunicatum*; GE20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *G. etunicatum*; GE30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *G. etunicatum*; SP10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *S. pellucida*; SP20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *S. pellucida*; SP30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *S. pellucida*; GE+SP: plantas inoculadas com mistura de 15g de inóculo de cada um dos isolados *G. etunicatum* e *S. pellucida*.

Os valores da DMR das plantas cultivadas em solo esterilizado foram maiores do que o das plantas cultivadas em solo não esterilizado (Tabela 4). As plantas dos tratamentos GE30-E e SP30-E apresentaram uma dependência micorrízica relativa (DMR) de 85,0 e 95,8%, respectivamente; esses valores foram maiores do que os das plantas inoculadas com o mesmo nível de inóculo em solo não esterilizado (tratamentos GE30-NE e SP30-NE) (Tabela 4). O maior valor de DMR em solo não esterilizado foi o das plantas inoculadas com SP30-NE, seguido pelas plantas inoculadas com GE+SP (Tabela 4).

As plantas do tratamento controle cultivadas em solo esterilizado não produziram matéria seca suficiente para as análises da concentração de nutrientes, o mesmo acontecendo com as plantas dos tratamentos GE20-NE e GE30-NE em relação às análises de K e Fe. A maior porcentagem de P foi detectada em plantas do tratamento GE30-NE, embora esta concentração não tenha diferido das plantas do tratamento C-NE, GE30-E, SP30-E e GE+SP (Tabela 5). O aumento na quantidade de inóculo não afetou a porcentagem de P nas plantas inoculadas com o isolado SP, e plantas do tratamento GE30-NE tiveram significativamente uma menor porcentagem de P do que aquelas dos tratamentos GE10 e GE20 (Tabela 5).

A maior concentração de Zn foi detectada nas plantas do tratamento GE20-NE, embora esse valor não tenha diferido do tratamento GE30-E, de GE10-NE, de GE+SP e das plantas não inoculadas em solo não esterilizado (Tabela 5). As plantas inoculadas com o isolado SP no substrato esterilizado apresentaram a menor concentração deste elemento, que não diferiu significativamente das plantas dos tratamentos SP10-NE, SP20-NE e SP30-NE e GE30-NE (Tabela 5). A maioria dos tratamentos não teve influência sobre a

porcentagem de Ca na parte aérea das plantas (Tabela 5). As plantas dos tratamentos GE30-NE apresentaram maior concentração deste elemento, que diferiu, significativamente, apenas das inoculadas com GE10-NE.

A inoculação das macieiras com os isolados GE e SP em solo esterilizado aumentou a porcentagem de Mg em relação às plantas controle em solo não esterilizado (Tabela 6). Em solo não esterilizado, a concentração de Mg foi superior nas plantas dos tratamentos GE20-NE e GE30-NE, superando as plantas controle em 100 e 220%, respectivamente (Tabela 6). Em solo não esterilizado, o aumento na quantidade de inóculo do isolado GE resultou num aumento na porcentagem de Mg das plantas, enquanto o nível de inóculo do isolado SP não influenciou a concentração desse elemento nas plantas (Tabela 6). Independente do nível de inóculo, as plantas inoculadas com GE tiveram uma maior concentração de Mg do que as plantas controle, enquanto as plantas inoculadas com SP não diferiram do controle (Tabela 6).

As plantas dos tratamentos GE30-E e SP30-E em substrato esterilizado absorveram mais K que as dos outros tratamentos, embora a concentração deste elemento nas plantas do tratamento GE30-E não tenha diferido daquelas dos tratamentos SP10E, SP20-NE e GE+SP (Tabela 6). Em solo não esterilizado, o nível de inóculo do isolado SP não influenciou a concentração de K na parte aérea das plantas, enquanto que as plantas inoculadas com GE+SP absorveram significativamente mais K do que as plantas controle (Tabela 6).

Tabela 5. Concentração de fósforo (P), zinco (Zn) e cálcio (Ca) na parte aérea de plantas de macieiras micropropagadas cultivadas em solo de pomar esterilizado e não esterilizado.

Tratamentos ¹	Concentração de elementos					
	P (%)		Zn (ppm)		Ca (%)	
Solo esterilizado						
C-E	-	-	-	-	-	-
GE30-E	0,11 ²	a ³	58,0	ab	0,61	ab
SP30-E	0,13	a	29,7	e	0,48	ab
Solo não esterilizado						
C-NE	0,10	ab	47,6	abc	0,73	ab
GE10-NE	0,08	cd	55,4	a	0,50	b
GE20-NE	0,07	d	65,5	ab	0,76	ab
GE30-NE	0,26	a	29,3	de	1,30	a
SP10-NE	0,08	bcd	37,2	cde	0,44	ab
SP20-NE	0,08	bcd	40,2	bcde	0,48	ab
SP30-NE	0,07	d	38,0	de	0,47	ab
GE+SP	0,11	a	47,6	abcd	0,56	ab

¹ C-E: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Glomus etunicatum*; SP30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Scutellospora pellucida*; C-NE: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *G. etunicatum*; GE20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *G. etunicatum*; GE30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *G. etunicatum*; SP10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *S. pellucida*; SP20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *S. pellucida*; SP30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *S. pellucida*; GE+SP: plantas inoculadas com mistura de 15g de inóculo de cada um dos isolados *G. etunicatum* e *S. pellucida*.

² Os valores representam médias de 6 repetições.

³ Valores na mesma coluna seguidos de uma mesma letra não diferem entre si segundo o teste de DMR

A inoculação das plantas com os isolados GE e SP em solo esterilizado não resultou em aumento significativo de Fe em relação as plantas controle (Tabela 6). A concentração de Fe nas plantas do tratamento GE30-NE foi 188% maior do que nas plantas controle, embora ambos os valores não tenham diferido estatisticamente. A quantidade de inóculo não exerceu efeito significativo na quantidade de Fe das plantas inoculadas com o isolado SP em solo não esterilizado (Tabela 6). Plantas inoculadas com GE+SP não diferiram das plantas controle na quantidade total de Fe da parte aérea.

As maiores concentrações de Mn foram detectadas nas plantas inoculadas com GE e SP em solo esterilizado, embora não tenha havido diferenças entre GE30-E e GE30-NE em solo não esterilizado (Tabela 6). Os níveis de inóculo não influenciaram a concentração de Mn em plantas inoculadas com o isolado SP em solo não esterilizado, mas as plantas inoculadas com GE10-NE tiveram concentrações significativamente menores desse elemento do que as plantas inoculadas com GE20-NE e GE30-NE. A dupla inoculação com GE+SP não teve nenhum efeito na porcentagem de Mn nas plantas em comparação com as plantas controle.

Tabela 6. Médias concentração de magnésio (Mg), potássio (K), ferro (Fe) e manganês (Mn) na parte aérea de plantas de macieiras micropropagadas cultivadas em solo de pomar esterilizado e não esterilizado.

Tratamentos ¹	Concentração de elementos							
	Mg (%)		K (%)		Fe (ppm)		Mn (ppm)	
Solo esterilizado								
C-E	-	-	-	-	-	-	-	-
GE30-E	0,18 ²	cd ³	0,71	ab	177,2	bcd	298,7	ab
SP30-E	0,20	bc	0,93	a	132,0	d	361,2	a
Solo não esterilizado								
C-NE	0,14	gh	0,45	c	195,2	abcd	77,6	def
GE10-NE	0,17	de	0,48	c	299,2	ab	92,2	d
GE20-NE	0,28	ab	-	-	169,3	bcd	147,8	c
GE30-NE	0,45	a	-	-	562,0	a	161,4	bc
SP10-NE	0,15	efg	0,59	bc	161,8	cd	66,5	ef
SP20-NE	0,15	fgh	0,60	bc	173,7	bcd	69,5	ef
SP30-NE	0,14	h	0,56	c	197,2	abc	67,6	f
GE+SP	0,16	def	0,69	B	197,4	abc	77,2	de

¹ C-E: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Glomus etunicatum*; SP30-E: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *Scutellospora pellucida*; C-NE: plantas inoculadas com inóculo esterilizado; GE10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *G. etunicatum*; GE20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *G. etunicatum*; GE30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *G. etunicatum*; SP10-NE: plantas inoculadas com 10g de inóculo de *S. pellucida*; SP20-NE: plantas inoculadas com 20g de inóculo de *S. pellucida*; SP30-NE: plantas inoculadas com 30g de inóculo de *S. pellucida*; GE+SP: plantas inoculadas com mistura de 15g de inóculo de cada um dos isolados *G. etunicatum* e *S. pellucida*.

² Os valores representam médias de 6 repetições.

³ Valores na mesma coluna seguidos de uma mesma letra não diferem entre si segundo o teste de DMS.

DISCUSSÃO

As plantas inoculadas com o isolado SP e com o inóculo misto apresentaram alturas significativamente maiores em relação àquelas inoculadas com GE e não inoculadas, com exceção do tratamento GE10-NE. De maneira geral, as plantas inoculadas cresceram menos em solo que incluiu a população nativa de FMA, a única exceção sendo as plantas do tratamento GE10-NE. Isso indica que a microbiota nativa reduziu a resposta das plantas à inoculação, e o isolado SP e o inóculo misto foram mais eficientes em promover o crescimento em condições de competição. Os efeitos da inoculação foram variáveis de acordo com o isolado fúngico e com o tratamento do solo. A microbiota nativa exerceu efeitos significativos na porcentagem de colonização radicular (Tabela 2). As plantas inoculadas com GE apresentaram uma PCR maior em solo não esterilizado, enquanto que aquelas inoculadas com SP apresentaram tendência oposta. As plantas inoculadas com inóculo misto apresentaram, em valores absolutos, menor porcentagem de colonização radicular do que as outras plantas inoculadas. A explicação para estes resultados é complexa, pois, em solo incluindo população natural de FMA foi impossível, com base na metodologia utilizada, analisar a participação de componentes naturais e introduzidos na colonização radicular. No entanto, é provável que o aumento da dose de inóculo de GE tenha diminuído a porcentagem de colonização radicular pelo seguinte motivo: o isolado GE é um fungo com baixa capacidade de colonização (Capítulo 2), e, portanto, quando as plantas inoculadas foram transplantadas para o solo não esterilizado, a presença do fungo nas raízes das macieiras inibiu a colonização pela população nativa. Dessa maneira, quanto maior a dose de inóculo aplicada,

menor a participação da população nativa, e menor a colonização total. Esses resultados podem explicar os efeitos obtidos na altura, evidenciando que o crescimento foi maior com a aplicação da menor dose de inóculo de GE. A PCR das plantas inoculadas com SP não apresentou grande variação a não ser pelo resultado do tratamento SP20-NE, que foi significativamente menor do que os outros tratamentos com SP em solo esterilizado. Esses resultados, semelhantes àqueles encontrados no primeiro experimento (Capítulo 2), indicam que o isolado SP apresentou maior capacidade de colonização em relação a GE, assim como foi mais eficiente no estímulo ao crescimento das plantas de macieira.

Os resultados de PSPA e PSR permitem concluir que o isolado SP foi o mais eficiente, tanto no solo natural quanto em solo esterilizado. Em solo não esterilizado, as plantas inoculadas com SP20-NE, SP30-NE e GE+SP produziram a maior quantidade de PSPA e PSR em relação às plantas dos outros tratamentos, e as plantas do tratamento GE30-E não diferiram das plantas controle. Dois aspectos devem ser ressaltados após análises dos resultados. O primeiro se refere ao fato de as plantas inoculadas cultivadas em solo esterilizado terem produzido mais biomassa, em valores absolutos, do que as inoculadas com os mesmos isolados em solo não esterilizado. Segundo, o fato de a inoculação em solo não esterilizado nem sempre ter sido eficiente em promover o acúmulo de biomassa vegetal. Esses resultados demonstram que a competição com a microbiota micorrízica nativa diminuiu a eficiência dos isolados, o que confirma o exposto por MOSSE (1977), ao indicar que as respostas das plantas à inoculação com FMA em solos não esterilizados são,

geralmente, menores, em comparação com solos nos quais a população nativa de FMA tenha sido removida ou diminuída.

Em solos com população nativa de FMA, o aumento nas concentrações de inóculo exerceu efeitos diferentes na produção de biomassa das macieiras conforme o isolado (Tabela 3). As plantas inoculadas com o isolado GE em solo com população nativa de FMA tenderam a crescer menos com o aumento da dose de inóculo, enquanto as inoculadas com SP apresentaram comportamento oposto. Estes resultados não estão de acordo com aqueles encontrados por LOVATO et al. (1992) em plantas micropropagadas de abacaxizeiro. Naquele experimento, doses de 1 e 3% de inoculantes comerciais foram aplicados às plantas e praticamente não houve influência significativa na produção de biomassa dos hospedeiros. Por outro lado, SCHUBERT et al. (1992) inocularam plantas micropropagadas de kiwi com 0, 10, 20 ou 30g de inoculante por vaso e, embora as diferentes quantidades tenham influenciado na porcentagem de colonização radicular, nenhuma diferença significativa foi detectada na produção de biomassa vegetal.

As plantas inoculadas com GE+SP produziram PSPA e PSR equivalentes ao isolado SP inoculado isoladamente, mas tais valores foram significativamente maiores em relação aos obtidos nas plantas inoculadas apenas com GE. Diversos pesquisadores chegaram a resultados semelhantes, que confirmam ser o inóculo misto tão eficiente quanto o isolado mais eficiente inoculado isoladamente, e superior aos isolados menos eficientes (GEDDEDA et al., 1984; SIEVERDING & HOWELER, 1985; SCHREINER & BETHLENFALVAY, 1986; UOSUKAINEN & VESTBERG, 1994). A dupla inoculação pode representar uma estratégia eficiente em condições de campo,

principalmente, quando o inóculo misto supera o inóculo produzido a partir de um único isolado de FMA. A campo, ocorrem amplas variações ambientais em comparação com as condições de casa de vegetação, e, em situações inibitórias para um dos isolados do inóculo misto, o outro isolado poderá funcionar de forma compensatória, garantindo a manutenção da eficiência da simbiose, fato que não pode ser observado através da DMR, que foi baixa, e até mesmo negativa nas plantas inoculadas com GE em solo não esterilizado.

Os valores de relação raiz parte aérea (R/PA) no experimento não foram tão consistentes quanto aqueles encontrados no experimento anterior (Capítulo 2), quando foi observado uma diminuição da R/PA em função da inoculação das macieiras pelos FMA. No solo esterilizado, a R/PA foi menor nas plantas controle do que nas inoculadas no solo não esterilizado. Outros pesquisadores observaram diminuição em valores de R/PA resultante da inoculação com FMA (SCHUBERT & HAYMAN, 1986; GUILLEMIN et al., 1992). Uma das razões para esse resultado pode ter sido a utilização de um substrato de maior fertilidade em relação ao utilizado no experimento anterior. A maior fertilidade do substrato, composto por solo de pomar, pode ter afetado a eficiência micorrízica, induzindo a planta a produzir raízes para aquisição de nutrientes. Resultados semelhantes foram também observados por BRANZANTI et al. (1992) em plantas de macieiras micropropagadas inoculadas com *Glomus fasciculatum* em substratos com três níveis de P (4, 8, e 40ppm). Os autores observaram que em 40ppm de P, a R/PA das plantas com ou sem micorrizas foram da mesma magnitude, enquanto que em 8ppm de P, a R/PA das plantas não inoculadas foi maior do que a das plantas inoculadas.

A concentração do inóculo exerceu influência na concentração de elementos nas plantas inoculadas com o fungo GE, porém, de maneira diferenciada para cada elemento. As doses de 10 e 20g de GE não produziram diferenças significativas na concentração de P, Zn, Ca e Fe, porém, a concentração de Mg e Mn aumentou com o aumento da quantidade de inóculo de GE. A maior quantidade de propágulos, provavelmente, propiciou maior número de pontos de infecção, seguido de colonização mais eficiente por parte do fungo, o que aumentou a produção de micélio externo e interno e beneficiou as plantas. As doses de inóculo de SP, no entanto, não produziram diferenças significativas na concentração de nenhum elemento, com exceção do Mg, indicando que este isolado infecta e coloniza a planta rapidamente, não necessitando de uma alta densidade de propágulos. Esses resultados demonstram a importância do potencial de inóculo na eficiência da associação micorrízica. Sendo a infectividade e a densidade de propágulos fatores que afetam diretamente o potencial de inóculo de um solo, ambos devem ser considerados na confecção de um inóculo. Caso o isolado fúngico seja eficiente, como foi demonstrado no experimento em solos ácidos com o isolado GE (Capítulo 2), mas de baixa infectividade, é de crucial importância que a densidade de propágulos seja aumentada, para compensar a baixa infectividade. O isolado GE demonstrou não ser competitivo em solo não esterilizado, portanto, um inoculante composto por este fungo deve apresentar uma alta densidade de propágulos para ser eficiente em solos não esterilizados. O isolado SP, por sua vez, demonstrou que é altamente competitivo, e sua eficiência em termos de estímulo à produção de biomassa não sofreu grandes variações com as diferentes doses de inóculo. Deve-se

ressaltar, porém, que além da infectividade do fungo e da densidade de esporos, as condições ambientais também influenciam o potencial de inóculo de um solo ou inoculante (CAMPBELL, 1989).

Os isolados GE e SP, inoculados em plantas cultivadas em solo esterilizado, foram eficientes em aumentar a concentração dos elementos analisados, com exceção de Mg e Fe (Tabelas 4 e 5). As plantas inoculadas com o isolado SP, apresentaram concentrações de elementos relativamente baixas em comparação com os outros tratamentos, com exceção da concentração de Ca, que foi praticamente igual para todos os tratamentos. As plantas inoculadas com o isolado GE em solo não esterilizado, apesar do crescimento relativamente baixo, apresentaram concentrações de elementos maiores do que aquelas inoculadas com o isolado SP, com exceção da concentração de Ca e K. As plantas inoculadas com inóculo misto, no entanto, apresentaram a mesma tendência observada nos parâmetros de crescimento, com concentrações de elementos intermediárias àquelas observadas nas plantas inoculadas com GE e SP isoladamente em solo esterilizado. Esse estímulo no aumento das concentrações de nutrientes exercido por inóculos contendo mais de um isolado de FMA foi registrado também por GEDDEDA et al. (1984) e SIEVERDING & HOWELER (1985). Naqueles experimentos, a concentração de nutrientes nas plantas inoculadas com inóculo misto foram sempre maiores ou estatisticamente iguais ao maior valor para elementos como P, N, K, Fe e Mn. Estes resultados confirmam a hipótese de SCHREINER & BETHLENFALVAY (1997), de que uma comunidade de espécies de FMA seria mais eficiente em promover benefícios para uma espécie vegetal.

A concentração de Mn nas plantas inoculadas com GE20-NE e GE30-NE apresentou valores acima do normal (BASSO, WILMS, SUZUKI, 1986), o que pode ter exercido um efeito fitotóxico e pode ter contribuído para o fraco crescimento das plantas destes tratamentos, que foram as únicas a produzir menos biomassa do que as plantas controle.

Os resultados deste experimento evidenciaram a importância da avaliação da competitividade dos isolados de FMA selecionados a partir de trabalhos estabelecidos em condições de solo esterilizado. Em condições sem competição é possível avaliar a eficiência de um ou vários fungos frente a fatores abióticos, como níveis de fertilização, umidade, acidez e metais pesados, entre outros. Tais experimentos, no entanto, não possibilitam a avaliação do desempenho do isolado em situações nas quais a microbiota nativa estará presente e competirá com o microrganismo introduzido por nutrientes e espaço. Estes fatores são adequadamente avaliados apenas em situações nas quais o microrganismo é introduzido em um ambiente no qual outras características, além da capacidade em estimular o crescimento do hospedeiro, são importantes para a sua sobrevivência e persistência. Assim como os FMA diferem na sua eficiência em estimular o crescimento das plantas, também há diferenças de competitividade. Alguns isolados não infectam as plantas em solo não esterilizado no qual são introduzidos, enquanto que outros exercem influência na planta apenas durante determinado tempo, devido à sua relativa baixa competitividade (ABBOTT et al., 1983).

O isolado de *Glomus etunicatum* usado neste experimento demonstrou ser eficiente na promoção do crescimento de macieiras em solos ácidos esterilizados, mas não foi competitivo em solo com microbiota nativa, ao

contrário, inibiu o crescimento de plantas de macieira, apesar de influenciar positivamente a concentração de nutrientes no tecido vegetal. O isolado de *Scutellospora pellucida*, por outro lado, estimulou o crescimento das plantas de uma maneira relativamente maior em comparação à população nativa, mostrando ser competitivo, mas, de uma maneira geral, não influenciou significativamente a concentração de nutrientes na parte aérea das plantas. Essas características marcantes dos dois isolados de FMA utilizados foram evidenciadas no inóculo misto, no qual propágulos dos dois fungos foram combinados. As plantas inoculadas com GE+SP apresentaram crescimento e concentração de nutrientes quase sempre equivalentes ao tratamento mais eficiente. Os resultados claramente demonstram que, em solo não esterilizado, o inóculo misto composto pelos isolados GE e SP foi mais eficiente no estímulo à produção de biomassa e a concentração de nutrientes do que isolados isoladamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. - Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculum type. **Aust. J. Agric. Res.**, **32**: 631-639, 1981.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; HALL, I.R. - Introduction of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi into agricultural soils. **Aust. J. Agric. Res.**, **34**:741-749, 1983.
- BASSO, C.; WILMS, F.W.W.; SUZUKI, A. - Fertilidade do solo e nutrição da macieira. In: EMPRESA CATARINENSE DE PESQUISA AGROPECUÁRIA S.A. - **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, EMPASC, 1986.
- BRANZANTI, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. - Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrient status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage. **Agronomie**, **12**:841-845, 1992.
- CAMPBELL, R. - **Biological control of microbial plant pathogens**. Cambridge, Cambridge University Press, 1989.
- FRIESE, C.F. & ALLEN, M.F. - The spread of VA mycorrhizal fungal hyphae in the soil: inoculum types and external hyphal architecture. **Mycologia**, **83**:409-418.
- GEDDEDA, Y.I.; TRAPPE, J.M.; STEBBINS, R.L. - Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae and phosphorus on apple seedlings. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.**, **109**:24-27, 1984.
- GRANGER, R.L.; PLENCHETTE, C.; FORTIN, J.A. - Effect of a vesicular arbuscular (VA) endomycorrhizal fungus (*Glomus epigaeum*) on the growth and leaf mineral content of two apple clones propagated *in vitro*. **Can. J. Plant Sci.**, **63**:551-555, 1983.
- GUILLEMIN, J.P.; GIANINAZZI, S.; TROUVELOT, A. - Screening of arbuscular endomycorrhizal fungi for establishment of micropropagated pineapple plants. **Agronomie**, **12**:831-836, 1992.
- HETRICK, B.A.D.; KITT, D.G.; WILSON, G.T. - The influence of phosphorus fertilization, drought, fungal species, and nonsterile soil on mycorrhizal growth response in tall grass prairie plants. **Can. J. Bot.**, **64**:1199-1203, 1986.
- KITT, D.G.; DANIELS, B.A.; HETRICK, B.A.D.; WILSON, G.W.T. - Relationship of soil fertility to suppression of the growth response of mycorrhizal big bluestem in non-sterile soil. **New Phytol.**, **109**:473-481, 1988.
- LAMBERT, D.H.; COLE JR, H.; BAKER, D.E. - Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. **New Phytol.**, **85**:513-520, 1980.
- LOVATO, P.; GUILLEMIN, J.P.; GIANINAZZI, S. - Application of commercial arbuscular endomycorrhizal fungal inoculants to the establishment of micropropagated grapevine rootstock and pineapple plants. **Agronomie**, **12**:873-880, 1992.

- MOHANDAS, S. – Effect of VAM inoculation on plant growth, nutrient level and root phosphatase activity in papaya (*Carica papaya* cd. Coorg Honey Dew). **Fertil. Res.**, **31**:263-267, 1992.
- MOSSE, B. – Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. X. Responses of *Stylosanthes* and maize to inoculation in unsterile soils. **New Phytol.**, **78**:277-288, 1977.
- NEWSHAM, K.K.; FITTER, A.H.; WATKINSON, A.R. - Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Tree**, **10** :407-411, 1995.
- OSONUBI, O.; BAKARE, O.N.; MULONGOY, K. – Interactions between drought stress and vesicular-arbuscular mycorrhiza on the growth of *Faidherbia albida* (syn. *Acacia albida*) and *Acacia nilotica* in sterile and non-sterile soils. **Biol. Fertil. Soils**, **14**:15-165, 1992.
- PLENCHETTE, C.; FORTIN, J.A.; FURLAN, V. – Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P – fertility. **Plant Soil**, **70**:199-209, 1983.
- PLENCHETTE, C.; FURLAN, V.; FORTIN, J. A. - Growth stimulation of apple trees in unsterilized soil under field conditions with VA mycorrhiza inoculation. **Can. J. Bot.**, **59**:2003-2008, 1981.
- SCHREINER, R.P. & BETHLENFALVAY, G.J. – Plant Soil response to single and mixed species of arbuscular mycorrhizal fungi under fungicide stress. **Appl. Soil Ecol.**, **7**:93-102, 1997.
- SCHUBERT, A. & HAYMAN, D.S. – Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. XVI. Effectiveness of different endophytes at different levels of soil phosphate. **New Phytol.**, **103**:79-90, 1986.
- SCHUBERT, A.; BODRINO, C.; GRIBAUDO, I. – Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) micropropagated plantas. **Agronomie**, **12**:847-850, 1992.
- SIEVERDING, E. & HOWELER, R.H. – Influence of species of VA mycorrhizal fungi on cassava yield response to phosphorus fertilization. **Plant Soil**, **88**:213-221, 1985.
- SIHDU, O.P. & BEHL, H.M. – Response of three *Glomus* species on growth of *Prosopis juliflora* Swartz at high pH levels. **Symbiosis**, **23**:23-34, 1997.
- STAHL, P.D. & SMITH, W.K. – Effects of different geographic isolates of *Glomus* on the water relations of *Agropyron smithii*. **Mycologia**, **76**:261-267, 1984.
- STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. – Clonal growth traits of two *Prunella* species are determined by co-occurring arbuscular mycorrhizal fungi. **J. Ecol.**, **85**:181-191, 1997.
- SYLVIA, D.M. & BURKS, J.N. - Selection of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus for practical inoculation of *Uniola paniculata*. **Mycologia**, **80**:565-568, 1988.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. - **Análise de solo, planta e outros materiais**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

- TRENT, J.D.; SVEJCAR, A.J.; BETHLENFALVAY, G.J. – Growth and nutrition of combinations of native and introduced plants and mycorrhizal fungi in a semiarid range. *Agric., Ecos. Environ.*, **45**:13-23, 1993.
- UOSUKAINEN, M. & VESBERG, M. – Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizas on rooting, weaning and subsequent growth of micropropagated *Malus* (L.) Moench. *Agric. Sci. Finl.*, **3**:269-279, 1994.
- VESTBERG, M. – Arbuscular mycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry and field observations in Finland. *Agronomie*, **12**:865-867, 1992.

CONCLUSÕES

A – Eficiência de isolados de FMA em macieiras micropropagadas cultivadas em solo esterilizado e com diferentes níveis de acidez.

1. A utilização de culturas-armadilha mostrou-se eficiente na recuperação de espécies de FMA de solos de pomares de macieira que não estavam esporulando a campo, e tal técnica deve ser utilizada em conjunto com a coleta direta de esporos para a análise da riqueza específica de um sistema vegetal.

2. Os isolados de *Glomus etunicatum* e *Scutellospora pellucida* foram os mais eficientes em promover o crescimento de mudas de macieiras micropropagadas em condições de substratos ácidos e esterilizados.

3. A inoculação com isolados de FMA aumentou a concentração de fósforo nos tecidos das plantas de macieiras em todos os substratos, e, de uma maneira geral, o isolado *S. pellucida* foi o mais eficiente em aumentar a concentração deste nutriente.

4. A colonização das raízes pelos isolados de FMA promoveu um efeito protetor contra alguns elementos potencialmente fitotóxicos, como Fe e Al. Em relação ao Al, o efeito protetor foi constatado apenas em substrato com pH 5,0 e 6,0.

5. O mecanismo responsável pelo aumento de biomassa vegetal das macieiras inoculadas foi de natureza nutricional e permitiu a adaptação fisiológica das plantas às condições de solos ácidos.

6. As relações ecológicas entre o hospedeiro e os isolados de fungos micorrízicos arbusculares analisados separadamente não foram uniformes, mas, sim, um *continuum*, desde o parasitismo até o mutualismo.

B – Eficiência de dois isolados de FMA em macieiras micropropagadas cultivadas em solo não esterilizado.

1. O isolado de *Glomus etunicatum* não demonstrou ser eficiente em competir com a população nativa do solo do pomar de Caçador e manter os benefícios em termos de estímulo à produção de biomassa observados em solo esterilizado (Capítulo 2).

2. O isolado de *Scutellospora pellucida* demonstrou ser eficiente em condições de competição e estimulou o crescimento das macieiras tanto no solo esterilizado quanto em solo com a presença da microbiota nativa.

3. De maneira geral, o inóculo misto foi tão eficiente em estimular o crescimento das plantas quanto o isolado de *Scutellospora pellucida* inoculado isoladamente, e tão eficiente em aumentar a concentração de elementos no tecido vegetal quanto o isolado de *Glomus etunicatum* inoculado separadamente.

4. Outros experimentos devem ser realizados para que seja possível a avaliação da competitividade, persistência e eficiência em condições de campo de ambos os inóculos SP e GE+SP.

Dos resultados obtidos em ambos os experimentos, conclui-se que o isolado de *Scutellospora pellucida* foi eficiente em estimular o acúmulo de biomassa vegetal e absorver nutrientes em macieiras micropropagadas cultivadas tanto em solos ácidos esterilizados como em condições de competição com a microbiota indígena do solo. Em condições de solo não esterilizado, o inóculo misto, composto por *S. pellucida* e *G. etunicatum*, foi tão eficiente em estimular a produção de biomassa quanto o isolado de *S. pellucida* inoculado isoladamente.