

DIEGO PASQUALINI

**INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS
ARBUSCULARES E BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS
DE FOSFATO COMO ALTERNATIVAS PARA
AGRICULTURA FAMILIAR E RECOMPOSIÇÃO
FLORÍSTICA**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito para obtenção do título de Doutor em manejo do solo.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pires Santos

Co-orientador: Prof. Ph.D. Sidney L. Stürmer

**LAGES, SC
2013**

P284i Pasqualini, Diego
Inoculação de fungos
micorrízicos arbusculares e bactérias
solubilizadoras de fosfato como alternativas
para agricultura familiar e recomposição
florística. / Diego Pasqualini. -2013.
178p. : il. ; 21 cm

Orientador: Julio Cesar Pires Santos
Coorientador: Sidney L. Stürmer
Bibliografia: p. 145-178
Tese (doutorado) - Universidade do Estado
de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós- Graduação
em Manejo do Solo, Lages, 2013.

1. Micorriza. 2. Solubilizador fosfato.
3. Microrganismos.I. Pasqualini, Diego.
II.Santos,Julio Cesar Pires. III.Universidade
do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Manejo do Solo. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Setorial
do CAV/UDESC

DIEGO PASQUALINI

INOCULAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E BACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO COMO ALTERNATIVAS PARA AGRICULTURA FAMILIAR E RECOMPOSIÇÃO FLORÍSTICA

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Manejo do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Banca Examinadora:

Orientador:

Dr. Julio Cesar Pires Santos
(UDESC/Lages – SC)

Co-

orientador:

Ph.D. Sidney Luiz Sturmer.
(FURB/Blumenau – SC)

Membro:

Dr. Osmar Klauberg Filho
(UDESC/Lages – SC)

Membro:

Ph.D. Sonia Purin
(UFSC/ Curitibanos – SC)

Membro:

Dr. Mauricio Vicente Alves
(UTFPR/Dois Vizinhos – PR)

Lages, Santa Catarina,
21 de Maio de 2013

Dedico a todos que contribuem para um mundo ecologicamente melhor. A minha família e, em especial, a minha mãe e esposa.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que me ajudaram com a “carona” durante minhas viagens até Lages.

A Julio Cesar Pires Santos, profissional que foi muito mais que orientador e professor. Sempre presente, quando não sumia pelas paredes, contribuiu de forma ímpar no aprendizado e na formação. Durante quatro anos, não mediu esforços em ajuda e contribuição, sendo, além de orientador, um grande amigo, o qual jamais esquecerei.

Ao professor Sidney L. Stürmer, pela disponibilidade de orientação e pela abertura das portas do Laboratório de Micorrízas da FURB para a continuação da pesquisa. Foram dois anos de aprendizado e amizade.

A minha família (pai, irmã, cunhado e sobrinhos) e a família da minha esposa, Juliane, pelo carinho e incentivo. Sem a ajuda e o auxilio deles teria sido mais difícil ter chego até aqui.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Departamento de Solos, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao meu Bolsista, Leonel, que na minha ausência em Lages, auxiliou boa parte das pesquisas.

Aos demais colegas da UDESC.

Aos amigos da FURB, Karl, Denis, Andressa, Andreza, Tiago, Morilo.

Aos produtores rurais que acreditaram nas pesquisas realizadas.

Ao CNPQ, pelo auxilio na bolsa

A todos que esqueci.

RESUMO

PASQUALINI, Diego. **Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e bactérias solubilizadoras de fosfato como alternativas para agricultura familiar e recomposição florística.** 2013. 178 f. Tese (Doutorado em Manejo do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC, 2013.

O uso de microrganismos que auxiliam na nutrição e no crescimento de plantas é uma importante alternativa ao uso de fertilizantes químicos. O presente estudo foi dividido em quatro trabalhos distintos, sendo o primeiro relacionado a multiplicação de inoculante micorrízico pelo método *on farm* com plantas pré-inoculadas, o segundo relacionada a multiplicação de inóculo pelo método *on farm* e sua aplicação na cultura do milho, o terceiro tratou de processos de inoculação conjunta e isolada de bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em duas espécies florestais e o quarto avaliou a dependência micorrízica das duas espécies florestais. Sendo assim, o objetivo geral foi aprimorar tecnologias já existentes na utilização de microrganismos do solo capazes de propiciar melhor absorção de P pelas plantas. Para o primeiro experimento foram utilizadas plantas de sorgo pré-inoculadas para multiplicação de inoculante em sacos de mudas com capacidade de 20L. Após 3 meses de crescimento em condições de campo foi avaliado o potencial de inóculo micorrízico, porcentagem de colinização radicular e número de esporos produzidos. Para o segundo experimento, foi utilizado solo do campo misturado com vermiculita (1:1) acondicionados em sacos de 20L. Cada saco recebeu 10% de inóculo contendo FMA adicionado de forma direta e com planta hospedeira utilizou-se aveia. Após 3 meses o inoculante produzido via inoculação direta foi utilizado na cultura do milho para posterior avaliação de

produtividade. O terceiro trabalho contou com o isolamento de bactérias solubilizadoras de fosfato de solos de áreas de nascente e de florestas do município de Laurentino-SC e posterior inoculação de 5 bactérias solubilizadoras de fosfato, de forma conjunta ou não, ao isolado de FMA *Rhizophagus clarus*, nas espécies florestais *Acca sellowiana* e *Citharexylum myrianthum* em condições de casa de vegetação e a campo. O quarto experimento foi realizado em condições de casa de vegetação onde as duas espécies florestais utilizadas no experimento 1 foram submetidas a crescimento em 3 níveis distintos de P no solo e 4 tratamentos de FMAs (*Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatus*, *Dentiscutata heterogama* e controle). Após 3 meses, o experimento foi coletado e analisada a dependência micorrízica. Os resultados obtidos demonstram que o processo de inoculação conjunta de bactérias solubilizadoras de fosfato e FMAs beneficiaram o crescimento das duas espécies florestais testadas. Em relação a produção *on farm* de inoculante micorrízico, as duas metodologias apresentaram resultados positivos no aumento do potencial de inoculo micorrízico dos inoculantes produzidos, foram de fácil aplicabilidade e a utilização de inoculante multiplicado via inoculação direta proporcionou incremento significativo na produtividade do milho. As duas espécies florestais apresentaram variação na dependência micorrízica e o isolado *R. clarus* apresentou maiores valores absolutos em relação aos outros dois isolados testados. As tecnologias aqui estudadas, embora tenham demonstrado benefício, ainda necessitam de estudos para poderem ser aplicadas de forma comercial.

Palavras Chave: Micorriza. Solubilizador fosfato. Microrganismos.

ABSTRACT

PASQUALINI, Diego. **Inoculation with mycorrhizal fungi arbusculae and phosphate solubilizing bacteria as alternatives for family farming and rebuilding floristic** 2013. 178 f. Thesis (Doutorado em Manejo do Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Lages, SC, 2013.

The use of microorganisms that help plant nutrition and growth is an important alternative to the use of chemical fertilizers. This study was divided into four distinct works, the first is related to the multiplication of mycorrhizal inoculant using the on farm method with pre inoculated plants, the second study involves the production of mycorrhizal inoculum using the on farm methodology and its application in corn, the third evaluated the process of single or dual inoculation of phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in two forest species, and the fourth assessed the mycorrhizal dependency of the two forest species. The overall goal was to improve existing technologies for the use of soil microorganisms capable of providing better P uptake by plants. For the first experiment, pre inoculated sorghum plants were transplanted into bags with a capacity of 20L. After 3 months of growth under field conditions, the mycorrhizal inoculum potential, root mycorrhizal colonization and number of spores were evaluated. For the second experiment, we used field soil mixed with vermiculite (1:1) in 20 L bags. Each bag received 10% of AMF inoculum mixed with the soil : vermiculite mix and seeded with oats as the host plant. After 3 months, this inoculum was used in corn to evaluate its effect on plant productivity. The third work was the isolation of phosphate solubilizing bacteria from soils near spring waters and forests in the municipality of Laurentino SC and subsequent inoculation (single or dual) with the AMF *Rhizophagus clarus*, in *Acca sellowiana* and *Citharexylum*

myrianthum, under greenhouse and field conditions. The fourth experiment was conducted in a greenhouse where the *Acca sellowiana* and *Citharexylum myrianthum* were grown in 3 different levels of soil P and 4 mycorrhizal treatments (*Rhizophagus clarus*, *Claroideoglomus etunicatus*, *Dentiscutata heterogama* and control). After 3 months the experiment was collected and the mycorrhizal dependency calculated. Results demonstrate that the process of dual inoculating of phosphate solubilizing bacteria and AMF was benefit to both forest species tested. Considering the production of mycorrhizal inoculant using the on farm method, it was demonstrated that: i) both method of inoculation (pre colonized plants and direct inoculation) increased the mycorrhizal inoculum potential, ii) the inoculant is feasible to apply, and iii) using on farm inoculant produced by direct inoculation increased corn productivity.. Both forest species varied in their mycorrhizal dependency and the highest values were obtained when inoculated with *Rhizophagus clarus* compared to other two isolates.. The technologies studied here have shown the benefit although further studies are still needed in order to be applied commercially.

Keywords: Mycorrhiza. Solubilizing phosphate. Microorganisms

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - O ciclo do P no solo	34
Figura 2 - Mudanças na forma do P solúvel do solo afetado pelo pH.....	38

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comparação de propágulos infectivos obtidos nos momentos de montagem e coleta	70
Gráfico 2 – Número mais provável (NMP) de propágulos infectivos obtidos nos momentos de montagem e coleta do experimento 1	84
Gráfico 3 – Número de espigas produzidas por planta	87
Gráfico 4 – Produtividade de grãos de milho (kg ha ⁻¹).....	88
Gráfico 5 – Número de bactérias solubilizadoras isoladas das áreas de nascente e de florestas no município de Laurentino/SC	102
Gráfico 6 – Altura (cm) de <i>A. sellowiana</i> inoculada com <i>R. clarus</i> , <i>C. etunicatus</i> e <i>D. heterogama</i> em três níveis de P	131
Gráfico 7 – Massa da parte aérea seca (g) de <i>C. myrianthum</i> inoculada com <i>R. clarus</i> , <i>C. etunicatus</i> e <i>D. heterogama</i> em três níveis de P.....	132
Gráfico 8 – Massa parte aérea seca (g) de <i>A. sellowiana</i> inoculada com <i>R. clarus</i> , <i>C. etunicatus</i> e <i>D. heterogama</i> em três níveis de P	133
Gráfico 9 – Porcentagem de colonização micorrízica de <i>C. myrianthum</i> inoculada com <i>R. clarus</i> , <i>C. etunicatus</i> , <i>D. heterogama</i> em 3 níveis de P	136
Gráfico 10 – Porcentagem de colonização micorrízica de <i>A. sellowiana</i> inoculada com <i>R. clarus</i> , <i>C. etunicatus</i> e <i>D. heterogama</i> em 3 níveis de P	137
Gráfico 11 – Dependência micorrízica de <i>C. myrianthum</i> inoculada com <i>R. clarus</i> , <i>C. etunicatus</i> e <i>D. heterogama</i> em três níveis de P.....	138
Gráfico 12 – Dependência micorrízica de <i>A. sellowiana</i> inoculada com <i>R. clarus</i> , <i>C. etunicatus</i> e <i>D. heterogama</i> em três níveis de P	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Potencial infectivo médio (PIM), obtido por meio da % de colonização radicular na montagem e coleta.....	69
Tabela 2 - Porcentagem de colonização, número esporos/100ml e número de esporos nativos encontrados em raízes de sorgo	71
Tabela 3- Delineamento experimental a campo do experimento milho	82
Tabela 4 – Potencial infectivo médio (PIM), obtido através da % de colonização radicular.....	84
Tabela 5 – Porcentagem de colonização, número esporos e número de esporos nativos no experimento 1	85
Tabela 6 - Análise de variância do experimento 2.....	85
Tabela 7 – Descrição dos 14 tratamentos utilizados na inoculação de goiaba serrana e tucaneira	99
Tabela 8 – Análise química do solo coletado nas áreas amostradas do município de Laurentino – SC.	101
Tabela 9 - Caracterização morfo-fisiológica das bactérias solubilizadoras de fosfato oriundas das amostras de solo do município de Laurentino – SC	90
Tabela 10 - Massa de parte aérea seca (MPAS, g) das espécies tucaneira goiaba serrana após 180 dias de cultivo.....	106
Tabela 11 - Massa de raiz seca (MRS, g) das espécies tucaneira e goiaba serrana após 180 dias de cultivo	108
Tabela 12 - Altura (cm) das espécies tucaneira e goiaba serrana após 180 dias de cultivo	110
Tabela 13 – Concentração de P na parte aérea das espécies tucaneira e goiaba serrana após 180 dias de cultivo.....	112
Tabela 14 – Porcentagem de colonização radicular de tucaneira e goiaba serrana após 180 dias de cultivo	114
Tabela 15 – Altura a campo das espécies tucaneira e goiaba serrana após 1 ano de cultivo	116
Tabela 16 - Diâmetro do caule a campo das espécies tucaneira e goiaba serrana após 1 ano de cultivo.....	118

Tabela 17 – Análise de variância para os parâmetros de massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, altura e fósforo (%)	131
--	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	29
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	32
2.1 AGRICULTURA FAMILIAR.....	32
2.2 FÓSFORO (P).....	33
2.2.1 Ciclo e disponibilidade de fósforo (P) na natureza	33
2.2.2 Fósforo orgânico e inorgânico.....	35
2.2.3 Fósforo no solo	37
2.2.4 Fósforo nos organismos vivos.....	40
2.3 SOLUBILIZADORES DE FOSFATO	42
2.3.1 Processos de solubilização	43
2.3.2 Microrganismos solubilizadores	44
2.4 Fungos micorrízicos arbusculares.....	47
2.4.1 Características gerais da simbiose	47
2.4.2 Dependência e resposta micorrízica	51
2.4.3 Produção de inoculante micorrízico	56
2.4.3.1 Método de produção <i>on farm</i>	56
2.4.3.2 Método de produção sem substrato.....	59
2.4.3.3 Método de produção <i>in vitro</i>	61
3 CAPÍTULO I - PRODUÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO <i>ON FARM</i> POR MEIO DE PLANTAS PRÉ-INOCULADAS.....	64
3.1 INTRODUÇÃO	65
3.2 METODOLOGIA	66
3.3 RESULTADOS	69
3.4 DISCUSSÃO	71
4 CAPÍTULO II - MULTIPLICAÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO <i>ON FARM</i> E APLICAÇÃO EM LAVOURA DE MILHO (<i>Zea Mays</i> L).....	75
4.1 INTRODUÇÃO	75
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	78
4.2.1 Experimento 1 – Produção de inóculo micorrízico <i>on farm</i> com inoculação direta.....	79

4.2.2 Experimento 2 – Teste de inóculo produzido <i>on farm</i> na cultura do milho (<i>Zea mays L.</i>)	81
4.3 RESULTADOS	83
4.4 DISCUSSÃO	88
4.5 CONCLUSÕES	92
5 CAPÍTULO III - INOCULAÇÃO DE SOLUBILIZADORES FOSFATO E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM GOIABA SERRANA E TUCANEIRA.....	79
5.1 INTRODUÇÃO	94
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	96
5.2.1 Área de estudo	96
5.2.2 Coleta de solo	97
5.2.3 Pré isolamento dos microrganismos	98
5.2.4 Teste dos solubilizadores de fosfato e dos fungos micorrízicos arbusculares	98
5.3 RESULTADOS	101
5.4 DISCUSSÃO	119
5.5 CONCLUSÕES	124
6 CAPÍTULO IV - DEPENDÊNCIA MICORRÍZICA DAS ESPÉCIES ARBÓREAS GOIABA SERRANA (<i>Acca sellowiana</i>) E TUCANEIRA (<i>Citharexylum myrianthum</i>).....	126
6.1 INTRODUÇÃO	126
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	129
6.3 RESULTADOS	130
6.4 DISCUSSÃO	139
6.5 CONCLUSÕES	143
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	144
REFERÊNCIAS.....	145

1 INTRODUÇÃO

Grandes alterações ambientais vêm ocorrendo nos mais variados biomas nas últimas décadas. Muitos fatores têm contribuído para esse problema, entretanto, destaca-se o aumento da população e as suas consequências como o avanço das cidades e áreas de produção agrícola sobre as florestas, o crescente aumento da emissão de gases poluentes, a liberação de efluentes em mananciais e a baixa utilização de práticas que minimizem a degradação ambiental. Muitos países já se conscientizaram que a preservação ambiental não pode ser tratada somente como *marketing*, ela deve, sim, ser tratada com seriedade e ações drásticas que visem à proteção dos ecossistemas indispensáveis para a manutenção da vida no planeta. O crescimento descontrolado acaba exaurindo recursos naturais indispensáveis à manutenção de todas as formas de vida do planeta. Dentro deste contexto, água e solo são fatores preponderantes, já que todas as espécies dependem deles para realizarem suas atividades vitais.

No Brasil, problemas de degradação ambiental são comumente verificados nos ecossistemas florestais e agrícolas em todos os estados da federação. O estado de Santa Catarina tem estrutura fundiária caracterizada por propriedades de pequeno tamanho com intensa exploração e produção com baixo nível tecnológico, o que gera problemas de degradação agrícola e ambiental. A perda da vegetação ciliar, acompanhada da degradação do solo, vem reduzindo a qualidade e quantidade da água disponível para a população urbana e rural, bem como agravando as características químicas, físicas e biológicas do solo. Os fatos citados acima chamam atenção para uma busca de alternativas que visem reduzir ao mínimo os problemas gerados pelo avanço no uso de solos agrícolas e florestais, bem como, melhorar a qualidade e disponibilidade de água e conservação do potencial produtivo dos solos.

Muitas alternativas foram criadas na última década, entretanto, tecnologias menos impactantes, como a utilização de microrganismos existentes no próprio solo, destaca-se devido à grande eficiência no controle e manutenção da qualidade ambiental e nos processos de recuperação de áreas degradadas. Além disso, a ação dos microrganismos contribui para o aumento da disponibilidade de nutrientes existentes no solo, tais como fósforo e nitrogênio, contribuindo, assim, com o crescimento de espécies vegetais.

Devido à baixa disponibilidade de P no solo, a inoculação de espécies vegetais com microrganismos que auxiliem na disponibilidade

deste elemento torna-se imprescindível no suprimento das demandas nutricionais das plantas. Entre os principais microrganismos que podem desempenhar essa função destacam-se os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a bactérias solubilizadoras de fosfato.

Os FMAs auxiliam as plantas na obtenção de P por intermédio da formação de uma rede de hifas que aumentam a superfície de exploração do solo pelas raízes. As bactérias solubilizadoras de P agem de uma forma diferenciada, secretando exudatos que solubilizam moléculas contendo P, tornando esse elemento disponível para ser absorvido pelas raízes das plantas. Dessa forma, pode-se supor que a co-inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares incremente a disponibilidade de fósforo para as plantas, potencializando o efeito benéfico dos microrganismos nos processos de recuperação de áreas degradadas ou de produção agrícola. Assim sendo, a inoculação simples ou conjunta desses dois microrganismos pode constituir importante estratégia de recuperação de áreas degradadas, bem como em lavouras agrícolas.

Métodos de produção de inoculantes microbianos que visem a multiplicação de microrganismos em larga escala e que proporcionem maior apporte de nutrientes para as plantas, tornam-se necessários para serem disponibilizados de forma comercial a viveiristas e agricultores. Contudo, testes devem ser realizados para verificar qual a melhor forma de produção, levando em consideração a relação custo-benefício, quantidade de propágulos infectivos e a forma de aplicação e utilização do inoculante.

Sabe-se que a utilização de técnicas de fertilização e inoculação biológica permite uma agricultura mais eficaz, com aumento na produtividade e maior proteção do meio ambiente. Contudo, mudanças são necessárias para que produtos biológicos passem a ser considerados como produtos de primeira opção e não alternativos para o meio agrícola e florestal. Entre as principais mudanças está na forma de como se devem estudar os microrganismos, suas funções e suas interações. Além disso, deve-se levar aos produtores os resultados obtidos por meio da inoculação e incentivar o uso dessa tecnologia, já que o Brasil é, atualmente, reconhecido mundialmente por sua organização, de forma sistêmica, de toda uma política de pesquisa e produção de inoculantes.

Frente ao exposto acima, indagações, tais como ‘Será que microrganismos solubilizadores de fosfato e fungos micorrízicos atuam sinergicamente, beneficiando o desenvolvimento de espécies florestais? Processos de co-inoculação atuam sinergicamente, propiciando melhor estabelecimento e crescimento inicial da goiaba serrana e tucaneira no

campo? Diferentes espécies respondem de maneira igualitária a processo de inoculação? O protocolo utilizado para a produção de inóculo micorrízico *on farm* mostra-se eficiente na sua aplicabilidade a campo, tornando-se viável no aumento da produtividade da cultura do milho? A aplicação de inoculante micorrízico *on farm* a campo interfere nos resultados de produtividade da cultura do milho?”, guiaram esse trabalho, cujo objetivo geral foi adequar o uso de tecnologias microbianas de baixo impacto ambiental que auxiliem no crescimento e desenvolvimento de espécies arbóreas e culturas anuais.

Para isto, a presente tese é composta por quatro experimentos. O primeiro trabalho visa a obtenção de uma metodologia de produção de inóculo de FMA em escala comercial, o segundo visa a produção de inoculante de FMA escala comercial a campo e o teste na cultura do milho. O Terceiro experimento tem por objetivo testar o benefício da co-inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares nas espécies goiaba serrana (*Acca sellowiana*) e tucaneira (*Citharexylum myrianthum*). O Quarto trabalho averiguou a dependência micorrízica das duas espécies utilizadas no primeiro trabalho em três níveis de fósforo e inoculadas com três espécies distintas de FMAs.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGRICULTURA FAMILIAR

No estado de Santa Catarina estima-se que a agricultura familiar envolve um universo de 180 mil famílias, representando mais de 90 % da população rural e responsável por mais de 70% do valor da produção agrícola e pesqueira do estado (ICEPA, 2010). Esse modelo de agricultura é caracterizado pela não existência de vínculo patronal, pois as atividades são realizadas pelos membros da família. A agricultura familiar possui como características o sistema de gestão feito pelos proprietários, trabalho fundamentalmente familiar, onde o capital pertence a família e a mesma reside na unidade produtiva, entre outros (ABRAMOVAY, 2004). De acordo com Hecht (2000), o sistema de produção da agricultura familiar é caracterizado não somente pelos critérios de rentabilidade, mas também pelas necessidades objetivas da família e pelas questões culturais.

O sistema produtivo baseado na agricultura familiar, quando não realizado de forma correta pode gerar danos irreversíveis ao solo e ao meio ambiente. Processos como formação dos solos, lixiviação, erosão, deslizamentos, modificação da cobertura vegetal, entre outros, ocorrem nos ambientes naturais, nas áreas agrícolas e nas áreas florestais, independente da ação humana, causando sérios problemas de degradação. Na área agrícola a degradação do solo é uma das maiores responsáveis pelos altos custos de produção e de diminuição de produtividade, o que, em casos extremos, pode tornar a atividade inviável (COOPER, 2008; KOBYAMA, 2001). Segundo Kobyama (2001), a agricultura familiar ou intensiva contribui de forma representativa na contaminação da água e do solo, em nível mundial. A não observação dos fatores causadores de degradação, acima citados, podem, ao longo dos anos, transformar áreas agrícolas produtivas em ambientes degradados e inaptos a agricultura.

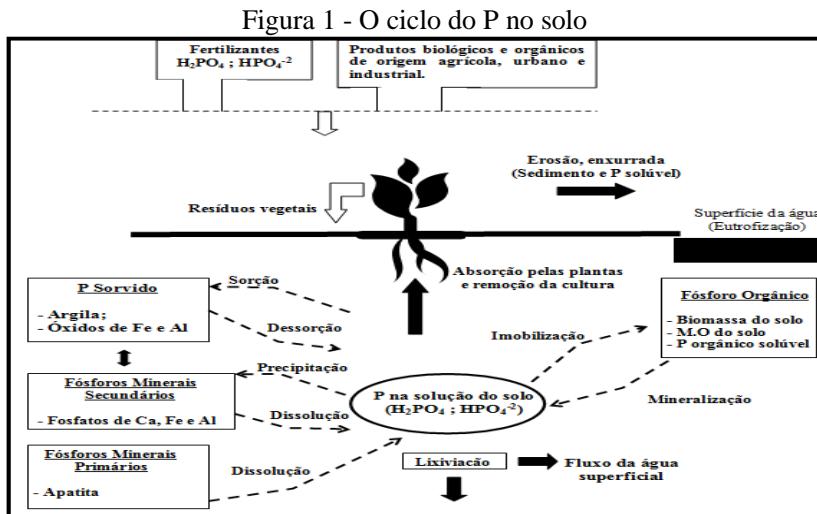
A agricultura familiar, atualmente, vem passando por transformações que visam a permanência e a sustentabilidade das famílias na agricultura. Assim, alternativas que aumentem a renda dos produtores e sua produtividade são imprescindíveis para a manutenção desse sistema. Uma alternativa é a inserção de modelos de agricultura sustentável e agroecológica dentro do contexto da agricultura familiar, visto que, quando se trabalha com sistemas que possuem menor potencial de degradação do meio ambiente, ganha-se em qualidade e rentabilidade. Assis (2002) relata que os sistemas de produção de base

agroecológica caracterizam-se pela utilização de tecnologias que respeitem a natureza, de forma a diminuir as alterações nas condições de equilíbrio entre os organismos participantes no processo de produção, bem como do ambiente. Quanto à sustentabilidade na agricultura, esta significa a “possibilidade de se obterem continuamente condições iguais ou superiores de vida para um grupo de pessoas e seus sucessores em dado ecossistema” (CAVALCANTI, 1998).

2.2 FÓSFORO (P)

2.2.1 Ciclo e disponibilidade de fósforo (P) na natureza

O Fósforo (P) possui um ciclo (Figura 1) no ambiente terrestre, sendo bastante complexo e exibindo, assim, grande diversidade de formas químicas (HAYGARTH; JARVIS, 1999; PIERZYNSKI et al., 2005). O ciclo pode ser compreendido considerando as vias de adição, perda e ciclagem interna de P. A adição de P ao solo ocorre de duas formas, via resíduos das plantas e via fertilização. A primeira ocorre de forma natural quando os restos vegetais como folhas, galhos, caules, frutos, entre outros, caem das plantas e atingem o solo ou via adição de resíduos de outras plantas a áreas cultivadas. Já a segunda ocorre quando se utiliza adubos químicos que possuem P na sua formulação, sendo que nesse processo o fósforo torna-se rapidamente disponível para as plantas, enquanto no processo de adição via restos culturais a disponibilidade é lenta.



Fonte: Sims (2005) Adaptado de Pierzynski et al. (2000)

Como é um ciclo, após a adição de P no solo, o mesmo passa por diversas transformações das formas inorgânicas, como sorção e dessorção a óxidos de Fe e Al, e precipitação e dissolução em fosfatos de Ca, Fe e Al. Essas transformações tornam-se necessárias para manutenção do ciclo e da disponibilidade de P na solução do solo. Além disso, as formas orgânicas também se transformam no ciclo do P por meio de dois processos chamados de mineralização e imobilização, que também atuam ativamente no ciclo do P (GATIBONI, 2003). A mineralização ocorre quando o fluxo do P orgânico do solo vai em direção ao fósforo da solução, já a imobilização é quando o P da solução do solo passa a fazer parte do P orgânico, diminuindo, assim, a disponibilidade de P em solução. Após os processos de adição e transformação do P há, também, o processo de perda ou remoção que ocorre via absorção desse elemento pela planta e remoção dos restos culturais e, também, via erosão e lixiviação do solo (NOVAIS; SMITH, 1999).

Na natureza o P é um elemento mais raro do que o nitrogênio, contudo, dentre todos os nutrientes é o que pode ser fornecido por maior número de fontes (GATIBONI, 2003). A disponibilidade e o fornecimento são influenciados por diversos fatores, tais como o tipo de fonte de P, tipo de solo e interação com microrganismos e intemperismo, sendo esse o responsável pela ruptura dos minerais

primários (LOBATO, 2003). Atualmente, o ciclo do fósforo passou a ser estudado com maior profundidade devido a grande importância desse nutriente no processo de formação dos solos e na produtividade agrícola.

Durante o processo de gênese e formação dos solos ocorre a liberação de P por meio da ação do intemperismo sobre a rocha mãe, geralmente denominada de apatita, que inicia ruptura dos minerais primários, onde o fósforo é liberado para a solução do solo e readsorvido aos colóides, porém, uma parte é absorvida pelos organismos e pelas plantas (GATIBONI, 2003). Neste estágio de formação do solo, ocorre a maior indisponibilidade de fósforo, já que os colóides inorgânicos são pouco intemperizados e a quantidade de sítios adsorventes é pequena. Assim, através da ação do intemperismo, da liberação de P para a solução do solo e da absorção do elemento pelas plantas e microrganismos, é possível encontrar no solo o fósforo em duas formas distintas, orgânico e inorgânico. A separação das formas de P está relacionada de acordo com o composto a qual o P está ligado e com o material de origem do solo (HAYGARTH; JARVIS, 1999).

2.2.2 Fósforo orgânico e inorgânico

O fósforo orgânico é originário dos resíduos vegetais e animais aplicados no solo e dos seus resíduos de decomposição (CONTE et al., 2002; MARTINAZZO et al., 2007), podendo representar 30 a 50% do fósforo total do solo (RICHARDSON et al., 2009). As principais formas de fósforo orgânico no solo são fosfato de inositol, fosfolipídios, ácidos nucléicos e outros ésteres fosfato (DALAL, 1977 e NAHAS, 1991; GYANESHWAR et al., 2002).

As formas orgânicas de fósforo também atuam como base de Lewis, podendo, ser adsorvidas aos grupos funcionais de superfície dos compostos inorgânicos do solo (argilominerais, óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio) com diferentes energias de ligação, de modo que fiquem disponíveis ou não à mineralização ou susceptíveis às perdas para o ambiente (PELLEGRINI, 2005). De acordo com PIERZYNSKI et al. (2000), a biodegradação das espécies orgânicas de P libera inicialmente P orgânico dissolvido, o qual, com o tempo, é convertido em formas inorgânicas estáveis. Ofósforo orgânico pode variar de 1 a 3 % da matéria orgânica do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), podendo corresponder à maior parte do teor de P disponível (P-lábil) (CUNHA et al., 2007).

Além disso, o P orgânico é adsorvido preferencialmente em relação ao P inorgânico, tendo, assim, um efeito benéfico indireto ao aumentar a disponibilidade do P mineral no solo (CUNHA et al., 2007). Segundo esse mesmo autor, a dinâmica do P orgânico mantém íntima relação com a dinâmica da matéria orgânica do solo. Assim, sistemas florestais e agroflorestais acumuladores de matéria orgânica (GAMA-RODRIGUES et al., 2007), tornam-se capazes de manter adequadamente a disponibilidade de P para as plantas (GAMA-RODRIGUES et al., 1999), mediante a mineralização de P orgânico (COMERFORD et al., 2006).

O fósforo inorgânico presente no solo (> 70% do P total) é originário das rochas fosfáticas intemperizadas, principalmente as que contêm minerais de apatita, dos fertilizantes químicos e orgânicos e lodos de esgoto adicionados como complementação nutricional (GATIBONI, 2003; COMERFORD et al., 2006). Este fósforo pode ser separado em duas partes, o adsorvido aos minerais primários ou estruturais e o da solução do solo, que é encontrado em pequenas quantidades (GATIBONI, 2003). O fósforo adsorvido pode ser encontrado ligado a vários minerais do solo devido a sua elevada capacidade de formar complexos de alta energia de ligação. Nesses complexos, as formas de P podem estar associadas a óxidos de ferro e alumínio, formando, assim, fosfato de ferro (P-Fe) e alumínio (P-Al) em solos ácidos. Já em solos alcalinos as forma de P ligam-se a carbonatos de cálcio (P-Ca) (NOVAIS; SMITH, 1999). Desta forma sabe-se que, preferencialmente, as formas de P associam-se a moléculas de P, Al e Ca.

O fósforo inorgânico pode, também, ser imobilizado ou absorvido pelos microrganismos e plantas, o que reduz temporariamente sua disponibilidade no meio (SINGH; LAL, 2005). O P imobilizado na biomassa microbiana pode ser liberado pela ruptura das células microbianas, promovida por variações climáticas e de manejo de solo, e, também, por causa das interações com a microfauna (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). O P contido na biomassa funciona como uma proteção desse nutriente, diminuindo sua fixação por períodos prolongados em minerais do solo (PAUL; CLARK, 1996) e aumentando a eficiência da adubação fosfatada (HE et al. 1997). Dessa forma, o conteúdo e o fluxo de P, por meio da biomassa microbiana, desempenham importante papel como reservatório de P. Entretanto, sabe-se que a quantidade de fósforo orgânico e inorgânico no solo pode variar durante o ciclo de cultivo e os processos de pedogênese devido à ação dos fatores que controlam o intemperismo e o tipo de material

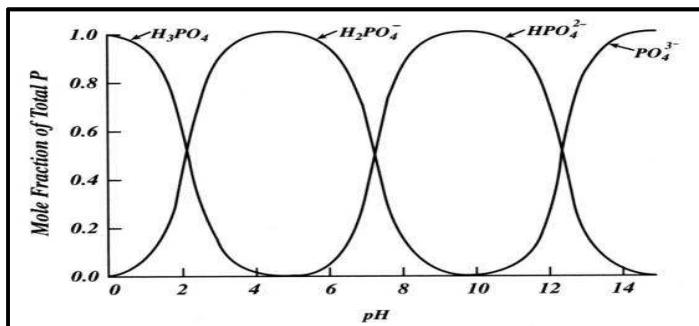
originário. Contudo, sabe-se que quanto maior o intemperismo dos solos, menor é a quantidade de P disponível para as plantas (NOVAIS; SMITH, 1999).

2.2.3 Fósforo no solo

Estima-se que 25% dos solos tropicais e subtropicais apresentam deficiência acentuada de fósforo devido ao alto grau de intemperismo (SANCHES; LOGAN, 1992). Essa deficiência é oriunda da dessilicatação intensa provocada pelo intemperismo que concentra, principalmente, óxidos de ferro e alumínio, os quais são responsáveis pela característica de alta capacidade de sorção de fósforo, tornando o solo um dreno de fósforo (NOVAIS; SMITH, 1999). O baixo nível de P nos solos é devido a alta reatividade de fosfatos solúveis com outros elementos, como alumínio e ferro, em solos ácidos e cálcio, em solos calcários (FAGERIA, 2001). Os solos geralmente apresentam uma grande quantidade de P total, entretanto, somente uma pequena parte está imediatamente disponível na solução do solo como ânions ortofosfato (predominantemente como HPO_4^{2-} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{1-}$) para absorção pelas plantas (CUNHA et al., 2007). Esta forma é conhecida como P-lábil, que é o P adsorvido e que pode ser rapidamente liberado, tornando-se disponível na solução do solo. Este fluxo de P da forma lábil-solução ou solução-lábil varia de acordo com a mineralogia, textura, teor de matéria orgânica, atividade biológica e intemperização do solo (NOVAIS; SMYTH; NUNES 2007). Isso demonstra que há transferência de P entre os compartimentos do ambiente devido a transformação de fosfatos naturais em formas orgânicas e inorgânicas.

A distribuição dos ânions de ortofosfato no solo obedecem a um gradiente de pH (Figura 2). Conforme ocorre alteração no pH do solo ocorre, também, mudanças na forma de P solúvel. Quanto maior o pH menor a quantidade moléculas de H nas formas de P disponíveis. Em pH menor que 2 ocorre o predomínio da espécie H_3PO_4 , a espécies H_2PO_4^- entre pH 2 e 6,5, entre pH 8 e 10 a espécie HPO_4^{2-} e pH acima de 12 a espécie PO_4^{3-} (PIERZYNSKI et al., 2000). As espécies de ortofosfatos tendem a interagir com minerais de Fe e Al em pH menor que 5,8 e, acima desse valor, com os minerais Ca e Mg (SHARPLEY et al., 1995). Entretanto, a bio/geodisponibilidade e a movimentação do fósforo ocorre, normalmente, em valores de pH entre 6 e 7 (McDOWELL, 2004).

Figura 2 - Mudanças na forma do P solúvel do solo afetado pelo pH



Fonte: Pierzynski; Sims e Vance (2005) adaptado de Foth et al. (1997)

Os processos de adsorção/sorção, que consistem na transferência de íons da solução do solo para a fase sólida (McBRIDE, 1994), é a principal forma de interação dos fosfatos com a fase sólida do solo: óxidos, hidróxidos, argilominerais, carbonatos e matéria orgânica (PIERZYNSKI et al., 2000). A adsorção é um processo espontâneo que ocorre logo após a adição de fósforo no solo, sendo reversível no início, contudo, podendo levar algum tempo para alcançar o estado de equilíbrio (REDDY et al., 2005). Tal fato é importante para manter a reposição do P na solução e a manutenção da fertilidade do solo. Em contato com o solo por longo período de tempo, o fósforo torna-se menos disponível com aparecimento de formas menos lábeis, que apresentarão baixa habilidade de fornecer fósforo para a solução (RAIJ, 1991; REDDY et al., 2005). Esse processo dependerá da afinidade metal-fosfato e da superfície específica das partículas (BERKHEISER et al., 1980). O incremento de P no solo via insumos agrícolas pode elevar o grau de saturação da solução, o que propicia as reações de precipitação dos ortofosfatos com íons de Fe, Al e Ca com formação de minerais amorfos desses compostos (REDDY et al., 2005).

A adição de matéria orgânica em solos ácidos contribui para a redução de adsorção de fósforo, pois a decomposição desse material favorece a produção de OH⁻, o qual compete com os íons fosfatos pelos sítios de adsorção, elevando o pH e diminuindo a interação de fosfato íons de Fe e Al (IYAMUREMYE; DICK; BAHAM, 1996). Este mesmo autor relata que a mineralização da matéria orgânica libera SO₄²⁻ e F⁻, compostos estes que apresentam alta afinidade com Al e Fe e, dessa forma, contribuem para liberar fosfato para o meio. Solos de regiões tropicais são altamente intemperizados, caracterizando-se pela

deficiência em nutrientes (SANTOS et al., 2008), especialmente o fósforo (P). Apesar do P estar presente nos solos tanto nas formas orgânicas e inorgânicas e sendo fundamental no metabolismo de plantas e microrganismos (RHEINHEIMER, ANGHINONI e CONTE, 2008), a carência de P limita a produtividade vegetal (SYLVESTER-BRADLEY et al., 1982).

Em solos brasileiros a quantidade de P disponível é, geralmente, muito baixa ($0,03\text{mg P kg}^{-1}$) (MENDES; REIS JUNIOR, 2003), pois esse elemento se encontra altamente estável e adsorvido aos colóides amorfos, matéria orgânica e aos minerais de argila (NOVAIS; SMYTH, 1999). Nestas condições, para a manutenção de grandes produtividades, se requer a aplicação de fosfatos em quantidades muito além das exigidas pelas culturas, devido a alta reatividade do P com os vários constituintes do solo (MENDES; REIS JUNIOR, 2003).

Nos solos tropicais, ao longo do período de cultivo, aproximadamente 500 kg ha^{-1} de P é retido ou fixado nas partículas do solo, sendo distribuído, em média, da seguinte forma: 40% ligado ao Al; 30% ao Fe e de 5 a 0% ao Ca (SIQUEIRA; FRANCO, 1988). Assim, a biodisponibilidade de P nos solos, em geral, é muito baixa, mesmo o conteúdo total de P sendo de 200 a 500 vezes maior que a quantidade disponível para uso pelas plantas (LIU et al., 2006). A concentração de fosfato inorgânico na solução da maioria dos solos varia de 0,1 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$, fazendo com que as plantas absorvam este nutriente de soluções com concentrações extremamente baixas (LOUGHMAN; ROBERTS; GOODWIN-BAILEY, 1983).

Em solos pouco e moderadamente intemperizados, como os Vertissolos, Chernossolos e os Neossolos, ainda há presença de P nos minerais primários, porém, a maior parte de P encontra-se na forma orgânica (Po) ou na forma mineral (Pi), adsorvida fracamente aos minerais secundários. Nos solos altamente intemperizados, como os Latossolos, há predominância de formas inorgânicas ligadas a fração mineral com alta energia e as formas orgânicas estabilizadas física quimicamente (SANTOS et al., 2008). Segundo Haynes; Mokolobate, (2001), solos ácidos muito intemperizados frequentemente tem baixos níveis de P extraível e contém grandes quantidades de óxidos hidratados de Al e Fe. Portanto, tem a habilidade de adsorver grandes quantidades do P adicionado. Por essas razões, grandes quantidades de fertilizantes fosfatados são, frequentemente, requeridos para uma ótima produção em solos tropicais.

2.2.4 Fósforo nos organismos vivos

O fósforo participa ativamente das funções vitais de todos os organismos vivos, pois é constituinte das moléculas de ATP, ADP, ácidos nucléicos e dos fosfolipídios das membranas celulares, sendo importante na liberação de energia para o processo ativo de absorção iônica (SANTOS et al., 2008). Assim, o P atua nos processos de respiração celular, produção e armazenamento de energia, na divisão celular, no crescimento de células, além de ser responsável pela ativação, por meio da fosforilação de diversas cascatas enzimáticas, em todos os organismos (GRANT et al., 2001).

No metabolismo vegetal o P é necessário por participar ativamente da fotossíntese, transferência e transporte de energia, respiração, transferência de genes e reprodução (STAUFFER; SULEWSKI, 2004). É um elemento fundamental na nutrição e no desenvolvimento de plantas, sendo que o nível mínimo no solo para a manutenção e crescimento das espécies vegetais é de $0,02\text{g Kg}^{-1}$ solo (HABTE; MANJUNATH, 1991). As plantas, entretanto, o demandam em baixas quantidades em relação a nutrientes como potássio, cálcio, magnésio, etc. Porém, quantidades estas que, impreterivelmente, devem estar presentes na solução do solo para um desenvolvimento satisfatório, pois sem este elemento a planta não completa seu ciclo de vida, sendo que não pode substituído por nenhum outro elemento (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). Melhora, também, a qualidade de muitas frutas, verduras e grãos, sendo de vital importância para a formação de sementes, visto que favorece a eficiência no uso da água e aumenta a resistência da planta às doenças e os problemas causados por temperaturas muito baixas (GRANT et al., 2001). Segundo Gatiboni (2003), depois do nitrogênio o fósforo é o elemento mais importante, tendo grande influencia no crescimento das raízes e perfilhamento das plantas forrageiras, contribuindo, desta maneira, diretamente na produtividade.

Com relação a produção, na falta de P as plantas reduzem o número de sementes ao invés de reduzir o tamanho de cada uma, conseguindo, dessa forma, fornecer uma quantidade razoável de P a cada uma delas (GRANT et al., 2001). Em plantas de feijoeiro, por exemplo, com uma aplicação de 150 kg ha^{-1} de P_2O_5 , obteve-se maior número de vagens por planta do que quando se aplicou 30 kg ha^{-1} (ZUCARELI et al., 2006). Por outro lado, plantas de cevada com doses de P_2O_5 variando de 0 a 240 kg ha^{-1} apresentaram poucas variações na quantidade de grãos por espiga, mas as variações no peso relativo dos

grãos e na densidade das espigas foram maiores (GRANT et al., 2001). Entretanto, o excesso de P no solo pode não ser benéfico uma vez que gera deficiência de cobre, ferro, manganês e zinco. Grant et al. (2001) colocam que deficiência de fósforo no início do ciclo vegetativo da planta pode resultar em restrições no crescimento, das quais a planta não se recupera, mesmo fornecendo fósforo posteriormente.

Processos de adição de fertilizantes são comumente utilizados para suprir a carência de P em sistemas agrícolas, sendo que os fertilizantes fosfatados mais utilizados são superfosfato simples, superfosfato triplo, fosfato monoamônico, fosfato diamônico e os termofosfatos. As fontes naturais reativas são fosfato natural de Araxá, de Gafsa, de Arad e da Carolina do Norte (NOVAI; SMYTH; NUNES, 2007). Entretanto, estes mesmos autores sugerem que a aplicação de P solúvel como correção deve ser realizada de forma localizada ou parcelada, devido aos problemas de fixação desse elemento. Contudo, nem sempre o suprimento torna-se suficiente, fazendo com que as plantas busquem alternativas para obtenção desse elemento. Estima-se que apenas 5% a 25% do fósforo solúvel adicionado ao solo, como adubo, seja aproveitado pela cultura que o recebeu (ISHERWORD, 1998), sendo o restante fixado as demais partículas e elementos do solo (FALCÃO; SILVA, 2004).

Como os teores de P disponível em solos tropicais são baixos, as plantas necessitam de mecanismos e estratégias que auxiliem no processo de disponibilidade e absorção desse nutriente de forma contínua, a fim de não ocorrer o comprometimento de nenhum processo fisiológico. Um dos principais mecanismos é o aumento da área de absorção radicular por meio de mudanças morfológicas das raízes e aumento de pelos radiculares. Em relação a estratégias, a principal delas está relacionada a utilização de microrganismos que possam solubilizar moléculas contendo fósforo, tornando esse elemento mais prontamente disponível e, também, por meio da associação de plantas com fungos micorrízicos arbusculares, que devido a formação de uma rede de hifas, auxilia a absorção de P devido ao aumento nas áreas de exploração radicular (SMITH; READ 2008).

2.3 SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

O fósforo (P) é um elemento essencial encontrado em todos os seres vivos como constituinte de ácidos nucléicos, proteínas, membranas e moléculas de energia, tais como ATP, GTP e NADPH (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; RICHARDSON et al., 2009a, b). Possui um papel importante nos processos fotossintéticos e no armazenamento e transferência de energia (STAUFFER; SULEWSKI, 2004). Na natureza, encontramos fósforo na forma solúvel e insolúvel (ALAM et al., 2002), porém, nem sempre disponível para as plantas.

O desenvolvimento de uma agricultura capaz de utilizar os recursos naturais de forma racional e que promova o desenvolvimento de práticas conservacionistas (ZILLI et al., 2003) é um importante passo para a conservação do meio ambiente. Uma alternativa frente à utilização de adubos fosfatados é a utilização de microrganismos do solo que auxiliam na disponibilidade de nutrientes e no funcionamento do ecossistema solo (TÓTOLA; CHAER, 2002). Além da preocupação com a sustentabilidade ambiental existe o cuidado com as reservas de P. Estudos apontam que a nível mundial, em 5,7 bilhões de hectares de solo cultivados a quantidade de P é insuficiente para manutenção das culturas agrícolas (HINSINGER, 2001).

Alguns microrganismos estão envolvidos numa gama de processos que afetam diretamente os processos de transformação de P no solo e são, portanto, uma parte integrante do seu ciclo. Em particular, microrganismos do solo como fungos e bactérias são eficazes na liberação de P por meio de solubilização e mineralização (RODRIGUES; FRAGA, 1999). Além disso, auxiliam na ciclagem de nutrientes, na supressão de fitopatógenos, nas relações fitormonais e na reação com agrotóxicos (BOTTOMLEY, 2005).

O P está sujeito a diversos processos no solo que podem alterar sua disponibilidade, porém, a solubilização de fosfatos via microrganismos é o processo predominante (WHITELAW, 2000). Os microrganismos solubilizadores de fosfatos inorgânicos constituem de 5 a 10% da microbiota total do solo, sendo a rizosfera o local com maiores populações devido a maior atividade metabólica desta zona (VAZQUEZ et al., 2000; NAHAS et al., 1994). Entre os principais microrganismos solubilizadores de fosfato tem-se as bactérias fungos e actinomicetos e, como estes se encontram presentes no solo, tornam-se uma alternativa na diminuição dos custos de adubação.

2.3.1 Processos de solubilização

De maneira geral os microrganismos acidificam o solo rizosférico via liberação de H⁺ e ácidos orgânicos e/ou redução do pH, obtendo-se, então, o fosfato disponível para as plantas (VASSILEV; VASSILEVA, 2003). Os ácidos orgânicos mais produzidos pelos microrganismos são o glucônico, cítrico e oxálico (RICHARDSON, 2001), sendo a capacidade de solubilização de cada ácido atribuída a reações de acidificação e quelação (OMAR, 1998).

Essa secreção de ácidos orgânicos atua dissolvendo diretamente o fosfato mineral por meio da troca de anions PO₄⁻² pelo anion do ácido ou por meio da quelação de íons de Fe e Al associados com fosfato (OMAR, 1998). No entanto, os microrganismos do solo podem apresentar variações consideráveis na capacidade de solubilização de fosfato por intermédio da secreção de ácidos orgânicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). De acordo com Nahas et al. (1994), a secreção de ácidos orgânicos por meio do sistema radicular propicia um aumento na disponibilidade de P devido a quelação dos cátions, tais como Fe⁺², Al⁺³ ou Ca⁺² que auxiliam na solubilização de fitatos insolúveis. A grande maioria dos microrganismos solubiliza fósforo ligado ao Ca, sendo que poucos conseguem solubilizar complexos de P-Fe e P-Al (GYANESHWAR et al., 2002).

Estudo realizado por Chen et al., (2006) mostra que as bactérias solubilizadoras de fosfato constituem de 1 a 50% da população microbiana, enquanto que fungos solubilizadores são apenas 0,1 a 5%. Para Moreira; Siqueira (2006), embora haja predominância de bactérias solubilizadoras de fosfato no solo, geralmente os fungos apresentam o maior potencial de solubilização.

O fosfato insolúvel mobilizado pelos microrganismos pode ser absorvido pelas raízes das plantas, enquanto as plantas exsudam compostos de carbono, principalmente açúcares, que podem ser metabolizados pelos microrganismos da rizosfera (PÉREZ et al., 2007). Assim, a utilização de microrganismos eficientes, principalmente na solubilização de P, acarreta em ganho de crescimento e produtividade das plantas (CHABOT et al., 1993; SILVA FILHO; VIDOR, 2000; GULL et al., 2004), pois melhora todo o sistema radicular e, consequentemente, a parte aérea (GONÇALVES et al., 2000).

A solubilização de fosfatos é influenciada por fatores, tais como tipo de microrganismo e tipo de fosfato (SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Alguns microrganismos solubilizam apenas Ca-P, enquanto

outros podem solubilizar Al-P e Fe-P (GADAGI; AS, 2002). GYANESHWAR et al., (2002) relataram que fatores como a concorrência por recursos do solo também influenciam na capacidade de solubilização de fosfato dos microrganismos. Os mecanismos de solubilização de fosfato não estão completamente compreendidos (OEHL et al., 2001; ALAM et al., 2002), mas sabe-se que a liberação de substâncias ácidas e que reduzem o pH está presente (NAHAS et al., 2006).

A determinação da capacidade de solubilização de fosfatos tem sido realizada, primeiramente, em laboratório por meio do cultivo de microrganismos em meio de crescimento e condições estéreis. Conforme metodologia descrita por Deshwal, Dubey e MAHESHWARI, (2003), e Hara; Oliveira (2005), a presença de microrganismos solubilizadores de fosfato é visualizada por meio da detecção de uma zona translúcida ao redor das colônias em meio de cultura contendo fosfatos insolúveis. A quantidade de P solubilizada é dependente da composição e da forma de P precipitado no meio.

2.3.2 Microrganismos solubilizadores

Muitos experimentos foram realizados para averiguar a capacidade de microrganismos em solubilizarem fosfato, destacando-se, dentre eles, os fungos da espécies *Penicillium bilaii*, estudado no Canadá (ASEA et al., 1988) e *Aspergillus niger* estudado no Brasil (NAHAS et al., 1990; NAHAS; ASSIS, 1982). Entre as bactérias há estudos indicando que a solubilização de fosfato é realizada por rizóbios (MIKANOVÁ; NOVÁKOVÁ, 2002; HARA; OLIVEIRA, 2005; CHAGAS JR., 2007) e também por bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium* (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; SOUCHIE et al., 2007).

Em muitos casos a inoculação de plantas com microrganismos solubilizadores de P tem se mostrado eficiente em aumentar o crescimento das plantas por meio da maior disponibilidade de P solúvel proporcionada pelos microrganismos em experimentos realizados em casa de vegetação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; ZAIDI et al., 2009). A utilização concomitante de fungos e bactérias em alguns estudos mostrou-se mais eficiente do que a utilização isolada deles. Molla et al., (1984) verificaram que culturas mistas de (*Bacillus*, *Sreptomyces* e *Pseudomonas*) são mais efetivas em mineralizar fosfatos orgânicos do que se estiverem isolados.

Jayasingheachchi; Seneviratne (2006) testaram a associação entre bactérias do gênero *Bradhirizobium* com fungos comuns do solo *Aspergillus* e *Penicillium* e verificaram que, quando associados, os microrganismos produzem maior quantidade de ácidos orgânicos, promovendo, assim, aumento na disponibilidade de P e N frente a ação isolada de fungos e bactérias. Estes estudos apontam que o sinergismo existente entre os diversos gêneros de microrganismos do solo são altamente benéficos para o processo de solubilização de fosfato. Silva Filho; Vidor (2000) verificaram que isolados de *Penicillium* apresentaram potencial de solubilização igual ao de *Pseudomonas*, que por sua vez foi superior ao de *Bacillus* e este ao de *Aspergillus*.

As interações existentes dentro do sistema solo são de extrema importância na disponibilidade de nutrientes e na manutenção da vida vegetal e animal. Além disso, sabe-se que a interação de microrganismos de gêneros distintos pode contribuir significativamente na disponibilidade de nutrientes. Contudo, poucos estudos abordam este assunto devido a dificuldade na obtenção de resultados claros.

Dentre os diversos microrganismos existentes, é sabido que a interação de fungos micorrízicos e solubilizadores de fosfato beneficia diretamente a disponibilidade de P para as plantas. Nas relações de interação entre os diferentes microrganismos existentes no solo, pode-se esperar que a atuação conjunta de fungos micorrízicos e solubilizadores de fosfato beneficie diretamente a disponibilidade de P para as plantas. A solubilização por atividade microbiana ou radicular aumenta a disponibilidade de fósforo no solo, que, uma vez absorvido pelo micelio externo do fungo, será translocado pela hifa fúngica até o sistema radicular da planta hospedeira (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Esse incremento pode ser devido ao aumento da colonização micorrízica das raízes, visto que os fungos solubilizadores de fosfatos produzem produtos metabólicos específicos como vitaminas, aminoácidos e hormônios (BAREA; AZCON-AGUILAR, 2005).

Pesquisa realizada por Souchie et al. (2006), estudaram a associação entre micorrizas e fungos solubilizadores de fósforo concluindo que a espécie *Trifolium pratense* foi beneficiada pela inoculação de *Aspergillus* spp (PSF7), *Rhizophagus clarus* e *Glomus glosporum*, resultado este que demonstra a relação positiva entre esses microrganismos. Toro et al. (1997) verificaram que bactérias solubilizadoras de fosfato podem atuar auxiliando e melhorando o estabelecimento dos fungos micorrízicos, além de solubilizarem fosfatos por meio da liberação de ácidos orgânicos, produtos de seu

metabolismo, favorecendo o desenvolvimento vegetal (GULL et al., 2004). Além disso, as bactérias solubilizadoras de fosfato podem atuar sinergisticamente com rizóbios, favorecendo a nodulação, já que disponibilizam P para a planta. Tendo em vista que a fixação biológica de N₂ é um processo exigente em P, justificam-se estudos visando maximizar seu fornecimento de forma econômica.

Ocorrem, também, interações entre os microrganismos solubilizadores de fosfato, fungos micorrízicos e rizóbio que, além de auxiliarem no aumento da disponibilidade de P, contribuem também para o processo de fixação de nitrogênio. Paulino; Azcon (1986) verificaram que a espécie *Centrosema pubescens* quando co-inoculada com rizóbio específico, fungo micorrízico *Glomus fasciculatum* e microrganismos solubilizadores de fosfato, apresentou maior absorção de nutrientes (N, P, K, Ca e Mg) em relação ao tratamento controle. Verificaram, ainda, que os efeitos simbióticos da micorriza foram aumentados na presença de microrganismos solubilizadores de fosfato e rizóbium.

Para Richardson (2001) há duas estratégias para a aplicação de microrganismos solubilizadores de fosfato: 1) otimização da capacidade de mobilizar o P não disponível via manejo da população indígena; 2) especificidade de inoculantes microbianos. A utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato e fungos micorrízicos de forma conjunta por meio do processo de inoculação configura-se como uma alternativa viável na busca por métodos que visam aumentar a disponibilidade de nutrientes, em especial o P, para as plantas. Contudo, o uso desses microrganismos depende do conhecimento de suas características e do processo de relação existente entre eles.

Técnicas biotecnológicas envolvendo a utilização de diferentes microrganismos têm encontrado na agricultura um papel de destaque nas últimas décadas devido a geração de produtos denominados de inoculantes agrícolas. Esses produtos, de maneira geral, possuem características como redução da fertilização artificial em plantios comerciais, redução dos danos causados por doenças e estímulo do crescimento vegetal. Métodos de produção de inóculos (por exemplo, o uso de veículos apropriados, viabilidade e avaliação da longevidade do inóculo) e a possibilidade do desenvolvimento de interações com outros microrganismos, como fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio, precisam ser consideradas. O desenvolvimento de melhores métodos de seleção dos solubilizadores de fosfato e o entendimento da

base genética da solubilização de P pode ajudar no desenvolvimento de inoculantes mais eficientes.

Frente ao exposto, abre-se um horizonte para o uso de microrganismos na produção agrícola. Sabe-se que a utilização de técnicas de fertilização e inoculação biológica permitirá uma agricultura mais eficaz, com aumento na produtividade e maior proteção do meio ambiente. Contudo, mudanças são necessárias para que produtos biológicos passem a ser considerados como produtos de primeira opção e não alternativos. Entre as principais mudanças está a forma de como estudar os microrganismos, suas funções e suas interações. Além disso, deve-se levar aos produtores os resultados obtidos por meio da inoculação e incentivar o uso dessa tecnologia, já que o Brasil é, atualmente, reconhecido mundialmente por sua organização, de forma sistêmica, de toda uma política de pesquisa e produção de inoculantes. Isto foi fruto da criação de RELARE – hoje denominada Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola.

No Brasil a produção a legislação vigente sobre a produção e importação de inoculantes é bem ampla, composta por leis, decretos, portarias e instruções normativas. Contudo, a lei nº 6.934 (de 13 de julho de 1981) que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, estimulantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, serve de base para a produção e importação de inoculantes. Além dessa lei, o decreto nº 4.954 (de 14 de janeiro de 2004) dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências. Com base nessas duas legislações, há o estabelecimento de normas gerais sobre registro, padronização, classificação, inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura.

2.4 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

2.4.1 Características gerais da simbiose

A associação íntima e duradoura de organismos de espécies diferentes é comumente chamada de simbiose, que podem ser parasíticas e mutualísticas (RAVEN et al., 2007). A simbiose parasítica beneficia somente um dos dois organismos e na mutualística os dois

organismos são beneficiados. Dentre várias simbioses mutualísticas existentes, uma das mais estudadas é simbiose micorrízica arbuscular, estabelecida entre fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) do filo Glomeromycota e raízes de espécies vegetais (SCHÜBLER et al., 2001).

De maneira geral, micorriza é uma simbiose mutualística, não patogênica, existente entre fungos de solo e raízes de plantas superiores (SIEVERDING, 1991). Essa simbiose pode ser considerada uma das mais bem sucedidas estratégias de bioproteção, tanto para a planta quanto para fungo (GIANINAZZI-PEARSON, 1996). Evidências fósseis indicam que essa associação simbiótica ocorre há mais de 460 milhões de anos, quando as primeiras plantas terrestres apresentavam raízes colonizadas com estruturas fúngicas como micélios e esporos, muito semelhantes as estruturas dos atuais fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (REDECKER et al., 2000a, REDECKER et al., 2000b). Esses dados evidenciam que a coevolução de fungos e plantas foi necessária para a colonização do ambiente terrestre pelas plantas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SOUZA et al., 2008; SMITH; READ, 2008).

Durante o processo evolutivo dos simbiontes, as micorrizas dividiram-se em vários tipos, contudo, atenção especial é dada para os dois principais tipos de micorrizas, as ectomicorrizas e as micorrizas arbusculares. As ectomicorrizas são associações formadas geralmente por basidiomicetos e espécies arbóreas encontradas em florestas temperadas e boreais. Esse tipo de micorriza caracteriza-se pelo crescimento de hifas fúngicas que não penetram as células do córtex da raiz, formando, assim, a rede de Hartig (SIVERDING, 1991). As micorrizas arbusculares representam a maior parte das micorrizas e diferenciam-se das ectomicorrizas por apresentarem crescimento intercelular no córtex da raiz e por formarem estruturas específicas, como vesículas e arbúsculos, na maioria das famílias de plantas superiores (SMITH; READ, 2008).

A maioria das espécies de plantas depende da associação micorrízica para a obtenção de nutrientes e água, tornando-se, então, obrigatórias para a sobrevivência das plantas (JANOS, 1980). De acordo com Trappe (1987), 95% das plantas terrestres pertencem a espécies que formam micorrizas e o não estabelecimento é considerado um evento recente no processo evolutivo, visto que, poucas famílias não formam a associação. De acordo com Harley; Smith (1983), as famílias *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae* e *Chenophyllaceae* não formam micorriza, bem como alguns representantes das famílias

Commelinaceae, Juncaceae, Proteaceae, Cuprecaceae, Cyperaceae, Polygonaceae, Resedaceae, Urticaceae, Amaranthaceae e Portulareaceae. A associação é encontrada em uma grande variedade de habitats, normalmente nas raízes de angiospermas, gimnospermas e pteridófitas, além de ocorrerem em alguns musgos, licopódios e psilotales, que são todos sem raízes (MOSSE et al., 1981). Recentemente Beck-Nielsen; Madsen (2001) verificaram que a simbiose também ocorre em plantas aquáticas.

O estabelecimento da simbiose ocorre antes do contato físico fungo/planta, pois inicialmente ocorre uma troca de sinais iniciando com a liberação de exudados radiculares capazes de estimular a ramificação das hifas e germinação dos esporos (BUEÉ et al., 2000; KIRIACHEK et al., 2009). Em seguida, os fungos penetram nas células corticais e quando alcançam o córtex radicular, formam o micélio interno, vesículas e arbúsculos (HABT, 2000). A penetração da hifa na superfície da raiz ocorre devido à pressão mecânica exercida pela hifa somada a degradação da parede celular vegetal oriunda da secreção de enzimas produzidas pelo fungo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nesse processo não ocorrem modificações morfológicas macroscópicas nas raízes colonizadas, entretanto há mudanças no metabolismo dos simbiontes (HARRISON, 2005).

Contudo, o processo de regulação é complexo e ainda não totalmente compreendido. Vários fatores atuam no processo, entre os quais citam-se a quantidade de P no solo e a microbiota do solo. A grande disponibilidade de P inibe o processo simbiótico (MOREIRA; SIQUEIRA 2006), enquanto que a microbiota do solo interfere na simbiose atuando sobre o fungo, na translocação de nutrientes, competindo por eles, especialmente fosfatos ou, contrariamente, atuando sinergicamente com os FMAs por meio de efeitos combinados sobre o crescimento da planta (SMITH; READ, 2008; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A simbiose micorrízica propicia vários benefícios para o solo e para as plantas. No solo favorece a formação e a estabilidade de agregados, pois as hifas secretam enzimas denominadas de glomalinas, que atuam na agregação do solo (SOUZA et al., 2008; SMITH; READ, 2008), e nas plantas favorecem o crescimento via aumento da disponibilidade de fósforo. Plantas micorrizadas obtém várias vantagens como o alívio do stress hídrico, tolerância a altas e baixas temperaturas (GUPTA et al., 2000), proteção contra patógenos (SIKES et al., 2009), e tolerância a metais pesados (ARRIAGADA, 2010). Hodge, Campbell;

FITTER (2001) relataram que, além de P, os fungos micorrízicos auxiliam na absorção e translocação de nitrogênio para as plantas. Nessa simbiose, a planta supre o fungo com até de 20% do carbono fixado (SMITH; READ, 2008). Por outro lado, as plantas se beneficiam por meio da melhoria do estado nutricional, visto que há um aumento na superfície de absorção de nutrientes, em especial o P que é pouco solúvel e de baixa mobilidade (BALZERGUE et al., 2011). Este aumento na nutrição acarreta em maiores taxas de crescimento, sobrevivência e alocação de biomassa nas plantas (SOUZA et al., 2008).

Em regiões tropicais, os solos apresentam-se pobres, ácidos e altamente intemperizados fazendo com que a maioria das plantas dependa da associação micorrízica para a absorção de nutrientes e água (JANOS, 1980). A resposta da planta hospedeira aos FMAs é afetada principalmente pelo ambiente (BRUNDRETT et al., 1999), mas também é dependente da interação fungo-planta (SAGGIN JÚNIOR; SIQUEIRA 1995). Práticas agrícolas como aração, adubação, plantio de monoculturas e aplicação de agrotóxicos podem ser utilizadas como parâmetro para avaliar alterações na qualidade do solo (NIELSEN; WINDING, 2002). Essas práticas podem alterar as populações e a diversidade de FMAs, propiciando a seleção de espécies e a consequente modificação das populações nativas, podendo reduzir o desenvolvimento de FMAs em até 80% (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A pesquisa com utilização de FMAs no crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais tem crescido a cada ano. De acordo com Carneiro et al., (2004), o conhecimento das relações ecológicas e das exigências nutricionais das espécies pode facilitar o desenvolvimento de tecnologias para a obtenção de mudas sadias destinadas aos programas de revegetação. Atualmente, sabe-se que a simbiose de fungos e espécies florestais tropicais são indispensáveis para o crescimento e o desenvolvimento das espécies. Janos (1980) mostrou que a maioria das plantas depende de micorizas para a obtenção de nutrientes e água em florestas tropicais. Em solos degradados, Santos et al. (2008) observaram que espécies arbóreas plantadas tiveram um aumento na absorção total de N e P devido a inoculação com FMAs. Caproni et al. (2005) observaram que a inoculação de FMAs auxiliou e acelerou os processos de revegetação de solos degradados.

Embora a colonização ocorra em grande parte das plantas superiores, a resposta das mesmas aos benefícios causadas pelos FMAs ocorre de forma diferenciada, visto que há certa preferência entre

espécies de FMAs e espécies vegetais. A inoculação aumenta a absorção de nutrientes que, conseqüentemente, causa aumento na matéria seca e no rendimento das espécies vegetais, fato esse denominado de resposta micorrízica (ROCHA et al., 2006). A resposta micorrízica é variável, pois depende diretamente da relação entre a espécie de FMA, a planta hospedeira e as condições ambientais (SAGGIN JÚNIOR et al., 1994).

2.4.2 Dependência e resposta micorrízica

A interação plantas-fungos micorrízicos é um processo biológico, complexo e regulado pelos dois parceiros. Sendo assim, espera-se que a extensão da resposta de plantas à micorriza varie entre diferentes combinações de plantas e fungos micorrízicos (SMITH; READ, 2008). A distinção entre resposta às micorrizas e a dependência micorrízica é tênue, mas de grande interesse para a aplicação dos fungos micorrízicos na formação das mudas, pois a sobrevivência destas, sua adaptação ao novo ambiente de transplante e a competitividade são dependentes desses fatores. Ao se pesquisar no dicionário, ‘a capacidade de resposta’ envolve uma reação a algo, enquanto que a ‘dependência’ envolve uma incapacidade de existir ou funcionar sem alguma coisa.

A resposta micorrízica é uma variável que depende diretamente da relação entre a espécie de FMA, a planta hospedeira e as condições ambientais (SAGGIN JÚNIOR et al., 1994). A resposta das plantas à micorrização reflete a eficiência do fungo inoculado, o funcionamento da simbiose e o potencial de produtividade da planta em função da inoculação em uma dada condição de fertilidade do solo (SAGGIN JUNIOR; SILVA, 2005). Dessa forma, a resposta das plantas à micorriza varia em função do tipo de solo (ANTUNES et al., 1988) e, principalmente, do nível de fósforo disponível (SIQUEIRA; COLOZZI FILHO, 1986). Johnson, Graham e SMITH (1997) propuseram classificar a resposta das plantas à colonização micorrízica como positiva, negativa ou neutra.

A dependência micorrízica diferencia-se da resposta, pois está diretamente ligada ao nível de P existente no solo. A alta disponibilidade deste no solo promove restrição à infecção micorrízica e redução da porcentagem de raízes colonizadas (MELLONI et al., 2000; NOGUEIRA; CARDOSO, 2000). A planta hospedeira, quando inoculada, geralmente tem seu crescimento maximizado quando o nível de P na solução do solo é muito baixo e de difícil acesso (HABT, 2000). A dependência micorrízica limita-se a determinados períodos de

crescimento (JOHNSON, GRAHAM; SMITH, 1997), como na fase de plântula e durante a reprodução (KOIDE, 1991).

Janos (2007) define Dependência Micorrízica como a incapacidade de uma planta para crescer sem micorrizas abaixo de um determinado nível de disponibilidade de fósforo no solo, e Resposta como sendo o conjunto de propriedades de uma espécie vegetal que interagem com FMAs capazes de promover o crescimento da planta em condições de disponibilidade de P conhecidas. Para o autor a resposta pode ser positiva, nula ou negativa, ou ainda vantajosa ou desvantajosa para positiva e negativa, respectivamente. A resposta absoluta pode ser medida como a diferença encontrada no tamanho (peso seco, ou uma medida morfométrica entre plantas micorrizadas e não micorrizadas a uma disponibilidade de fósforo em particular. Capacidade de resposta negativa indica que não há efeito líquido de micorrizas, e capacidade positiva indica que há efeito líquido de micorrizas (SMITH, 2003)

Frente ao exposto acima, fica claro que, para se saber a resposta micorrízica de uma planta, diferentes espécies de fungos FMAs devem ser testados sob as mesmas condições ambientais, para selecionar FMAs eficientes quanto à capacidade de promover o crescimento de seu hospedeiro (SAGGIN JÚNIOR; SIQUEIRA, 1995). A utilização de resposta e dependência micorrízicas geram problemas experimentais, onde muitos autores, ao avaliarem a dependência micorrízica, na realidade estão avaliando a resposta micorrízica e vice-versa. Sendo assim, o modelo proposto por Janos (2007), distingue esses dois conceitos, principalmente por que as equações e gráficos conseguem demonstrar de forma clara o que é a resposta e o que é a dependência micorrízica de uma espécie.

O conceito de dependência micorrízica passou por diversas transformações ao longo dos anos de estudo. Foi comprovada pela primeira vez no trabalho histórico de Kleinschmidt; Gerdemann (1972), por meio da verificação de que plantas de limão não conseguiam se desenvolver em solo fumigado com brometo de metila sem a adição de esporocarpos de *Glomus moçai*. A dependência micorrízica foi definida pela primeira vez por Gerdemann (1975) como sendo o grau que a planta depende da condição micorrízica para obter seu crescimento e produção máxima, em certo nível de fertilidade do solo.

Na década de 80, Janos (1980) propôs uma classificação de dependência micorrízica agrupando as plantas de acordo com o grau de micotrofismo, em: 1) **micotróficas obrigatórias** - aquelas que, em seu ambiente natural, não sobrevivem sem micorriza até a maturidade reprodutiva; 2) **micotróficas facultativas** - aquelas que são beneficiadas

pela micorrização, se em condições de baixa fertilidade do solo; porém, quando não micorrizadas, conseguem atingir a maturidade reprodutiva em seu ambiente natural e 3) **não micotróficas** - sobrevivem sem a formação da micorriza até a maturidade reprodutiva (grifo nosso). Estas possuem sistema radicular desenvolvido, com ramificações e abundantes pêlos radiculares, além de dispor de mecanismos para facilitar a captação de fósforo (P), como por exemplo, a liberação de ácidos orgânicos.

Neste mesmo período, outra classificação foi proposta por Plenchette et al. (1983), que propuseram o termo ‘dependência micorrízica relativa (DMR)’, sendo esta calculada pela diferença entre a massa da matéria seca de plantas micorrizadas e não micorrizadas em relação à massa da matéria seca de plantas micorrizadas ($DMR = \frac{\text{massa da matéria seca de plantas micorrizadas} - \text{massa da matéria seca das plantas não micorrizadas}}{\text{massa da matéria seca das plantas micorrizadas}} \times 100$). Neste cálculo, a DMR pode variar de 0 a 100%, sendo 100% quando a planta é extremamente dependente da condição micotrófica e nula (0%) quando não depende do fungo em determinada condição de fertilidade do solo. Essa proposta não obteve sucesso, pois estas relações exprimem a resposta da planta à inoculação em certo nível de fertilidade do solo.

Habte; Manjunath (1991) classificaram a dependência micorrízica das plantas de acordo com a disponibilidade de P na solução no solo da seguinte forma:

1) Extremamente dependente: Espécies com dependência micorrízica de 75% ou superior. Espécies que em solos cuja concentração de P na solução é de 0,02mg/L respondem significativamente a inoculação até uma concentração de P de 0,2mg/L.

2) Altamente dependente: espécies com dependência micorrízica de 50 a 75%. Espécies que em solos cuja concentração de P em solução é de 0,02mg/L respondem a micorrizas. Em concentrações de 0,2mg/L não há resposta significativa.

3) Moderadamente dependente: espécies com dependência micorrízica de 25 a 50%. Espécies que respondem a micorrizas em solos com concentração de P de 0,02mg/L.

4) Marginalmente dependente: espécies com dependência micorrízica menor que 25%. Espécies que respondem a uma concentração de P na solução do solo de 0,02mg/L.

5) Independente: espécies que não são colonizadas por FMAs, ou aquelas que não respondem positivamente a inoculação com FMA.

Smith; Read (2008), classificaram a dependência micorrízica das plantas em:

1) Espécies Facultativas: são observadas em condições de solo com alta ou baixa fertilidade. Em solos com grande disponibilidade de nutrientes, as plantas não necessitam de FMAs e a simbiose é inibida por mecanismos controlados pela planta.

2) Espécies Obrigatórias: Espécies micorrízicas obrigatórias não crescem na ausência de FMAs em solos com teores freqüentes de disponibilidade de nutrientes. Essa característica é encontrada, com freqüência, em espécies nativas de solos de baixa fertilidade natural.

3) Espécies não obrigatórias: Plantas não micorrízicas apresentam sistema radicular bem desenvolvido, com muitas raízes finas e pêlos radiculares.

De acordo com Janos (1988), a sobrevivência da planta depois da germinação, sua adaptação a novos ambientes após transplante e sua competitividade no ecossistema são fatores relacionados com sua DM, enquanto que a produtividade resultante da inoculação, a escolha do inoculante mais apropriado e a dosagem correta de fertilizantes estão relacionados com sua resposta à micorrização. A dependência dificilmente pode ser quantificada, mas pode ser estimada pelo nível de P na solução do solo necessário para ‘substituir’ a micorriza, conforme proposto por Janos (1988). Quanto maior este nível, maior será a dependência da planta a micorrizas. Partindo dessa teoria, pressupõe-se que no níveis mais baixos de disponibilidade de fósforo e, mais altos, as micorrizas podem diminuir o crescimento das plantas, tornando-se, assim, desvantajosas.

Janos (2007) definiu dependência micorrízica (DM) como a incapacidade das plantas crescerem sem micorrizas a um dado nível de fertilidade, o qual é usualmente medido pela concentração do fósforo na solução do solo. Ele propõe que a DM seja quantificada pelo nível de fósforo até o qual as plantas não micorrizadas não aumentam significativamente o seu crescimento (T), ou pelo nível de fósforo acima do qual as plantas não micorrizadas não cresçam diferentemente das micorrizadas (T'). Neste conceito, a planta não precisa mostrar seu crescimento e produção máxima (resposta máxima a inoculação) para mostrar seu grau de dependência, ligando a dependência a incapacidade da planta crescer sem micorriza em uma certa condição de fertilidade.

Atualmente, os estudos indicam que a DM é uma característica que depende exclusivamente do genoma da planta, sendo, portanto, uma característica herdável (HETRICK et al., 1996). Esta característica varia de acordo com a influência de outras características genéticas da planta,

tais como exigência nutricional, eficiência de absorção das raízes, taxa de crescimento, reserva de nutrientes da semente e abundância, distribuição e morfologia do sistema radicular (GRAHAM; SYVERTSEN, 1985).

As definições de reposta micorrízica e dependência micorrízica são facilmente visualizáveis quando se define as curvas de resposta das plantas com e sem micorrizas em níveis de P pré-estabelecidos como proposto por Janos em 2007. O modelo proposto por Janos em 1988 sofre algumas modificações e, atualmente, quando se fala em dependência micorrízica, o modelo que mais representa a veracidade desse fator é o proposto pelo autor em 2007, visto que foi desenvolvido em termos de nutrição das plantas, pois o fósforo é o nutriente mineral limitante em muitos ecossistemas e muito já se sabe sobre os efeitos de micorrizas na aquisição de fósforo pelas plantas. Em princípio, o modelo pode ser aplicado a outros nutrientes minerais que as micorrizas melhoraram a absorção, desde que sejam elementos que limitem o crescimento. O autor propôs, também, que as suas idéias poderiam ser unidas com as idéias de Gerd Mann (1975) para determinar com eficiência a dependência micorrízica de uma planta. Para isso, seria necessário averiguar as diferenças de crescimento entre plantas micorrizadas e não micorrizadas em uma ampla faixa de fertilidade do solo e em que nível de fertilidade o crescimento ou rendimento das plantas micorrizadas e não micorrizadas fossem iguais a T' (JANOS, 1988), utilizando esse índice para determinar a dependência micorrízica.

Esse modelo, embora seja recente e até o momento pouco utilizado, pode distinguir com maior precisão resposta de dependência micorrízica, justamente por tratar a relação que existem entre esses dois fatores de maneira conjunta, através de equações e gráficos. Essa demonstração indica até que ponto a fertilidade do solo interfere na micorrização e no crescimento das plantas, fato esse que pode ser utilizado na produção de mudas com maior capacidade de sobrevivência e produtividade.

Atualmente, os FMAs estão cada vez mais inseridos na agricultura, silvicultura e programas de recuperação ambiental, reduzindo a aplicação de agroquímicos e aumentando o rendimento das culturas (GIANINAZZI et al., 2002; JOHANSSON et al., 2004). Contudo, poucos estudos foram realizados para avaliar de que forma as práticas agrícolas e as alterações nos ecossistemas florestais influenciam na simbiose (KIERS et al., 2006; POUYÚ-ROJAS, 2002).

Estudos de inoculação de FMAs em espécies agrícolas e florestais de interesse comercial foram conduzidos em laboratório e à campo. Em condições de campo a inoculação com FMA mostrou-se viável e promoveu o crescimento de culturas da mandioca (SIEVERDING, 1991). Pesquisas realizadas com cafeeiro em solos de baixa fertilidade demonstraram que esta planta é altamente responsiva a P e a micorriza (SIQUEIRA et al., 1998). Em espécies florestais, depois da seleção de espécies de FMAs eficientes, o sucesso no estágio da formação de mudas dependerá da dependência que a planta apresenta a essa simbiose (SIQUEIRA; SAGGIN JÚNIOR, 2001).

Para aumentar a eficiência produtiva e o crescimento das culturas agrícolas e de espécies florestais, a inoculação das mesmas com FMAs é uma alternativa promissora, porém, algumas barreiras ainda devem ser transpostas. O benefício causado pelas micorrizas é de grande interesse agronômico e, dessa forma, a produção de inoculante em larga escala e a inoculação do mesmo reduziria o uso de insumos agrícolas (BAGYARAJ; REDDY, 2005). Contudo, algumas dificuldades na produção em larga escala ainda devem ser ultrapassadas, como por exemplo, produção de inoculante a base de FMA com alta qualidade (IJDO et al., 2011).

2.4.3 Produção de inoculante micorrízico

A exploração comercial de inoculante micorrízico está no processo de amadurecimento. Por serem biotróficos obrigatórios a natureza dos fungos tem dificultado o desenvolvimento de um método de produção em larga escala, com baixo custo e alta eficiência. De maneira geral, há três métodos utilizados no processo de produção de inoculo de FMA em larga escala, que são; 1) Método de produção *on farm* “com substratos”; 2) Método de produção sem substrato “aeroponia e hidroponia” e 3) Método de produção em sistema *in vitro* com plantas e raízes modificadas. Entretanto, cabe ressaltar que cada um dos métodos possui vantagens e desvantagens que serão explicadas a seguir.

*2.4.3.1 Método de produção *on farm**

O método de produção de inóculo com a utilização de substrato como suporte para as plantas é o sistema mais avançado em larga escala e que apresenta o melhor custo benefício. A produção de inóculo de FMAs, no sistema a campo “*on farm*”, iniciou-se na década de 90 na

Colômbia (DODD et al., 1990; SIEVERDING, 1991), e Índia (GAUR, 1997; GAUR; ADHOLEYA, 2002).

Esse método de produção pode ser realizado em potes ou vasos de mudas de diversos tamanhos (MILLNER; KITT 1992), bem como em sacos de mudas ou caixas levantadas como citado por Douds et al., (2005), além de Gaur e Adholeya (2002). Independente dos recipientes utilizados para a multiplicação do inóculo micorrízico, o processo de produção pode ser realizado de duas formas: a) em condições controladas (casa de vegetação), b) em condições de campo ao ar livre (DODD et al., 1990a, b; DOUDS et al., 2005 e 2006; GAUR; ADHOLEYA, 2002). No processo em casa de vegetação há possibilidade de controlar fatores como temperatura e umidade, já no processo a campo as plantas crescem de forma natural.

O processo de produção *on farm* pode utilizar diferentes substratos como meio para crescimento das plantas hospedeiras. A escolha do substrato dependerá da disponibilidade do mesmo no processo de produção, sendo que os principais tipos de substratos utilizados para a produção de inoculante micorrízico são solo arenoso (DOUDS; SCHENCK, 1990a, b), areia quatsoza pura (MILLNER; KITT, 1992), turfa, vermiculita, composto orgânico (DOUDS et al., 2005 e 2006), entre outros. Contudo, deve-se destacar, também, que o substrato pode ser esterilizado ou não, dependendo do objetivo de produção.

A composição do substrato, geralmente, depende da quantidade de P existente no mesmo, visto que substratos ricos em nutrientes, em especial P, tendem a não multiplicar bem os FMAs presentes e substratos paupérrimos em nutrientes não dão o suporte necessário para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Para contornar o problema de excesso de nutrientes deve-se realizar a adição de substratos inertes, como por exemplo, vermiculita e perlita (DOUDS et al., 2005 e 2006). Por outro lado, para contornar o problema da falta de nutrientes, compostos orgânicos ou outros substratos, como turfa, devem ser adicionados (GAUR; ADHOLEYA, 2002; MA, YOKOYAMA; MARUMOTO, 2007). Além disso, há relatos que substâncias como quitina, celulose e outras substâncias húmicas também influenciam o processo de colonização radicular (GRYNDLER et al., 2003). De acordo com a necessidade de cada substrato, procedimentos adubação também podem ser realizados.

Além disso, esse método de produção pode ser realizado por meio de uma única espécie de FMA ou com um consórcio ‘mix de

espécies', facilitando, assim, a aplicabilidade em diferentes sistemas e culturas. Geralmente as espécies são previamente selecionadas e identificadas, sendo que os fungos podem ser os nativos, ou seja, os já encontrados no local de produção, ou podem ser oriundos de bancos de germoplasmas. Entretanto, quando se trabalha com a população nativa do solo nem sempre se consegue identificar os esporos em nível de espécie (GAUR; ADHOLEYA, 2002). Independente da utilização de uma única espécie ou do sistema de consórcio, o inóculo deve apresentar-se com boa quantidade de propágulos infectivos.

Os principais propágulos infectivos consistem de esporos isolados (DOUDS; SCHENCK 1990a, b), ou uma mistura de esporos, hifas e raízes micorrizadas (GAUR; ADHOLEYA, 2002). Para obtenção dessa mistura, raízes devem ser secas e seccionadas em pedaços, já os esporos podem ser obtidos por meio da peneiragem úmida. Outra forma de obtenção é por meio da utilização de solo inóculo que possui esses propágulos infectivos na sua composição. O processo de inoculação pode ser direto, onde o inóculo é misturado ao substrato e, em seguida, espécies micotróficas são colocadas para germinar e crescer, ou de forma indireta, quando há uma pré inoculação de mudas de plantas que multipliquem os FMAs antes do transplante das mesmas para o local definitivo da produção (DOUDS et al., 2005, 2006).

Diversas plantas podem ser utilizadas como hospedeiras, desde que apresentem características como um ciclo de vida curto, raiz adequada ao sistema de desenvolvimento, nível bom de colonização por um grandegama de FMAs e tolerância a níveis relativamente baixos de fósforo (P). Douds et al.,(2005, 2006) utilizaram uma gramínea C4, que favorecia a esporulação por ser adaptada as condições climáticas locais. Além disso, a esporulação das diferentes espécies de FMAs também é um determinante para produção de inóculo (DODD et al., 1990a; STRUBLE; SKIPPER 1988). Gaur; Adholeya (2002) testaram cinco culturas forrageiras inoculadas com diferentes espécies de FMAs nativos e observaram que o nível de produção de propágulo foi dependente da espécie de planta hospedeira, demonstrando, assim, a importância que a planta hospedeira tem no processo de produção de inoculante micorrízico.

- a) Vantagens:
 - ✓ Custo relativamente baixo, pois os recursos necessários são de fácil acesso e baratos;
 - ✓ É um sistema de produção manual que pode ser realizado com um consórcio de espécies de FMAs ou uma espécie isolada;

- ✓ É capaz de produzir grande quantidade de inóculo de FMA em pouco espaço;
 - ✓ Pode produzir 80 a 100 propágulos cm³ de solo (FELDMANN; GROTKASS, 2002);
 - ✓ Quando o substrato é inerte, há possibilidade de controlar a nutrição dos fungos e plantas;
 - ✓ Produção de inóculo altamente adaptado ao local.
- b) Desvantagens:
- ✓ É difícil garantir a ausência de contaminantes, mesmo com um sistema rigoroso de controle;
 - ✓ Pode ocorrer o ataque de pragas que ataquem as plantas;
 - ✓ O inóculo final pode ser difícil de preparar e aplicar em grandes áreas, principalmente via métodos mecânicos de aplicação.

Devido as vantagens desse método de produção, o sistema *on farm* tende a se consolidar frente aos demais devido a facilidade em obter grande quantidade de inóculo de uma forma prática e eficiente. Essa características são úteis, principalmente, se pensarmos na utilização de inóculo em áreas de produção agrícola familiar ou extensiva, pois a produção é realizada na própria propriedade e com baixa tecnologia, o que facilita o sistema de produção. A dificuldade maior está relacionada na forma de aplicar o inoculante, visto que, para grande produtores, seria necessário utilizar um sistema de mecanização, agilizando, assim, o cultivo das lavouras.

2.4.3.2 Método de produção sem substrato

É um método desenvolvido para realizar uma produção relativamente livre de contaminantes, entretanto possui um custo elevado, sendo esse sistema utilizado, principalmente, para produção de pequenas quantidades de inóculo e para fins de pesquisa. Esse método pode ser dividido em aeropônico e hidropônico, cuja principal diferença está relacionada com o modo de aplicação de nutrientes.

No sistema hidropônico a solução contendo os nutrientes necessários deve ser disponibilizada por meio de um sistema de bombas de aeração para evitar que as raízes fiquem sem oxigênio (MARLEEN et al., 2011). Contudo, dependendo da pressão, o sistema pode danificar as hifas extraradiculares e as raízes das plantas. Outra alternativa para solucionar o problema acima é por meio da técnica de fluxo de

nutrientes, onde uma fina camada de solução “filme” cobre as raízes aumentando assim a área de troca gasosa (MOSSE; THOMPSON, 1981). O sistema aeropônico é uma forma de produção em que as raízes e os FMAs são banhados por uma névoa de solução nutritiva (ZOBEL et al., 1976). A pulverização de microgotas aumenta a aeração do meio de cultura e permite uma boa troca gasosa. Entretanto, independente do sistema de disponibilidade de nutrientes para as plantas, é necessário manter uma quantia mínima para que não ocorra a diminuição da fotossíntese e metabolismo das plantas. Assim sendo, a solução nutritiva desse sistema deve ser renovada semanalmente (DUGASSA, GRUNEWALDT-STÖCKER; SCHÖNBECK, 1995) ou quando os níveis de nutrientes fiquem abaixo da necessidade mínima necessária (HAWKINS; GEORGE, 1997).

Nessa técnica de produção de inóculo, as plantas devem estar pré-colonizadas antes de serem introduzidas no sistema. O processo de pré-colonização ocorre com a adição de propágulos infectivos (raízes, esporos, hifas) em um substrato esterilizado, que servirá de suporte para o crescimento e desenvolvimento das plantas que ocorre, geralmente, em vasos. Elmes; Mosse (1984) testaram várias espécies vegetais inoculadas com FMAs e verificaram que o milho (*Zea mays*) apresentou um ótimo crescimento no sistema de nevoa de solução nutritiva. A batata doce (*Ipomoea batata*) também tem sido utilizada para produção de FMAs no sistema aeropônico (HUNG; SYLVIA, 1988; MOHAMMAD et al., 2000).

Embora esse método tenha sido estudado com mais incidência nas duas últimas décadas e o processo de produção evoluído, ainda apresenta algumas vantagens e desvantagens como:

- a) Vantagens:
 - ✓ Produção de substratos livres da adesão de partículas;
 - ✓ As raízes podem ser trituradas e o inóculo pode apresentar alta densidade de propágulos (SYLVIA; JARSTFER, 1992; SYLVIA; JARSTFER, 1995);
 - ✓ Esporos podem ser facilmente separados das raízes (MILLNER; KITT, 1992);
 - ✓ Baixo risco de contaminação cruzada com outros fungos;
 - ✓ O fornecimento de nutrientes e pH é controlado e manipulado para o hospedeiro.

b) Desvantagens:

- ✓ As soluções nutritivas são propensas a multiplicação e disseminação de contaminantes microbianos, bem como o desenvolvimento de algas (ELMES; MOSSE, 1984);
- ✓ A falta de um substrato de suporte pode afetar a taxa de produção de esporos;
- ✓ O rápido crescimento radicular em solução pode causar baixa colonização por FMA;
- ✓ Hung; Sylvia (1988) verificaram que a germinação de esporos de *G. Etunicatum* foi menor em culturas hidropônicas do que esporos obtidos a partir do solo;
- ✓ Alto custo devido ao sistema de produção, pois necessita ser em local fechado e com grande infra estrutura.

2.4.3.3 Método de produção *in vitro*

O método de produção *in vitro* baseia-se na cultura de FMAs com raízes modificadas. As primeiras tentativas de cultura deste método datam dos anos 50 e 60 (MOSSE 1959; MOSSE 1962). Em meados dos anos 1970, Mosse e Hepper (1975) estabeleceram com sucesso uma cultura de FMA associada a raízes excisadas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) e trevo (*Trifolium pratense*) em um meio gelificado. Na década de noventa, Berbara e Fonseca (1996) conseguiram a colonização radicular e a esporulação dos fungos em raízes cultivadas axenicamente em meio de cultura definido, permitindo a obtenção de culturas monospóricas de FMAs. Nesta mesma década, Mugnier e Mosse (1987), além de Becars e Fortin (1988) utilizaram como hospedeiros raízes transgênicas de cenoura transformadas pelo plasmídeo Ri T-DNA, sistema esse denominado de Roc. St-Arnaud et al. (1996) e Douds (2002) verificaram que usando o método ROC em placas de Petri divididas aumenta-se a quantidade de colheita de inóculo da mesma cultura. Outro trabalho com FMAs *in vitro* foi posto em prática por Tiwari e Adholeya (2002), que realizaram o co-cultivo de dois isolados de FMA (*Gigaspora margarita* e *Glomus intraradices*) em raízes de cenoura Ri T-DNA transformadas. Wang (2003) realizou a cultura em recipiente hidropônico, sendo que os FMAs e as raízes eram expostos periodicamente a um meio de cultura líquido.

Em paralelo com os sistemas baseados em raízes excisadas, Voets et al. (2005) e Dupré de Boulois et al. (2006) desenvolveram dois sistemas de cultura *in vitro* à base de plantas autotróficas, com a

utilização de placas e tubos preenchidos com meio de cultura crescidos em ambiente controlado. No estudo de Dupré de Boulois et al. (2006), os autores obtiveram, em média, 1.600 esporos num período de 12 semanas em metade de uma placa de Petri, enquanto Voets et al. (2005) obtiveram, em média, 4.500 esporos dentro do mesmo período e mais de 12.000 esporos por placa de Petri, após 22 semanas de cultivo.

Os meios de culturas utilizados para o sistema *in vitro* ROC são o meio mínimo Becard; Fortin (1988), e o meio (MSR) Strullu e Romand (1986) modificado por Declerck et al. (2005). Ambos contem micro e macronutrientes, bem como vitaminas e sacarose e são solidificados com a utilização de Phytogel (Sigma) ou GelGro (MP Biomedicals). Entretanto, no sistema de multiplicação que utiliza a planta inteira, a adição de vitaminas e sacarose não é necessária, pois a fotossíntese realizada pela planta auxilia na obtenção de energia, açúcares, vitaminas, etc.

a) Vantagens

- ✓ A maior vantagem do cultivo em sistema *in vitro* é a ausência de microrganismos indesejáveis, contaminantes, tornando, assim, um sistema adequado para produção em larga escala e com inóculo de alta qualidade;
- ✓ Por crescerem em placas e câmaras, o espaço utilizado para a multiplicação é reduzido;
- ✓ Grande quantidade de esporos produzidos em pouco tempo;
- ✓ O controle das esporulações pode ser acompanhado, determinando, assim, o tempo de colheita;
- ✓ Fatores que determinam a produção (nutrientes) podem ser facilmente detectados e controlados.

b) Desvantagens

- ✓ Poucos estudos foram realizados em relação a diversidade de hospedeiros (raízes) e gêneros de FMAs;
- ✓ Alto custo e técnicos especializados;
- ✓ Sistema de aplicação inconveniente no campo;
- ✓ Culturas *in vitro* de plantas necessitam de acompanhamento e fornecimento de nutriente continuamente, podendo aumentar o risco de contaminação.

A produção em larga escala de inoculantes micorrízicos torna-se importante, independente do método utilizado, desde que se garanta a infectividade e a capacidade de formação simbiótica com a planta. A utilização inóculo micorrízico, certamente, trará benefícios para

produtores agrícolas e florestais, desde que as espécies de FMAs multiplicadas sejam selecionadas para, posteriormente, serem inoculadas de forma comercial e em lavouras. Assim, o processo de absorção de nutrientes pelas plantas, em especial o P, será maior, garantindo o aumento no crescimento e na produtividade das mesmas, reduzindo, conseqüentemente, a utilização e o potencial de contaminação ambiental dos fertilizantes e aumentando o custo benefício para os produtores. Cabe ressaltar que estudos devem ser realizados para avaliar o processo de produção de inoculantes mistos, ou seja, com mais de um grupo de microrganismos que possuem estratégias diferenciadas na obtenção e disponibilidade de outros nutrientes para as plantas como o N e o K.

3 CAPÍTULO I - PRODUÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO ON FARM POR MEIO DE PLANTAS PRÉ-INOCULADAS

Resumo

A produção de inoculantes micorrízicos em escala comercial, Atualmente, vem ocorrendo por meio de métodos que envolvem tecnologias laboratoriais, como o *in vitro*, por intermédio do uso de sistemas hidropônicos com culturas conduzidas em estufas, e de métodos a campo, como o *on farm*. Dentre os diferentes métodos, o sistema *on farm* tem se destacado pela facilidade na obtenção de grandes quantidades de inoculantes com baixo custo. Este trabalho teve como objetivo a multiplicação de inoculante micorrízico pelo método *on farm* com plantas de sorgo pré-inoculadas. Inicialmente, multiplicou-se inóculo dos FMAs *Rhizophagus clarus* RJN102A, *Claroideoglomus etunicatus* RJN101A e *Dentiscutata heterogama* PNB102A. Tubetes de 270 ml foram preenchidos com substrato estéril composto de areia e argila expandida (1:1), adicionado de 10% de cada um dos inóculos de FMA e como planta hospedeira utilizou-se sorgo. As plantas cresceram em casa de vegetação durante 3 meses, adicionando água, diariamente, durante esse período. As plantas de sorgo pré-inoculadas com os isolados de *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama* foram utilizadas para a multiplicação do inóculo. Para cada um dos isolados, 6 sacos de mudas com capacidade de 18l foram preenchidos com casca de arroz carbonizada, matéria orgânica e vermiculita na proporção de: 2,5:2,0:0,5:5,0 (v:v:v:v). Em seguida, 3 plantas de sorgo pré-colonizadas foram colocadas a crescer em cada saco, sendo cultivadas em condições de campo, recebendo irrigação somente em períodos de estiagem prolongados. Após 4 meses realizou-se a coleta do experimento. No momento da montagem e da coleta foram retirados 1,5l de cada tratamento para avaliação do potencial de inóculo micorrízico pelos métodos de NMP e PIM. Amostras de solo e raízes do momento coleta foram utilizadas para determinação da porcentagem de colonização micorrízica e contagem do número de esporos. Os resultados demonstraram que o método proporcionou incremento nos valores de potencial de inóculo micorrízico por meio da determinação dos valores de NMP e PIM. Observou-se, também, que houve aumento porcentagem de colonização radicular e número de esporos, contudo, esse resultado não foi semelhante para todos os isolados testados. O método de produção de inóculo micorrízico *on farm* com a utilização de plantas

pré-inoculadas garante valores de potencial de inóculo micorrízico elevados, além de ser facilmente executado em propriedades rurais.

3.1 INTRODUÇÃO

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são simbiontes obrigatórios com 90% das plantas superiores (SCHÜBLER et al., 2001) presentes nos mais variados ecossistemas terrestres. A inoculação de FMAs em plantas de interesse agrícola e florestal vem aumentando nas últimas décadas (AZCÓN et al., 2009). Dentre vários benefícios advindos da simbiose destacam-se a melhoria na produtividade das plantas, bem como na resistência a fatores bióticos e abióticos (SMITH; READ, 2008) e redução na aplicação de adubos fosfatados reduzindo, assim, os custos produtivos (GIANINAZZI et al., 2002; JOHANSSON et al., 2004). Douds et al. (2010) sugerem, também, que a simbiose é atraente quando se pensa em agricultura sustentável ou orgânica, uma vez que contribui minimizando ou eliminando a utilização de fertilizantes sintéticos e pesticidas.

Nesse contexto, a produção de inoculante micorrízico assume grande importância, uma vez que sua disponibilidade em escala comercial pode beneficiar produtores rurais e viveiristas. Atualmente, várias metodologias de produção de inoculante micorrízico para uso em escala comercial estão sendo testadas (IJDO et. al., 2011), porém, os níveis de concentrações de propágulos podem variar de altos a baixos na mesma metodologia, podendo gerar problemas na qualidade do inoculante (DOUDS et al., 2010) . Entretanto, independente do método utilizado, a produção em larga escala ainda é restrita (DOUDS et al., 2005; IJDO et. al., 2011).

Dentre as várias alternativas de produção de inóculo micorrízico em escala comercial, a produção pelo método *on farm* tem se destacado quando comparada as demais. O método apresenta características positivas como grande quantidade de inoculante produzido, visto que sua multiplicação ocorre em sacos ou caixas para mudas, (DOUDS et al., 2006; IJDO et al., 2011), baixo custo devido a produção ser realizada em condições de campo ou em casa de vegetação na própria propriedade (GAUR; ADHOLEYA 2002; DOUDS et al., 2008) e inoculantes com elevado potencial micorrízico (DOUDS et al., 2010), o que pode garantir uma simbiose mais efetiva.

O método de produção *on farm* necessita obrigatoriamente de uma planta hospedeira que possua registros de simbiose com FMAs,

garantindo, assim, a multiplicação do fungo (IJDO et al., 2011) e de um substrato para crescimento da planta e multiplicação dos propágulos fúngicos (DOUDS et al., 2005). O substrato pode ser produzido na própria propriedade por meio da mistura de solo, compostos orgânicos, esterco, restos vegetais, entre outros (DOUDS et al., 2005; 2006). Contudo, sabe-se que substratos ricos em P podem diminuir a multiplicação dos FMAs, reduzindo, dessa forma, a qualidade do inoculante produzido. Sendo assim, a adição de compostos inertes como perlita e vermiculita é uma alternativa para diminuir a concentração de P garantindo, assim, que não ocorra a inibição da colonização das raízes por FMA (DOUDS et al., 2008a).

No Brasil, estudos desenvolvidos com o intuito de produzir inoculante micorrízico pelo método *on farm* são inexistentes. Assim sendo, essa pesquisa teve como objetivo avaliar o protocolo de produção de inoculante *on farm* obtido por meio da utilização de plantas de sorgo pré-inoculadas com três FMAs distintos, na cidade de Gaspar – SC.

3.2 METODOLOGIA

O experimento consistiu na multiplicação de inóculo de FMA *on farm*, com plantas pré-inoculadas com diferentes isolados fúngicos. Este experimento ocorreu entre os meses de maio e dezembro de 2011 e foi realizado em casa de vegetação e no Horto Florestal da Universidade Regional de Blumenau, em Gaspar - SC. Os FMAs utilizados no estudo foram isolados de *Rhizophagus clarus* RZN102A, *Claroideoglomus etunicatus* RZN101A e *Dentiscutata heterogama* PNB102A, obtidos da Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG, www.furb.br/cicg, Blumenau-SC).

Inicialmente, multiplicou-se inóculo dos FMAs *Rhizophagus clarus* RZN102A, *Claroideoglomus etunicatus* RZN101A e *Dentiscutata heterogama* PNB102A, conforme metodologia seguinte. Os isolados de FMA foram adicionados (10%) a substrato estéril composto de areia + argila expandida 1:1 (v:v). Esta mistura foi acondicionada em tubetes plásticos (270 mL) previamente esterilizados, sendo que cada um recebeu cinco sementes de sorgo. Após a germinação houve um desbaste, deixando-se apenas 3 plantas por tubete, sendo que as mesmas permaneceram crescendo até agosto de 2011. Durante a fase no tubete, foram realizadas irrigações diárias e aplicado, em dose única, 50mL de solução nutritiva de Long Ashton (RESH, 1997), livre de P.

Após o crescimento em tubetes, as plantas foram utilizadas no processo de multiplicação de inóculo micorrízico pelo método *on farm*.

Para multiplicação de cada uma dos isolados de FMA foram utilizados seis repetições com sacos plásticos pretos (40x60cm), com capacidade de 20L cada, perfazendo um total de 18 sacos. Estes foram preenchidos com substrato composto de solo, casca de arroz carbonizada, matéria orgânica e vermiculita na proporção de: 2,5:2,0:0,5:5,0 (v:v:v:v). Após o preenchimento, foram abertas 3 covas do formato de um tubete em cada saco, as quais receberam 3 plantas de sorgo com substrato provenientes de um tubete colonizadas com um dos 3 FMAs multiplicados na etapa acima. Dessa maneira, 9 plantas de um mesmo FMA foram transplantadas para cada saco. No momento da montagem do experimento, 3 tubetes de cada um dos isolados de FMA foram desmontados e o substrato homogeneizado para determinação do potencial de inóculo micorrízico por meio da determinação do potencial infectivo médio (PIM) e número mais provável de propágulos infectivo (NMP).

O potencial infectivo médio foi determinado por meio da metodologia descrita por Moorman; Reeves (1979). Tubetes plásticos com capacidade de 270ml foram preenchidos com 50% de areia estéril e 50% de solo inóculo de cada um dos dois tratamentos (SN e RC). Cinco tubetes foram estabelecidos por tratamento e semeados com sorgo (*Sorghum bicolor*) e, após a germinação, fez-se o raleio, deixando somente uma planta por tubete. As plantas ficaram crescendo durante 30 dias em condições controladas de casa de vegetação para, então, serem coletadas. No momento da coleta realizou-se a separação da parte aérea da radicular com auxílio de uma tesoura, sendo a parte aérea e o substrato descartados. As raízes foram limpas e lavadas em água corrente e descoloridas conforme metodologia de Koske; Gemma (1979). Na sequência, a porcentagem de colonização foi mensurada e utilizada como estimativa do potencial infectivo médio.

A avaliação do NMP foi realizada por meio da técnica de diluição seriada, de acordo com a metodologia descrita por Alexander (1965) e apresentado por Bagyaraj e Stürmer (2010). Cinco diluições (10^{-1} a 10^{-5}), com cinco repetições cada, foram estabelecidas por tratamento. As 5 repetições de cada diluição foram dispostas em tubetes de 100 ml e semeadas com *Sorghum bicolor*. Posterior à germinação, houve o raleio e apenas uma planta foi deixada por tubete. Após 30 dias de cultivo em condições de casa de vegetação ocorreu a coleta. Neste momento, as raízes foram retiradas do substrato, lavadas em água corrente e descoloridas de acordo com o método de Koske; Gemma (1989). As raízes foram avaliadas quanto a presença ou ausência de

colonização micorrízica, sendo considerados infectados os segmentos que apresentavam hifas (externas e internas), vesículas ou arbúsculos.

As plantas de sorgo permaneceram crescendo a campo, em local aberto e exposto durante um período de 4 meses quando, então, o experimento foi coletado. No momento da coleta a parte aérea foi descartada e o substrato do interior do saco colocado sobre uma bancada. Após, o mesmo foi fracionado em três secções horizontais, denominadas de secção superior, média e inferior. Da secção média foram retiradas três amostras com auxílio de um cilindro metálico com capacidade de 50cm³ e acondicionadas em sacos plásticos em geladeira para contagem do número de esporos. Os esporos foram extraídos pelo método de peneiragem úmida (Gerdemann e Nicolson, 1963) e em seguida, por centrifugação em água e gradiente de sacarose, a 2.000 rpm, durante 1 minuto. Realizou-se a contagem com auxílio de microscópico estereoscópico (40 x).

Nesse momento avaliou-se, também, a porcentagem de colonização radicular das raízes de sorgo. Três amostras de 1g de raízes de sorgo foram coletadas de cada repetição e descoloridas de acordo com a metodologia de Koske; Gemma (1989). Após lavar as raízes, as mesmas foram acondicionadas em *beckers* e mergulhadas numa solução de KOH 10%, para em seguida serem colocadas em banho-maria a 90°C, por 50 minutos. Após esse período, a solução de KOH foi descartada, as raízes foram lavadas em água corrente e cobertas com HCl 1% por 10 minutos em temperatura ambiente. O HCl foi descartado e, logo após, as amostras foram mergulhadas em uma solução corante contendo azul de tripan (0,05%) e dispostas novamente em banho-maria por 50 minutos a 90° C. Após o descarte da solução corante, as raízes permaneceram em água a 4° C até a avaliação da % de colonização micorrízica de acordo com a metodologia de Giovannetti e Mosse, (1980).

No momento das coletas foram retiradas, também, amostras de 1,5L de cada um dos tratamentos para avaliação do inoculante quanto ao seu potencial de inóculo micorrízico, por meio da determinação do potencial infectivo médio (PIM) e número mais provável de propágulos infectivos (NMP), conforme metodologia descrita anteriormente. Os resultados obtidos para número de esporos e porcentagem de colonização foram transformados prioritariamente à análise estatística. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do software SAS (SAS, 1999) e submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar o efeito dos tratamentos testados e, quando

significativo, as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ($P<0,05$).

3.3 RESULTADOS

A análise de variância demonstrou a existência de diferença significativa entre os FMAs testados e os momentos de análise (montagem e coleta do experimento), sendo observado um acréscimo para o PIM entre os momentos montagem e coleta para os 3 FMAs testados, conforme exposto na tabela 1.

Tabela 1 – Potencial infectivo médio (PIM), obtido por meio da % de colonização radicular na montagem e coleta

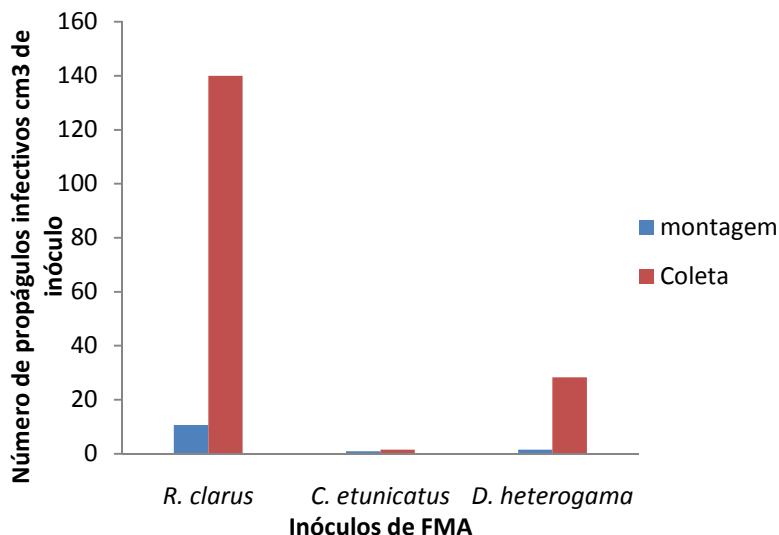
Tratamentos	% Colonização Radicular	
	Montagem	Coleta
<i>R. clarus</i>	$38,66 \pm 5,44b$	$59,05 \pm 3,26a$
<i>C. etunicatus</i>	$20,96 \pm 7,83b$	$35,23 \pm 9,18a$
<i>D. heterogama</i>	$11,9 \pm 8,83b$	$26,61 \pm 7,12a$

Fonte: O Autor (2013)

Nota: Médias seguidas pela mesma letra dentro da linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 95 % de confiabilidade.

Os resultados referentes aos dados de NMP apresentados demonstram que, para todos os tratamentos, houve aumento no número de propágulos quando comparados os momentos de análise, ou seja, houve aumento no valor obtido de NMP quando se compara a montagem com a coleta (Gráfico 1). Para o tratamento contendo inóculo de *R. clarus*, o número de propágulos infectivos por cm^3 de solo que na montagem era de 10,6 passou no momento da coleta a ser de 140, ou seja, um aumento superior a 13 vezes. Para o tratamento *C. etunicatus*, houve um aumento de 4 vezes, pois no momento da montagem havia 0,1 propágulos infectivos por cm^3 e no momento da coleta 0,43. Para o tratamento com *D. heterogama*, o aumento foi um pouco superior a 18 vezes, saindo de 1,5 propágulos no momento da montagem e finalizando com 28,3 no momento da coleta. Todos estes dados podem ser melhor visualizados no gráfico abaixo.

Gráfico 1 - Comparação de propágulos infectivos obtidos nos momentos de montagem e coleta



Fonte: O Autor (2013)

Nota: Número mais provável (NMP) de propágulos infectivos obtidos nos momentos de montagem e coleta do experimento de produção de inóculo *on farm* realizado no Horto Florestal, Gaspar, SC, 2012.

A porcentagem de colonização, número de esporos e de esporos nativos das amostras obtidas no momento da coleta das plantas de sorgo, apresentaram, também, diferenças estatísticas para os parâmetros avaliados conforme demonstrado na tabela 2. A inoculação com *R. clarus* proporcionou maior porcentagem de colonização das raízes de sorgo quando comparada com *C. etunicatus* e *D. heterogama*. Em relação ao número de esporos, o tratamento contendo inóculo de *C. etunicatus* foi significativamente superior aos outros dois. Para o número de esporos nativos, o tratamento contendo o inóculo de *D. heterogama* foi o que apresentou maior número, diferindo significativamente somente do tratamento contendo o inóculo *R. clarus*.

Tabela 2 - Porcentagem de colonização, número esporos/100ml e número de esporos nativos encontrados em raízes de sorgo

	<i>R. clarus</i>	<i>C. etunicatus</i>	<i>D. heterogama</i>
Colonização mic (%)	56,02 ± 3,46a	39,72 ± 3,11b	29,48 ± 2,37c
Nº esporos (100ml)	126,16 ± 19,5b	3784 ± 25,3a	10± 39,7c
Nº esporos nativos (100ml)	462,33 ± 24,4b	1695,64 ± 53,8a	1738,66 ± 44,7a

Fonte: O Autor (2013)

Nota: Médias seguidas pela mesma letra dentro da linha não diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 95 % de confiabilidade.

3.4 DISCUSSÃO

A avaliação do potencial de inóculo micorrízico realizada pelos bioensaios de potencial infectivo médio (PIM) e número mais provável de propágulos infectivos (NMP) demonstrou que os valores obtidos na coleta para PIM variaram de 26,6 a 59,5% (tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Douds et al. (2010), que encontraram 60% de colonização radicular no momento da coleta do inóculo e verificaram, também, que a porcentagem de colonização foi menor com a multiplicação de inóculos nativos frente a multiplicação de inóculos introduzidos. Os resultados obtidos demonstram que os valores de porcentagem de colonização variaram de baixos a médios, sendo que vários fatores relacionados ao solo e aos simbiontes podem ter atuado inibindo ou favorecendo a colonização. Douds et al. (2010) relatam que a adição de vermiculita, perlita ou resíduos pobres em nutrientes são essenciais a substratos que apresentam grandes quantidades de P, fazendo com que ocorra, assim, a diluição na disponibilidade desse nutriente.

Em relação ao NMP, os valores obtidos para esse bioensaio demonstram que houve aumento significativo no número de propágulos infectivos entre a montagem e a coleta do inoculante. No momento da coleta, o número de propágulos infectivos por cm^3 de solo encontrados para os isolados de *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama* foram de 140, 1,4 e 28,3 respectivamente, valores esses superiores ao momento montagem. Em um trabalho semelhante, Douds et al. (2010) verificaram que o número de propágulos infectivos variou entre 21 e 130 cm^3 de solo nas diferentes diluições testadas, contudo valores maiores foram

obtidos em solo misturado com composto orgânico. Em substrato composto por vermiculita os mesmos autores encontraram valores de 503, 240 e 42 propágulos cm³ nas diluições 1:4, 1:9 e 1:99 de composto com vermiculita. Por outro lado, Sharma e Adholeya (2012) verificaram que *Glomus intraradices* produziu maior numero de propágulos infectivos quando comparado aos valores obtidos com a população nativa de FMA.

A diferença obtida entre os três isolados testados pode estar relacionada as diferenças encontradas nas condições do substrato no momento da montagem e da coleta. Os FMAs utilizados eram oriundos de substrato composto de areia e argila expandida, pobre em fósforo disponível. No momento da inoculação passaram a um substrato com características químicas e físicas completamente diferentes, que pode ter contribuído para as diferenças encontradas, pois as respostas dos isolados são dependentes dos valores de P no solo. Resultados obtidos por Douds et al. (2006; 2012) demonstram que diferentes isolados fúngicos, quando multiplicados em plantas cultivadas nas mesmas condições, apresentam diferença no número de propágulos que podem estar relacionadas a adaptabilidade do isolado fúngico ao substrato e, principalmente, a quantidade de P disponível. A multiplicação dos FMAs está diretamente relacionada com a adaptação ao substrato, espécie hospedeira e quantidade de fósforo existente (SMITH; READ, 2008).

Os resultados obtidos nessa pesquisa para porcentagem de colonização micorrízica e número de esporos demonstram que a utilização de sorgo como planta hospedeira é viável, pois houve aumento nos parâmetros avaliados entre os momentos de montagem e coleta, conforme exposto acima, na tabela 2. Contudo, o isolado de *R. clarus* embora tenha apresentado o maior valor de porcentagem de colonização, apresentou os menores valores para número de esporos quando comparado ao isolado *C. etunicatus*. Isso comprova o fato de que nem sempre grande quantidade de esporos se traduz em alta porcentagem de colonização radicular. Diferentemente dos outros dois isolados testados, a espécie *D. heterogama* demonstrou que a simbiose não foi eficiente, principalmente devido à baixa porcentagem de colonização radicular e o baixo número de esporos encontrados.

Douds et al. (2010) verificaram um aumento significativo no número de esporos nos tratamentos inoculados em relação aos não inoculados no método *on farm*, dados esses que corroboram com os obtidos nesse experimento. A variação encontrada nos valores dos parâmetros avaliados pode estar relacionada a vários fatores. Segundo

Dodd et al. (1990a) e Struble e Skipper (1988), o número de esporos, a porcentagem de colonização e o número de propágulos infectivos são dependentes da planta hospedeira e das condições de cultivo. Douds et al. (2005, 2006) verificaram que a produção de inoculante *on farm* em substrato com grande disponibilidade de P tende a diminuir o efeito da colonização micorrízica nas raízes das plantas hospedeiras.

A escolha da planta hospedeira deve ser realizada criteriosamente, sendo que plantas que apresentam grande capacidade de serem colonizadas e, consequentemente, promovam o crescimento e a esporulação dos FMA (DALPÉ; MONREAL, 2004) tornam-se essenciais na multiplicação de inóculo micorrízico. Os resultados obtidos por meio dos parâmetros avaliados demonsntram que a utilização de plantas de sorgo pré-inoculadas para a multiplicação de inóculo *on farm* é uma alternativa vantajosa frente as demais metodologias existentes de produção de inoculante. O método aqui proposto, além de garantir aumento nas características desejáveis para um bom inoculante, tais como elevados valores de NPM e PIM, grande porcentagem de colonização radicular e aumento no número de esporos quando utilizados isolados de FMA, pode influenciar, também, na população nativa de fungos, podendo garantir ainda mais a eficiência da inoculação. De acordo com Douds et al. (2006), a produção de um inóculo contendo isolados localmente adaptadas de fungos micorrízicos pode garantir maior eficiência, proporcionando maior produtividade aos sistemas agrícolas. Comunidades já adaptadas possuem maior capacidade competitiva que fungos adicionados (SMITH; READ, 2008).

Outras vantagens da utilização do método *on farm* frente aos demais é a facilidade com que os produtores podem produzi-lo na propria propriedade, pois todos os materiais necessários geralmente já estão no local. Contudo, cabe salientar que a produção em substratos com grande disponibilidade de P deve ser evitada, visto que esse fator é limitante na simbiose micorrízica. Dessa forma, a utilização de compostos pobres em fósforo ou a diluição do substrato com vermiculita torna-se essencial para produção de inoculantes com boas características agronomicas.

Além disso, essa produção pode ser realizada em potes individuais, sacos, containers, entre outros, possibilitando a utilização de variada gama de substratos (MILLNER; KITT, 1992; SYLVIA; SCHENCK, 1993; DOUDS et. al., 2005, 2006; SAITO; MARUMOTO, 2002; GAUR; ADHOLEYA, 2002; MA et. al., 2007). Ressalta-se, ainda, a importância de multiplicar isolados específicos em sacos

separados, uma vez que todos juntos no mesmo local aumenta a concorrência entre os isolados pela ocupação das raízes e, concomitantemente, para o carbono fixo necessária para o crescimento (DOUDS et. al., 2006), podendo, dessa forma, diminuir o número de propágulos e reduzir a qualidade do inóculo.

4 CAPÍTULO II - MULTIPLICAÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO *ON FARM* E APLICAÇÃO EM LAVOURA DE MILHO (*ZEA MAYS L.*)

Resumo

O método *on farm* é uma importante ferramenta para otimizar a produção de inoculante micorrízico em larga escala. O objetivo deste trabalho foi avaliar o método de produção de inoculante micorrízico *on farm* via inoculação direta no solo e verificar o efeito da utilização do inóculo na produtividade da cultura do milho a campo. A pesquisa transcorreu em duas etapas, realizadas em uma propriedade rural em Anita Garibaldi-SC. A primeira consistiu-se na produção do inoculante *on farm* e contou com dois tratamentos de inoculação, RC (*R. clarus*) e SN (solo nativo). Seis sacos de polietileno com capacidade de 18L foram preenchidos com solo nativo e vermiculita 1:1(v:v) para cada tratamento e semeados com aveia. No tratamento RC, solo inóculo de uma cultura pura de *R. clarus*, adicionou-se (10%). Os sacos foram deixados em condições de campo. No momento da montagem e da coleta foram retirados 1,5L de cada tratamento para avaliação do potencial de inóculo micorrízico pelos métodos de NMP e PIM. Após 3 meses, o inóculo foi utilizado na etapa 2. Para essa etapa, três tratamentos de FMA (RC, SN e Controle) e 3 Níveis de P (0, $\frac{1}{2}$ e 1 dose) foram testados na cultura do milho em condições de campo por 6 meses. Os resultados indicam que a metodologia foi eficiente na multiplicação de inoculante por apresentar na coleta valores de potencial de inóculo micorrízico superiores aos obtidos na montagem do experimento. Os resultados da etapa 2 demonstram que a utilização do inoculante *on farm*, multiplicado com isolado de *R. clarus*, proporcionou maiores produtividades do que o inoculante *on farm* produzido com a população nativa do solo e o tratamento controle. Conclui-se, portanto, que a metodologia proposta é eficiente e de fácil aplicabilidade e que a utilização do inoculante *on farm* a campo aumenta a produtividade na cultura do milho.

4.1 INTRODUÇÃO

O cultivo sucessivo, o uso intensivo de insumos e o manejo inadequado ao longo dos anos têm propiciado a queda da qualidade do sistema solo, causando redução na produtividade devido aos processos

de degradação químicos, físicos e biológicos (BARBOSA; TAVARES FILHO, 2006). Os processos de degradação e a necessidade de uma produção agrícola sustentável por meio da utilização de microrganismos que auxiliam no aproveitamento e no uso de nutrientes e, consequentemente, no desenvolvimento das plantas é um processo almejado na agricultura (SAGGIN JÚNIOR; SILVA, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). De maneira geral os microrganismos atuam modificando as propriedades físicas, químicas e biológicas, principalmente por meio da ciclagem de nutrientes, atuando, assim, diretamente na qualidade do solo e no desenvolvimento das plantas (BALOTA et al., 1998).

Dentre os vários grupos de microrganismos de interesse agrícola, atenção especial deve ser dada aos fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que formam associação simbiótica com a maioria das espécies vegetais. Estes fungos auxiliam na obtenção de P devido, principalmente, a ação de hifas que aumentam a área de absorção de nutrientes das plantas pelo aumento da área de exploração do solo pelas raízes (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; BALZERGUE et al., 2011). Dessa forma, a associação micorrízica pode assumir importância destacada na redução dos custos de produção de espécies agrícolas e florestais, pois tende a minimizar gastos relacionados a fertilizantes minerais, bem como melhoram a qualidade fitossanitária das plantas (SIEVERDING, 1991; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim sendo, a utilização de inoculantes microbianos eficientes na ciclagem e disponibilização de nutrientes para as plantas configura-se como uma alternativa para a agricultura atual, principalmente por ser a sustentabilidade ambiental em todas as atividades humanas a grande preocupação da sociedade.

O mercado de produção de inoculantes biológicos vem crescendo a cada ano, sendo comandado por pesquisas com bactérias fixadoras de nitrogênio que formam simbiose com plantas leguminosas (ANPII, 2012). Contudo, na última década, tem-se buscado, também, tecnologias para a produção de inoculantes de FMAs, cujo principal papel está relacionado na absorção de P do solo, visto ser o segundo elemento químico que mais limita o crescimento das espécies vegetais (GATIBONI, 2003). O efeito da inoculação de plantas de interesse agrícola com FMAs tem se mostrado benéfico em várias condições experimentais realizadas em ambiente controlado (COSTA et al., 2005). Além disso, a inoculação com FMAs tem se mostrado viável em condições de campo e promove o crescimento de culturas como a da

mandioca (SIEVERDING 1991), do cafeeiro (SIQUEIRA et al., 1993) e do maracujá-doce (ANJOS et al., 2005).

Não obstante os esforços de pesquisas em universidades e indústrias, a disponibilidade comercial de inoculante micorrízico ainda é baixa devido a dificuldade na multiplicação de FMAs, fator este relacionado com a própria natureza do fungo (IJDO et al., 2011) e, também, por dificuldades na obtenção de técnicas eficazes de produção de inoculantes em larga escala, indiferente da técnica utilizada. As principais técnicas de produção são *in vitro*, aeropônico, e produção baseada em métodos a campo “*on farm*” (DOUDS et al., 2004; SINGH, 2002; GIANINAZZI; VOSATKA, 2004).

O método menos oneroso, produção *on farm*, é realizado por meio de substratos a base de areia, material orgânico, solo, entre outros, sendo apontado como alternativa viável para produção em larga escala (DOUDS et al., 2008). A produção de inóculo a campo *on farm* foi desenvolvida na Colômbia (DODD et al., 1990; SIEVERDING 1991) e na Índia (GAUR, 1997; GAUR; ADHOLEYA, 2002). Nos Estados Unidos, Douds et. al. (2006) propuserem um método *on farm* alternativo e de fácil execução, permitindo, assim, que os próprios agricultores propagassem os FMAs indígenas encontrados nas suas próprias fazendas. O método consiste na multiplicação de FMAs nativos do solo, ou inóculos de FMA provenientes de culturas puras (DOUDS; SCHENCK 1990a, b; GAUR; ADHOLEYA, 2000), que são inoculados e multiplicados em substratos contendo solo, porém, com baixa disponibilidade de P. Para isso, a utilização de vermiculita é recomendada, visto que a diluição de solo com este elemento reduz consideravelmente os teores de P disponíveis às plantas (DOUDS et. al., 2006). Um fator importante que deve sempre ser considerado é a quantidade de P existente no substrato, visto que altos índices podem inibir ou reduzir a colonização das plantas (SMITH; READ, 2008).

A produção *on farm* também requer a participação de uma espécie vegetal que deverá formar simbiose com o fungo, destacando-se nesse caso as gramíneas. Outras características importantes das espécies vegetais são o ciclo de vida curto, raiz fasciculada e bom nível de colonização por grande parte das espécies de FMA (IJDO et al., 2011). O crescimento e desenvolvimento das plantas podem ocorrer em caixas ou sacos de mudas que comportem uma grande capacidade de substrato. O processo de condução pode ser em condições controladas de casa de vegetação ou a campo, dependendo das condições e disponibilidade de material dos produtores (DOUDS et al., 2005 e 2006; GAUR;

ADHOLEYA 2002; DODD et al., 1990a, b). O princípio da metodologia é facilitar o processo de multiplicação a campo, sendo assim, o cultivo das espécies vegetais hospedeiras é realizado ao ar livre, sem controle das condições ambientais, familiarizando, dessa forma, o sistema com as condições dos agricultores (DOUDS et. al., 2005).

No sistema *on farm*, a inoculação com FMAs deve ocorrer de acordo com a necessidade comercial ou experimental, ou seja, pode-se realizá-la com FMAs ou comunidades de FMAs específicas, bem como multiplicar os já existentes no solo ou substrato utilizado como veículo. O melhoramento da técnica de produção de inoculantes *on farm* torna-se necessário a medida que a utilização de inóculo micorrízico vem crescendo em escala comercial, principalmente nos setores agrícola e florestal (IJDO et al., 2011). A produção de inóculo de FMAs no Brasil é restrita às universidades e poucos estudos estão sendo realizados para a produção comercial ou em grande escala. Além disso, as condições climáticas, ambientais e agrícolas são diferentes das encontradas nos estudos já realizados, o que requer um aprimoramento das técnicas de produção. Outro fator importante está relacionado a baixa quantidade de P disponível nos solos brasileiros, ou seja, a inoculação poderá diminuir os gastos com adubos fosfatados (NOVAIS; SMYTH; NUNES, 2007).

Frente ao exposto, esta pesquisa teve como objetivo testar dois protocolos de produção de inoculante *on farm*, bem como testar o uso de inoculante micorrízico *on farm* produzido em um dos protocolos no crescimento e na produtividade de milho (*Zea mays*) em lavoura de agricultura familiar no município de Anita Garibaldi-SC.

O presente estudo está dividido em 2 experimentos, sendo o primeiro relacionado a multiplicação de inóculo de FMA via método *on farm* e o segundo um teste a campo do inóculo produzido *on farm* com a cultura do milho (*Zea mays L.*) O FMA utilizado no estudo foi o isolado de *Rhizophagus clarus* RZN102A, obtido da Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG, www.furb.bc/cicg, Blumenau-SC).

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo está dividido em 2 experimentos, sendo o primeiro relacionado a multiplicação de inóculo de FMA via método *on farm*, e o segundo um teste a campo do inóculo produzido *on farm* com a cultura do milho (*Zea mays L.*) O FMA utilizado no estudo foi o isolado de *Rhizophagus clarus* RZN102A, obtido da Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG, www.furb.bc/cicg, Blumenau-SC).

4.2.1 Experimento 1 – Produção de inóculo micorrízico *on farm* com inoculação direta

O experimento foi realizado no município de Anita Garibaldi, região serrana de Santa Catarina ($27^{\circ} 43' 46''S$ e $51^{\circ} 11' 24''W$), durante os meses de agosto e dezembro de 2011. O local é uma área de lavoura de milho cultivada há mais de 10 anos com uma agricultura sem uso de insumos industrializados, como fertilizantes, sementes e agrotóxicos, tendo como pressuposto um sistema de agricultura familiar. O solo é classificado como Nitossolo bruno, cujas características químicas foram: pH (H₂O): 5,5; Ca: 6,1 cmol_c dm⁻³; Mg: 2,7 cmol_c dm⁻³; Al: 0,0 cmol_c dm⁻³; H + Al: 5,49 cmol_c dm⁻³; CTC efetiva: 14,49 cmol_c dm⁻³; K: 1,63 mg dm⁻³; P: 7,1 mg dm⁻³; M.O.: 3,5 % e Argila: 49%.

A produção de inoculante *on farm* foi realizada em sacos plásticos pretos para mudas com dimensões de 40 cm de largura, 60 cm de altura e capacidade de 20L. O experimento contou com dois tratamentos, que foram solo nativo + vermiculita na proporção de 1:1 (v:v) (SN) e SN adicionado de 10% solo inóculo contendo propágulos de *Rhizophagus clarus* RJN102A (RC). O inóculo de *R. clarus* foi previamente multiplicado em substrato estéril, contendo areia e argila expandida 1:1 (v:v), semeado com sorgo e conduzido em casa de vegetação por um período de 4 meses. Após esse período a irrigação foi suspensa para que as plantas secassem e o inóculo acondicionado em sacos plásticos dentro de geladeira, garantindo, assim, a viabilidade dos propágulos infectivos até a montagem do experimento *on farm*.

Para o experimento *on farm*, seis sacos foram preenchidos com 18L de substrato de cada um dos tratamentos. Após o preenchimento, 20ml de sementes de aveia preta (*Avena stringosa*) foram distribuídos de forma uniforme dentro dos sacos, sendo, em seguida, cobertas com o respectivo substrato. Os seis sacos de cada tratamento foram dispostos na lavoura em linham sobre uma lona preta, para evitar o contato do experimento com o solo do campo.

O crescimento das plantas foi em condições naturais, sem controle de temperatura e umidade. Contudo, no 30º dia realizou-se uma irrigação com urina bovina devido a deficiência de N, constatada pelo amarelamento das folhas de aveia. Aproximadamente 90 dias após o início do experimento as plantas de aveia começaram a florescer e ocorreu, então, a coleta do inóculo, de forma manual, sendo a parte aérea separada da radicular e do substrato com ajuda de tesoura, e o

inóculo misturado homogeneamente dentro de um carrinho de mão para, em seguida, ser utilizado no experimento 2. Nesta etapa retirou-se uma amostra de 1L de inóculo de cada um dos tratamentos, contendo substrato e raízes de aveia para determinação de número de esporos do FMA inoculado (*R. clarus*), número de esporos nativos e porcentagem de colonização micorrízica. Para determinação do número de esporos e número de esporos nativos foram utilizadas 3 repetições de 100mL de cada um dos tratamentos. Os esporos foram extraídos pelo método de peneiragem úmida (Gerdemann; Nicolson, 1963) e, depois, por centrifugação em água e gradiente de sacarose, a 2.000 rpm durante 1 minuto. A contagem foi realizada com auxílio de microscópico estereoscópico (40 x).

Para a determinação da porcentagem de colonização micorrízica, três amostras de 1g de raízes de aveia foram coletadas de cada repetição e descoloridas de acordo com a metodologia de Koske; Gemma (1989). Após lavar as raízes, as mesmas foram acondicionadas em *beckers* e mergulhadas numa solução de KOH 10%, para em seguida serem colocadas em banho-maria a 90°C por 50 minutos. Após esse período, a solução de KOH foi descartada, as raízes foram lavadas em água corrente e cobertas com HCl 1% por 10 minutos em temperatura ambiente. O HCl foi descartado e as amostras foram mergulhadas em uma solução corante contendo azul de tripan (0,05%) e dispostas novamente em banho-maria por 50 minutos a 90°C. Após o descarte da solução corante, as raízes permaneceram em água a 4°C até a avaliação da % de colonização micorrízica de acordo com a metodologia de Giovannetti; Mosse (1980).

Nos momentos de montagem e coleta foram retiradas amostras de 1,5L de cada um dos tratamentos para avaliação do inoculante quanto ao seu potencial de inóculo micorrízico por meio da determinação do potencial infectivo médio (PIM) e número mais provável de propágulos infectivos (NMP). O potencial infectivo médio foi determinado por meio da metodologia descrita por Moorman; Reeves, (1979). Tubetes plásticos com capacidade de 270ml foram preenchidos com 50% de areia estéril e 50% de solo inóculo de cada um dos dois tratamentos (SN e RC). Cinco tubetes foram estabelecidos por tratamento e semeados com sorgo (*Sorghum bicolor*) e, após germinação, fez-se o raleio, deixando somente uma planta por tubete. As plantas ficaram crescendo durante 30 dias em condições controladas de casa de vegetação para, então, serem coletadas.

No momento da coleta realizou-se a separação da parte aérea da radicular com auxílio de uma tesoura, sendo a primeira e o substrato

descartados. As raízes foram limpas e lavadas em água corrente e descoloridas conforme metodologia de Koske; Gemma (1979). Na sequência, a porcentagem de colonização foi mensurada e utilizada como estimativa do potencial infectivo médio. A avaliação do NMP foi realizada por meio da técnica de diluição seriada, de acordo com a metodologia descrita por Alexander (1965) e apresentado por Bagyaraj; Stürmer (2010). Cinco diluições (10^{-1} a 10^{-5}), com cinco repetições cada, foram estabelecidas por tratamento, sendo que ambas foram dispostas em tubetes de 100 ml e semeadas com *Sorghum bicolor*. Depois da germinação houve o raleio e apenas uma planta foi deixada por tubete. Após 30 dias de cultivo em condições de casa de vegetação ocorreu a coleta. Neste momento as raízes foram retiradas do substrato, lavadas em água corrente e descoloridas de acordo com o método de Koske; Gemma (1989). As raízes foram avaliadas quanto a presença ou ausência de colonização micorrízica, sendo considerados infectados os segmentos que apresentavam hifas (externas e internas), vesículas ou arbúsculos.

Os resultados obtidos para número de esporos e porcentagem de colonização foram transformados prioritariamente a análise estatística. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do software SAS (SAS, 1999) e submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar o efeito dos tratamentos testados e, quando significativo, as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ($P<0,05$).

4.2.2 Experimento 2 – Teste de inóculo produzido *on farm* na cultura do milho (*Zea mays L.*)

O inóculo produzido no experimento 1 foi testado na promoção do crescimento de milho (*Zea mays*). Este estudo foi realizado em uma propriedade rural no município de Anita Garibaldi, SC, sendo que o plantio do milho ocorreu no mês de novembro de 2011 e a colheita do experimento em abril de 2012. As características químicas do solo foram apresentadas no experimento 1. O estabelecimento do experimento de milho seguiu o modo de preparo do solo e adubação utilizados normalmente pelo agricultor. O preparo do solo foi realizado de maneira convencional e, após a gradagem, linhas distanciadas a 0,7m foram riscadas com auxílio de um marcador de linhas puxado por tração animal.

O experimento constou de um fatorial resultante da combinação de 3 tratamentos de inoculação e 3 níveis de adubação. O delineamento experimental foi de blocos, ao acaso, com 3 repetições e 3 parcelas divididas em 3 subparcelas, visualizadas na tabela 3, abaixo. Cada bloco continha 3 parcelas com área de 15x12m e dentro de cada parcela foram marcadas 3 subparcelas com tamanho de 5m x 4m. As parcelas receberam os tratamentos de inoculação oriundos do experimento 1 (RC e SN) e um terceiro tratamento (Controle) onde não havia adição de nenhum inóculo micorrízico. As subparcelas foram divididas de acordo com a adubação: 1 (sem adubação), 2 (1/2 adubação utilizada pelo produtor) e 3 (dose completa de adubo utilizada pelo agricultor). O adubo utilizado foi esterco de peru peletizado, sendo adicionada a quantia de 17,5ml e 35ml por linha para os tratamentos 2 e 3, respectivamente.

Tabela 3- Delineamento experimental a campo do experimento milho

3*A**	2A	1A	2B	3B	1B	3C	1C	2C
2C	3C	1C	1A	2A	3A	1B	1B	3B
2B	1B	3B	3C	1C	2C	2 ^a	3A	1 ^a

Fonte: O Autor (2013)

Notas: *1 – Sem adubação; 2 – ½ Adubação; 3 – 1 adubação.

**A – Controle (sem adição de FMA); B – (Solo Nativo - SN); C – RC (*Rhizophagus clarus*).

Sementes de milho crioulo foram distribuídas, manualmente, a uma distância aproximada de 20 cm em todas as linhas. Após a distribuição, realizou-se o processo de adubação nas subparcelas que contavam com esse fator. O processo de inoculação nas linhas foi realizado de forma manual nas subparcelas que receberam esse tratamento. Em cada linha foi distribuído, de maneira uniforme, 500 ml de inóculo de acordo com o tratamento. Após a semeadura, distribuição do adubo e inoculação dos FMAs, todas as linhas foram cobertas com solo, de forma manual, com auxílio de enxadas. Durante o período de crescimento realizou-se uma capina manual para a eliminação de plantas daninhas. Além disso, a lavoura passou por um período de estiagem, que prejudicando o desenvolvimento das plantas.

Em maio de 2012 realizou-se a coleta do experimento, de forma manual. Nessa etapa foram contados o número de plantas por m² e, em seguida, realizar a coleta das espigas. Além disso, 3 amostras de solo e

raízes por subparcela foram retiradas, com auxilio de trado, o mais próximo possível da raiz para determinação da % de colonização micorrízica e contagem do número de esporos, conforme metodologia citada no experimento 1. De cada subparcela, 9 plantas foram escolhidas aleatoriamente e tiveram suas espigas colhidas e armazenadas em sacos plásticos para determinação do número de espigas por parcela. Em seguida efetuou-se, manualmente, a separação dos grãos de milho da espiga, sendo os mesmos acondicionados em sacos de papel e levados a estufa até peso constante para, então, determinar a produtividade em kg ha⁻¹. Após a determinação da produtividade, 100g de cada amostra foram enviadas ao laboratório da Epagri de Caçador/SC, para determinação da quantidade de N, P e K nos grãos.

Os resultados obtidos para número de esporos e % de colonização foram transformados prioritariamente a análise estatística. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do software SAS (SAS, 1999) e submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar o efeito dos tratamentos testados e, quando significativo, as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ($P<0,05$).

4.3 RESULTADOS

a) Experimento 1

Após análise de variância constatou-se que houve diferença significativa entre os momentos de montagem e coleta para a porcentagem de colonização. Os valores de PIM obtidos na coleta para o tratamento RC foram 2,5 vezes superiores aos encontrados no momento da montagem. Em contrapartida, o tratamento SN não apresentou diferenças estatísticas entre os dois momentos, conforme dados expostos na tabela 4, a seguir.

Tabela 4 – Potencial infectivo médio (PIM), obtido através da % de colonização radicular

Tratamentos	% Colonização Radicular	
	Montagem	Coleta
Experimento 1 - aveia		
RC*	7,03± 5,6b**	17,60±3,22a
SN	27,14±3,38a	32,40±4,87a

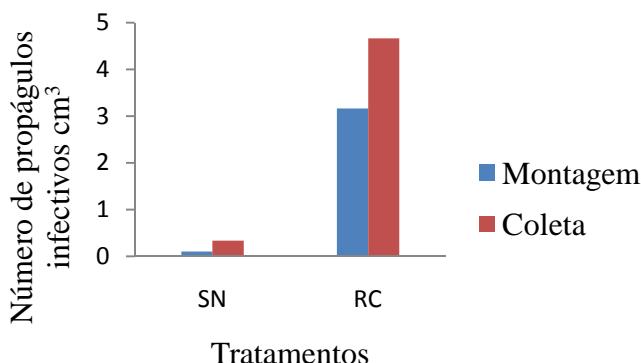
Fonte: O Autor (2013)

Notas: *RC: inóculo de *Rhizophagus clarus*; SN: inóculo nativo multiplicado.

**Médias seguidas pela mesma letra dentro da linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 95 % de confiabilidade.

Em relação às análises do número de propágulos infectivos (NMP), observou-se que ocorreu, também, um aumento entre os momentos montagem e coleta do inóculo. O tratamento SN apresentou um acréscimo de 70% no valor do NMP encontrado no momento da coleta em relação ao momento da montagem. Para o tratamento RC o momento da coleta apresentou um valor de NMP 32% superior ao momento montagem. É possível ter melhor visualização destes dados por meio do gráfico 2, exposto a seguir.

Gráfico 2 – Número mais provável (NMP) de propágulos infectivos obtidos nos momentos de montagem e coleta do experimento 1



Fonte: O Autor (2013)

Os resultados da avaliação da porcentagem de colonização, número de esporos e número de esporos nativos encontrados em raízes de aveia preta (*Avena stringosa L.*) demonstram que o tratamento RC apresentou porcentagem de colonização radicular superior ao tratamento SN. Em relação ao número de esporos em 100ml de solo, foram encontrados aproximadamente 538 esporos de *R. clarus* no tratamento RC e 14 de *R. clarus* no tratamento SN. Contudo, os valores obtidos para número de esporos nativos no tratamento SN foram estatisticamente superiores ao tratamento RC. Tais dados encontram-se expostos na tabela 5.

Tabela 5 – Porcentagem de colonização, número esporos e número de esporos nativos no experimento 1

Experimento 1	RC	SN
Colonização mic. (%)	$34,74 \pm 1,53a^*$	$20,84 \pm 6,32b$
Nº esporos (100ml)	$537,18 \pm 36,25a$	$14,2 \pm 4,01b$
Nº esporos nativos (100ml)	$230,10 \pm 22,2b$	$284,9 \pm 13,01a$

Fonte: O Autor (2013)

Nota: Médias seguidas pela mesma letra dentro da linha não diferem estatisticamente pelo teste de tukey a 95 % de confiabilidade

b) Experimento 2

A análise de variância do experimento de teste de inóculo produzido *on farm* na cultura de milho (tabela 6) revelou que não houve interação entre os tratamentos testados para número de plantas, concentração de N, P e K nos grãos, número de esporos no solo e porcentagem de colonização micorrízica nas raízes de milho. Entretanto foram encontradas interações para número de espigas e produtividade, sendo aplicado o teste de Tukey 95% de confiabilidade para comparação das médias.

Tabela 6 - Análise de variância do experimento 2

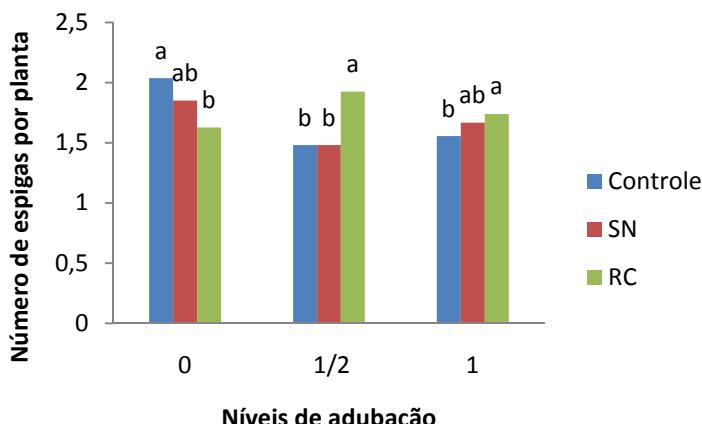
Itens analisados	GL	F	P
Número de Plantas			
Bloco	2	3.1942	0.0680
Fungo (FMA)	2	0.041495	0.9595
Adubação	2	0.79282	0.4696
Adubação x Fungo (FMA)	4	0.4258	0.7878

Número de espigas			
Bloco	2	3.8683	0.0426
Fungo (FMA)	2	2.7549	0.0933
Adubação	2	5.2521	0.0176
Adubação x Fungo (FMA)	4	4.0468	0.0187
Produtividade			
Bloco	2	0.58427	0.5690
Fungo (FMA)	2	13.43	0.0003
Adubação	2	0.45932	0.6390
Adubação x Fungo (FMA)	4	0.70532	0.5998
Concentração de N			
Bloco	2	2.2403	0.1387
Fungo (FMA)	2	2.2307	0.1398
Adubação	2	1.8621	0.1875
Adubação x Fungo (FMA)	4	1.0672	0.4048
Concentração de P			
Bloco	2	2.5722	0.1075
Fungo (FMA)	2	2.9329	0.0821
Adubação	2	0.60886	0.5561
Adubação x Fungo (FMA)	4	0.19494	0.9375
Concentração de K			
Bloco	2	0.015508	0.9846
Fungo (FMA)	2	0.83966	0.4500
Adubação	2	3.5514	0.0529
Adubação x Fungo (FMA)	4	1.3016	0.3113
Número de esporos			
Bloco	2	0.78602	0.4725
Fungo (FMA)	2	0.50898	0.6105
Adubação	2	0.20708	0.8151
Adubação x Fungo (FMA)	4	1.3951	0.2802
% de colonização radicular			
Bloco	2	6.432	0.0089
Fungo (FMA)	2	0.38114	0.6891
Adubação	2	0.0051638	0.9949
Adubação x Fungo (FMA)	4	0.94301	0.4645

Fonte: O Autor (2013)

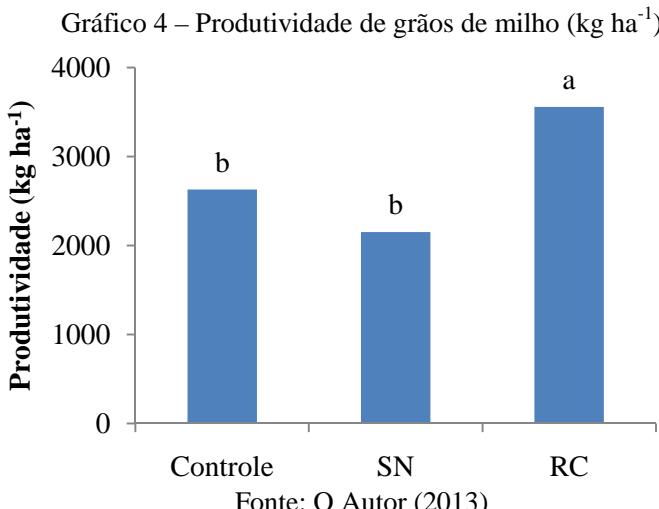
O número de espigas produzidas por plantas variou de acordo com o nível de adubação utilizado, conforme apresentado no gráfico 3, sendo que no nível 0 o tratamento Controle apresentou maiores valores quando comparado com os tratamentos RC. Contudo, no nível de adubação $\frac{1}{2}$, os valores obtidos demonstram que o tratamento RC apresentou resultados estatisticamente superiores aos demais e no nível de adubação 1, constatou-se que o tratamento RC também apresentou o maior número de espigas, porém, esse diferiu estatisticamente somente do tratamento Controle. Tais análises podem ser melhor visualizadas por meio do gráfico 3.

Gráfico 3 – Número de espigas produzidas por planta



Fonte: O Autor (2013)

O parâmetro produtividade (kg ha^{-1}) foi afetado somente pelo fator inóculo utilizado no experimento. O tratamento RC foi estatisticamente superior aos demais, sendo que a produtividade média alcançada foi de aproximadamente 3.600 kg ha^{-1} , enquanto que a produtividade dos tratamentos SN e Controle foi de aproximadamente 2.150 kg ha^{-1} e 2.628 kg ha^{-1} , respectivamente, conforme gráfico 4, abaixo.



4.4 DISCUSSÃO

O método testado nesse experimento visa contribuir na obtenção de um protocolo que garanta a produção de inoculantes *on farm* e que possam ser utilizados em larga escala em culturas agrícolas e florestais, de forma a garantir alto número de propágulos infectivos, garantindo, assim, um inoculante eficiente para uso em escala comercial.

Os dados obtidos nos experimentos 1 demonstram que a metodologia de produção *on farm* testada foi eficiente no aumento dos valores de PIM e NMP verificados entre a montagem e a coleta do experimento com todos os tratamentos testados. A avaliação do potencial de inóculo micorrízico realizada pelos bioensaios de potencial infectivo médio (PIM) e número mais provável de propágulos infectivos (NMP), demonstrou que os valores obtidos na coleta para PIM no experimento 1 variaram de 17,6 a 32,4%. Douds et al. (2010) obtiveram resultados semelhantes e relatam que a adição de vermiculita, perlita ou resíduos pobres em nutrientes são essenciais a substratos que apresentam grandes quantidade de P, fazendo com que ocorra a diluição na disponibilidade desse nutriente. Douds et. al., (2005; 2006) verificaram que a produção de inoculante *on farm* em substrato com grande disponibilidade de P tende a diminuir o efeito da colonização micorrízica nas raízes das plantas hospedeiras.

Assim sendo, substratos com baixa disponibilidade de P devem ser, preferencialmente, utilizados frente a materiais com alta disponibilidade, oriundos, principalmente, de compostos orgânicos, por exemplo. Em contrapartida, Gaur; Adholeya (2002) e Ma et. al. (2007) verificaram que substratos com baixa quantidade de nutrientes podem inibir a simbiose, necessitando da adição de compostos orgânicos ou outros substratos. No presente estudo, embora não se tenha quantificado a disponibilidade de P nos substratos utilizados, a diluição dos mesmos com vermiculita pode ter reduzido a disponibilidade de P para as plantas, o que pode ter contribuído para o aumento da colonização radicular.

Em relação ao NMP, os valores obtidos para esse bioensaio demonstram que no experimento realizado houve um aumento significativo no número de propágulos infectivos entre a montagem e a coleta do inoculante. A inoculação no momento do plantio proporcionou valores de 58,3 propágulos infectivos cm^3 de solo. Douds et al. (2010) verificaram que o número de propágulos infectivos foi influenciado pelas diluições de P existentes no substrato, sendo que doses muito elevadas ou muito baixas de P ocasionaram redução nos valores de propágulos. Nesse experimento o substrato utilizado foi composto de solo nativo diluído com vermiculita na proporção de 1:1, estratégia essa utilizada para diminuir a quantidade de P disponível no solo e que se mostrou eficiente, causando aumento no número de propágulos.

A utilização do tratamento RC proporcionou uma inibição no número de esporos nativos frente ao resultado obtido no tratamento SN. Os valores de número de esporos de *R. clarus* obtidos no tratamento RC foi superior a 5 esporos g solo^{-1} . A adição de *R. clarus* fez com que houvesse um aumento de 70% na porcentagem de colonização micorrízica radicular frente ao tratamento que multiplicou os FMAs nativos. O número de esporos obtidos nesses experimentos foi inferior ao obtido por Dood et al. (1990), que encontraram valores entre 180 e 280 cm^3 solo para todos os FMAs testados. A planta hospedeira aqui utilizada apresentou alta capacidade de ser colonizada e, consequentemente, promover o crescimento e a esporulação dos FMAs, fatores esses preponderantes na escolha da espécie hospedeira (DALPÉ; MONREAL, 2004).

O inoculante produzido apresentou características positivas relacionadas a facilidade na sua multiplicação, a quantidade de potencial micorrízico obtido e, também, a aplicabilidade a campo. Essas características são essenciais quando se fala em qualidade de inoculante,

principalmente quando se pretende utilizar inoculante de FMA em grande escala nos setores agrícolas e florestais. Além disso, esse método de multiplicação pode ser aplicado em qualquer propriedade, pois os insumos necessários estão disponíveis em qualquer local, desde que se opte pela multiplicação de FMAs nativos. Contudo, quando se busca a multiplicação de isolados puros, há necessidade de fornecedores de culturas puras, tornando-se um fator dificultador longe de grandes laboratórios e universidades.

Os resultados obtidos nessa pesquisa revelam que não houve interação para as variáveis número de plantas, concentração de N, P e K nos grãos, número de esporos e porcentagem de colonização na cultura do milho. Vários fatores relacionados a planta, ao solo e aos FMAs podem estar relacionados a esse resultado, porém, não foram realizados estudos acerca deles.

Mesmo não diferindo dos tratamentos SN e RC, a baixa esporulação e colonização do tratamento controle já eram esperadas. Antes do plantio do milho a área utilizada apresentava baixa quantidade de espécies vegetais devido a limpeza e capina, fato esse que pode ter contribuído para a diminuição da população de FMAs nativos e, consequentemente, menor esporulação e colonização dos FMAs. Karasawa; Kasahara; Takebe (2002) explicam que a multiplicação de FMAs depende da planta hospedeira e que a densidade de esporos diminui após o cultivo de plantas não hospedeiras e em áreas sem vegetação. Sob condições adversas de clima, temperatura e solo, a colonização e a esporulação são cruciais para a sobrevivência de FMAs, necessitando, para isso, de plantas hospedeiras (HART; READER, 2002). Entretanto, esperava-se que houvesse um aumento nos valores de esporulação com a aplicação do tratamento RC, visto que o inóculo apresentou valores altos de NMP e PIM.

Poucos estudos foram realizados avaliando os inoculantes produzidos pelo método *on farm* em culturas de interesse agrícola em condições a campo, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos com a cultura do milho, principalmente na variável produtividade. Este trabalho é o primeiro a ser realizado avaliando fatores de produtividade de milho (*Zea mays* L.) quando submetido ao uso de inoculantes de FMA produzidos no método *on farm*. Os dados relacionados à produtividade indicam que a utilização do tratamento RC proporcionou um incremento em produtividade superior a 1000Kg de grãos quando comparado ao tratamento SN. Esses valores demonstram que a adição da espécie *R. clarus* à comunidade nativa de FMA no momento da

produção do inoculante *on farm*, pode ter sido uns dos fatores responsáveis por esse resultado.

Utilizando uma metodologia semelhante, Douds e Reider (2003) verificaram um aumento de 34% no rendimento de pimenta (*Capsicum. annuum* cv. Camelot) quando inoculadas com inóculo *on farm*. Douds et al. (2012) relatam que em alta disponibilidade de P no solo (129mg kg⁻¹) o rendimento de *Capsicum annuum* foi menor ao relatado por Douds; Reider (2003). Esta metodologia também foi testada para pensacola e morangos, demonstrando aumento de produtividade para ambas (DOODS et al., 2007; DOODS et al., 2008b). A utilização de inóculo *on farm* também proporcionou aumento de produtividade em mandioca (DOODS, 1990a, b), tomate (ABDEL-LATEF; CHAOXING, 2011), batata (DUFFY; CASSELLS, 2000) e cebola (SHARMA; ADHOLEYA, 2012).

A metodologia *on farm* ainda não está completamente consolidada, sendo que grande parte das pesquisas buscam elucidar questões relacionadas à porcentagem de colonização, número de propágulos infectivos e de esporos em diferentes substratos (MUTHUKUMAR; UDAIYAN, 2002; DOODS; REIDER, 2003; SHARMA et al., 2005; GAUR; ADHOLEYA, 2005; DOODS et al. 2005, 2006). As principais qualidades buscadas em inoculantes micorrízicos estão relacionadas com a alta concentração de propágulos infectivos e com a capacidade que esses possuem de colonizar as raízes de plantas hospedeiras, proporcionando maior absorção de nutrientes e, consequentemente, maior produtividade. Os resultados relatados acima indicam que a multiplicação pelo método *on farm* garante aumento no potencial de inóculo micorrízico dos inoculantes, podendo garantir maior eficiência no processo simbiótico. Quanto maior o potencial de inóculo micorrízico, maiores serão as chances de ocorrer colonização nas plantas hospedeiras, aumentando, assim, a possibilidade de crescimento devido a maior área de exploração do solo e, consequetemente, maior absorção de nutrientes.

A utilização da metodologia *on farm* em culturas de interesse agrícola é uma técnica promissora, de fácil aplicabilidade e que pode reduzir o uso de fertilizantes químicos, tornando o processo produtivo mais sustentável. Além disso, é uma técnica simples, prática e funcional na multiplicação de FMAs. De acordo com Sharma; Adholeya (2012), o método *on farm* é o mais adequado para a produção de inóculo, pois o agricultor pode realizá-lo dentro de sua própria propriedade. Novos estudos devem ser realizados para climas subtropicais com o intuito de

verificar a real eficácia dessa metodologia de produção, bem como seus efeitos nos sistemas produtivos.

4.5 CONCLUSÕES

- ✓ O método proposto de produção de inoculante micorrízico *on farm* foi eficiente para aumentar o potencial de inóculo micorrízico, embora os valores não possam ser caracterizados como produção massal de inoculante.
- ✓ O método *on farm* apresentado é funcional , prático e de fácil aplicabilidade para o produtor, podendo ser utilizado para a produção em grande escala de inoculante micorrízicos.
- ✓ O uso do inoculante micorrízico *on farm* em uma cultura extensiva demonstrou ser eficiente para aumentar a produtividade e reduzir o uso de adubos, diminuindo, assim, os custos de produção para o agricultor.

5 CAPÍTULO III - INOCULAÇÃO DE SOLUBILIZADORES FOSFATO E FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM GOIABA SERRANA E TUCANEIRA

Resumo

A utilização de microrganismos do solo vem ocorrendo constantemente nos processos de estabelecimento de espécies vegetais para a recuperação de áreas degradadas. Este trabalho tem como objetivo verificar a resposta de duas espécies florestais. O mesmo foi realizado em 3 etapas, sendo a primeira e a segunda relacionadas com o isolamento e a multiplicação das bactérias, respectivamente. Nestas duas etapas foram realizadas coletas de solo para isolamento de bactérias solubilizadoras em 6 áreas de nascentes e 6 áreas com florestas na cidade de Laurentino-SC. Após a coleta, foram realizadas diluições seriadas para obtenção de microrganismos e, em seguida, esses foram riscados em placas contendo fosfato de cálcio para obtenção dos solubilizadores de fósforo. A terceira etapa constou de um teste nas espécies florestais *A. sellowiana* e *C. myrianthum*, inoculadas de forma conjunta e isolada com fungo micorrízico arbusculare *R. clarus* e com cinco bactérias solubilizadoras de fosfato, perfazendo um total de 14 tratamentos. As plantas cresceram em casa de vegetação por um período de 90 dias, quando 5 unidades de cada tratamento foram coletadas para averiguação de crescimento e colonização micorrízica. As demais unidades foram encaminhadas para plantio a campo. Mudas de *C. myrianthum* foram plantadas em uma nascente a ser recuperada no município de Laurentino-SC, em um experimento em blocos casualizados, e mudas de *A. sellowiana* foram plantadas em uma área a ser recuperada no município de Urupema-SC, em delineamento de blocos casualizados. Após 1 ano, foram realizadas medições de altura e diâmetro do caule. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, comparados pelo teste de Tukey com 95% de confiabilidade. Os resultados obtidos nas etapas 1 e 2 demonstram que as colônias obtidas apresentaram características morfológicas semelhantes, sendo que foram obtidas 3 isolados de solubilizadores provenientes de área de florestas e 2 de áreas de nascente. Na etapa 3 os dados obtidos demonstram que as espécies *Citharexylum myrianthum* e *Acca sellowiana* apresentaram resultados distintos quanto aos tratamentos testados, sendo que a co-inoculação

Palavras-chave: Solubilizadores de fosfato, micorrizas, recuperação áreas degradadas.

5.1 INTRODUÇÃO

O processo de colonização predominante no território catarinense foi baseado na retirada da floresta para a venda de madeira e implantação de sistemas de lavoura e pecuária que culminou num processo de degradação ambiental em todas as regiões do estado. Estas ações de impacto negativo geram degradação do ambiente edáfico e, consequentemente, comprometem as funções dentro dos sistemas biológicos, interferindo, principalmente, na qualidade do solo (ROVEDDER et al., 2009), que pode ser definida como capacidade deste em desempenhar funções dentro dos ecossistemas, como meio de suporte e desenvolvimento vegetal e animal, atuando ainda em ciclos biogeoquímicos importantes (DORAN; PARKIN 1994).

Dentre os ciclos geoquímicos interligados com a qualidade do solo, importância especial deve ser dada ao ciclo do fósforo, devido a sua dinâmica e relação com o crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais utilizadas no processo de recuperação de áreas degradadas. A indisponibilidade de fósforo para as plantas ocorre na grande maioria dos solos brasileiros, sendo que essa carência está relacionada com a capacidade de fixação do mesmo com partículas minerais e orgânicas do solo e com outros elementos químicos como cálcio, alumínio e ferro (FAGERIA; BALIGAR, 2001), resultando, assim, em baixa disponibilidade desse nutriente para as plantas (NOVAIS; SMYTH, 1999). Estas interações existentes no ciclo do P expõem as plantas a estresses durante o seu ciclo de desenvolvimento (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), diminuindo, dessa forma, o potencial de crescimento de espécies florestais e, consequentemente, o processo de recuperação da área degradada.

Alternativas para suprir essa carência vão desde a adição de adubos fosfatados até a utilização de microrganismos que atuam no ciclo do fósforo. Contudo, práticas de adubação geram custos adicionais com resultados nem sempre proporcionais, fazendo com que práticas de inoculação de microrganismos tornem-se mais atrativas. Os microrganismos do solo desempenham papel essencial no ciclo biogeoquímico do fósforo (P) e na sua disponibilidade para as plantas, mediante processo de solubilização de P inorgânico, por meio de

bactérias e fungos, mineralização de P orgânico, associação entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e a imobilização de P pela biomassa microbiana (PAUL; CLARK, 1996). Entre os microrganismos do solo de importância agrícola e ambiental, atenção especial é dada as bactérias solubilizadoras de fosfato e os fungos micorrízicos arbusculares.

A população de microrganismos solubilizadores de fosfato é representada por bactérias e fungos, sendo que as bactérias podem representar de 1 a 50% e os fungos de 0,5 a 1,0% do total destes microrganismos (KUCEY, 1983). Independente do tipo de solubilizador, a capacidade de solubilização está intimamente relacionada ao tipo e ao manejo do solo (KUCEY, 1983), e com o potencial de reduzir o pH do meio rizosférico pela liberação de ácidos orgânicos e prótons (SOUCHIE et al., 2005; 2006; BARROSO; NAHAS, 2008; GOMES et al., 2010), sendo que a maior proporção desses microrganismos encontra-se metabolicamente mais ativos na rizosfera (VAZQUEZ et al., 2000; BAREA et al., 2005).

Alguns gêneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* e *Erwinia*, foram estudados e apresentaram capacidade de solubilização, o que os tornam úteis em sistemas agrícolas (GOLDSTEIN et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2000; VERMA et al., 2001; GARG et al., 2001). A inoculação de bactérias solubilizadoras de fósforo ou o manejo da população destes microrganismos em culturas agronomicamente importantes, traz grandes benefícios ao desenvolvimento das plantas, melhorando o suprimento de fósforo (SOUCHIE et al., 2005), garantindo, assim, a maior competitividade e sobrevivência das plantas, principalmente em áreas de recuperação, já que as mesmas possuem um baixo aporte de nutrientes.

Concomitante à ação das bactérias, a ação dos FMAs contribui na melhoria das propriedades do solo em ambientes estressados (ORTEGA-LARROCEA et al., 2010), desempenhando um papel importante no crescimento das plantas por meio da absorção de nutrientes, em especial o P, e na agregação do solo (WU et al., 2006; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os FMAs podem auxiliar no crescimento das plantas em solos com baixos teores de P disponível, principalmente por meio das hifas fúngicas, que atuam como extensões radiculares, aumentando, assim, as superfícies de absorção de água e nutrientes (SCHROEDER; JANOS, 2004).

Os FMAs podem aumentar a absorção de fósforo pelas plantas e, quando as plantas são co-inoculadas com FMAs e bactérias

solubilizadoras de fosfato, a atuação do fungo pode aumentar a capacidade de solubilização das bactérias, as quais podem estimular a colonização das raízes pelo fungo (TORO et al., 1997). De acordo com Azcon-Aguilar e Barea (1997), bactérias solubilizadoras de fosfato, como Enterobacter e Bacillus subtilis, podem melhorar os estádios de pré-colonização dos FMAs, enquanto bactérias fixadoras de nitrogênio, como Azotobacter e Rhizobium parecem melhorar a extensão da colonização micorrízica e aumentar o crescimento da planta. Estes estudos demonstram que o processo de co-inoculação de bactérias solubilizadores de fosfatos e FMAs tornam os processos de obtenção de nutrientes, em especial o P, facilitado para as plantas.

O inicio de um programa de seleção de isolados de bactérias solubilizadoras de fosfato e FMAs visando à produção de inoculantes microbianos para uso em plantas de interesse agrícola e ambiental torna-se uma premissa para pesquisas futuras. Dessa forma, esse estudo teve como objetivos isolar e caracterizar morfológicamente microrganismos solubilizadores de fosfato simbóticos e associativos nativos de solos de mata ciliar e áreas degradadas, testar o efeito da co-inoculação de FMAs e bactérias solubilizadores de fosfato nas espécies florestais goiaba serrana (*Acca sellowiana* Berg) e tucaneira (*Citharexylum myrianthum* Cham) e avaliar o efeito do uso dos microrganismos sobre o estabelecimento e crescimento dessas espécies florestais a campo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Área de estudo

O estudo foi realizado no município de Laurentino-SC, pertencente a região do Alto Vale do Itajaí e classificado dentro do Zoneamento Agroecológico (EPAGRI, 1999) como predominantemente rural. Como principais características, apresenta relevo bastante acidentado, estrutura fundiária com predomínio de propriedades rurais com área total inferior a 10ha, com uso de baixo nível tecnológico, predominando a agricultura familiar com plantio de fumo, milho e criação de gado de leite (EPAGRI, 2009; GOVERNO DE LAURENTINO, 2012).

O presente trabalho teve início em outubro de 2010 com a escolha de locais degradados para obtenção de bactérias solubilizadoras de fosfato. Em seguida, 5 nascentes que fornecem água para o município e 5 áreas com remanescente florestal circunvizinhas as nascentes foram escolhidas para amostragem de solo. A escolha das nascentes ocorreu de

acordo com a indicação dos proprietários rurais estarem atuando na melhoria das condições de suas propriedades, principalmente em relação a áreas de nascentes. Dessa forma, a área de estudo contemplou as localidades de Serra Amoado (A1 e F1), Serra Tomio (A2 e F2), Serra Caçador (A3 e F3), Fruteira (A4 e F4) e Centro (A5 e F5), sendo que a letra A representa áreas de nascente e a letra F as áreas de florestas circunvizinhas. O estudo foi realizado em duas etapas distintas, sendo a primeira relacionada à coleta de solo e a segunda com testes em casa de vegetação.

5.2.2 Coleta de solo

Em cada nascente e área circunvizinha de floresta foram realizadas coletas de 6 subamostras de solo, distanciadas em média 1m uma das outras, sendo que as amostras foram retiradas em dois níveis de profundidade com auxílio de trado. Nos 10cm iniciais, as subamostras foram alocadas em sacos plásticos para posterior isolamento de microrganismos e na profundidade de 0 a 20cm as subamostras foram retiradas e alocadas em sacos plásticos para análise das características químicas (pH (H_2O), pH (KCl), Ca, Mg, Al, Na, K, P e N) do solo. As amostras de solo proveniente de nascentes foram catalogadas em A1, A2, A3, A4 e A5, e as amostras de florestas foram catalogadas em F1, F2, F3, F4 e F5, de acordo com a localidade coletada. Dessa forma, cada área de nascente e de floresta possuía 6 subamostras de solo para isolamento de microrganismos, que foram catalogadas de acordo com a nomenclatura da área e com o número da coleta (1, 2, 3, 4, 5 e 6).

Após a coleta das subamostras e alocação em sacos plásticos o material foi acondicionado em caixas de isopor com gelo para manterem-se refrigeradas até o processamento no laboratório. No laboratório, as subamostras foram acondicionadas em câmara seca a 5° C para posterior isolamento dos microrganismos. Para análise das características químicas do solo, um volume de 100ml de cada uma das 6 subamostras de cada área foi homogeneizado e encaminhado para o Laboratório de Análise do Solo do CAV/UDESC.

5.2.3 Pré isolamento dos microrganismos

O isolamento dos microrganismos foi realizado em cada uma das subamostras coletadas. Esse procedimento ocorreu por meio de um processo de diluição seriada, onde 1g de solo de cada subamostra foi diluída em 9ml de água estéril, formando a primeira diluição (10^{-1}). A partir desse ponto retirou-se, sucessivamente, 1ml de cada diluição até obter todas as diluições (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7}). Alíquotas de 0,1ml das diluições foram plaqueadas em meio B de King (KING et al., 1954) a pH 7,0 com o auxílio de uma alça de platina. As placas foram incubadas em BOD a 28° C durante 10 dias. Nesse período verificou-se o aparecimento e o crescimento de colônias de bactérias.

Após o isolamento preliminar, as amostras que não apresentaram crescimento de colônias foram descartadas e as que apresentaram crescimento regular de colônias foram repicadas para placas contendo Meio GL acrescido de fosfato de cálcio, de acordo com a metodologia proposta por Sylvester-Bradley (1982). Para cada litro de meio de cultura, foi preparado 100 mL de solução de CaCl₂ (10%) e 50 mL de solução de K₂HPO₄ (10%), que foram autoclavadas separadamente e adicionadas ao meio GL no momento do uso para formação do fosfato de cálcio. As placas foram incubadas em BOD a 28° C durante 10 dias. Nesse período verificou-se o aparecimento e crescimento de colônias de bactérias e realizada a análise morfológica das colônias quanto a: muco, transparência, cor, tamanho, borda, elevação e crescimento aos três e cinco dias (VINCENT, 1970). A confirmação do isolamento de bactérias com capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi realizada por meio da presença de um halo claro ao redor da colônia. Estas amostras foram então separadas e purificadas para serem utilizadas na produção do inoculante líquido para o crescimento e desenvolvimento das espécies arbóreas goiaba serrana (*Acca sellowiana*) e tucaneira (*Citharexylum myrianthum*). Amostras dessas bactérias também foram enviadas para análise e caracterização molecular (em andamento).

5.2.4 Teste dos solubilizadores de fosfato e dos fungos micorrízicos arbusculares

Os experimentos que contemplaram a co-inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato e FMAs foram desenvolvidos em condições parcialmente controladas (casa de vegetação) no CAV/UDESC para a espécie *Acca sellowiana*, e na BUNGE Alimentos

S.A para a espécie *Citharexylum myrianthum*. O delineamento experimental foi composto por um esquema fatorial de 2 x 7 onde haviam 2 níveis de inoculação (*Rhizophagus clarus* e Controle) e 7 níveis de solubilizadores (5 isolados e 2 misturas (FMA + solubilizadores isolados, FMA + Todos os solubilizadores), perfazendo um total de 14 tratamentos (ver tabela 7). Para cada tratamento haviam 21 repetições, perfazendo, assim, um total de 294 unidades amostrais.

Tabela 7 – Descrição dos 14 tratamentos utilizados na inoculação de goiaba serrana e tucaneira

Tratamento	Descrição
0	Controle – somente o substrato solo e esterco eqüino na proporção de 1:1 (V/V)
1	Substrato + FMA (10%) <i>Rhizophagus clarus</i>
2	Substrato + Todos os solubilizadores (TSF)
3	Substrato + Todos os Solubilizadores (TSF) + FMA
4	Substrato + Solubilizador 1 (SF1) – Amostra (F101 10 ⁻²)
5	Substrato + Solubilizador 2 (SF2) – Amostra (F303 10 ⁻⁶)
6	Substrato + Solubilizador 3 (SF3) – Amostra (A205 10 ⁻⁵)
7	Substrato + Solubilizador 4 (SF4) – Amostra (A303 10 ⁻⁷)
8	Substrato + Solubilizador 5 (SF5) – Amostra (A106 10 ⁻⁷)
9	Substrato + Solubilizador 1 (SF1) – Amostra (F101 10 ⁻²) + FMA
10	Substrato + Solubilizador 2 (SF2) – Amostra (F303 10 ⁻⁶) + FMA
11	Substrato + Solubilizador 3 (SF3) – Amostra (A205 10 ⁻⁵) + FMA
12	Substrato + Solubilizador 4 (SF4) – Amostra (A303 10 ⁻⁷) + FMA
13	Substrato + Solubilizador 5 (SF5) – Amostra (A106 10 ⁻⁷) + FMA

Fonte: O Autor (2013)

Após o crescimento de solubilizadores em meio sólido, os mesmos foram colocados para crescer em meio B de king (líquido) para servirem de inoculante para as espécies florestais tucaneira e goiaba Serrana. Tubetes com capacidade de 200 ml foram preenchidos com substrato (S) composto por solo não estéril e esterco eqüino na

proporção de 1:1 (V/V). Nos tratamentos com presença de FMAs adicionou-se ao substrato (S) uma proporção de 10% do volume total de solo inóculo contendo propágulos de *Rhizophagus clarus* RHN102A proveniente da Coleção Internacional de Cultura de Glomeromycota (CICG, FURB/Blumenau-SC).

Para cada tubete, 3 sementes de goiaba serrana foram colocadas a germinar. Após 35 dias o processo de germinação iniciou e foi deixada somente uma planta por tubete e, neste momento, realizou-se a inoculação das plantas com os solubilizadores de fosfato. Em cada tubete foi adicionado 1ml de meio líquido contendo solubilizadores de fosfato. As plantas cresceram por um período de 6 meses e, após esse período, 5 plantas de cada tratamento foram coletadas e analisadas quanto a altura, biomassa aérea, biomassa radicular e quantidade de P acumulada na parte aérea.

A metodologia adotada para a espécie *Citharexylum myrianthum* foi a mesma da espécie *Acca sellowiana*, diferindo apenas em dois itens que foram: 1) processo de germinação das sementes, pois para a tucaneira as sementes foram postas a germinar em areia estéril e, após a germinação, foram transferidas para tubetes, e 2) Foram avaliados massa de parte aérea seca, massa seca de raiz, % colonização, altura e concentração de P na parte aérea. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do software SAS (SAS, 1999) e submetidos a análise de variância (ANOVA) para verificar o efeito dos tratamentos testados e, quando significativo, as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ($P<0,05$). As plantas restantes foram levadas a campo para verificar o crescimento e a sobrevivência.

O teste a campo foi conduzido em dois locais diferentes visto que as espécies florestais testadas apresentam características distintas quanto a distribuição geográfica. Mudas de *C. myrianthum* foram levadas a campo no município de Laurentino-SC, em uma propriedade rural cuja área da nascente encontrava-se degradada. Anteriormente ao plantio foram realizadas, manualmente, covas com 20 cm de largura e 30 cm de profundidade. O delineamento experimental foi de 4 blocos distribuídos ao acaso e cada bloco contava com 4 mudas de cada tratamento. O espaçamento foi de 3m entre linhas e 2m entre plantas. As mudas de *A. sellowiana* foram levadas a campo no município de Urupema-SC, em uma área a ser recuperada, seguindo a metodologia descrita acima. No momento do plantio cada cova recebeu 100g de fosfato de rocha natural e as mudas foram regadas com água para garantir a sobrevivência. As plantas cresceram a campo durante 6 meses e nesse período houve problema de estiagem na área com *C.*

myrianthumo que obrigou a realização da rega de forma manual. Na área com *A. sellowiana* ocorreram geadas que proporcionaram diminuição do crescimento devido a queima da brotação. Após 6 meses foram realizadas medições de altura e diâmetro das plantas e os dados foram submetidos as análises conforme metodologia descrita para os dados de casa de vegetação.

5.3 RESULTADOS

Os resultados das análises químicas do solo demonstram que a presença de microorganismos solubilizadores de fosfato ocorreu em solos com valores de pH amplamente variáveis (3,8 e 6,2), o que também foi verificado em relação ao nível de P no solo. A quantidade de P no solo da amostra proveniente da nascente 1, amostra (A106 10^{-7}) foi de 0,4 mg dm⁻³, já a quantidade de P no solo da amostra oriunda da nascente 3, amostra (A303 10^{-7}) foi de 49,8 mg dm⁻³. Nos solos de floresta a quantidade de P variou entre 4,7 mg dm⁻³ e 6,5 mg dm⁻³ para as amostras F101 10^{-7} e F303 10^{-6} , respectivamente (dados na tabela 8, abaixo).

Tabela 8 – Análise química do solo coletado nas áreas amostradas do município de Laurentino – SC.

Local	pH (H ₂ O)	Ca	Mg	Al	H+ Al	K	P	CTC	Argila	% MO
Nasc. 1	6,2	5,25	3,06	0,00	2,50	70	0,4	8,49	22	3,0
Nasc. 2	5,3	6,75	2,97	0,28	4,40	148	2,2	10,38	20	2,2
Nasc. 3	4,6	10,7	4,72	0,95	9,70	70	49,8	16,55	22	2,7
Nasc. 4	4,6	4,92	3,31	0,97	9,70	98	0,9	9,45	20	2,6
Nasc. 5	5,1	4,12	2,05	0,16	4,40	101	1,3	10,83	20	2,6
Flor. 1	3,8	10,6	5,97	4,82	24,4	63	4,7	41,13	19	2,9
Flor. 2	4,7	8,00	4,26	0,50	7,70	66	2,4	20,13	19	3,2
Flor. 3	4,1	8,54	5,41	2,29	17,3	110	6,5	31,53	28	2,6
Flor. 4	4,0	7,83	3,86	5,46	17,3	62	2,2	17,31	19	3,8
Flor. 5	5,0	9,43	5,27	1,23	6,90	156	1,5	16,33	26	4,1

Fonte: O Autor (2013)

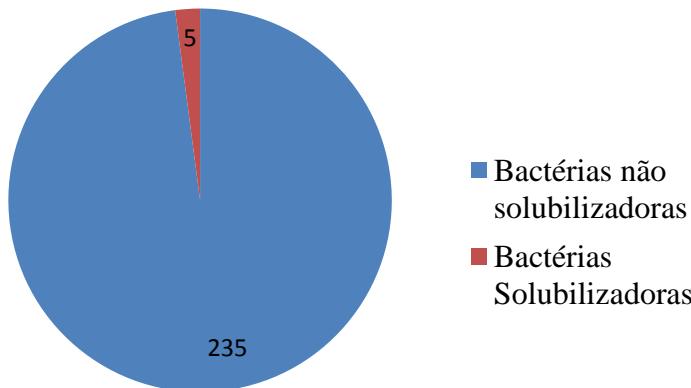
Notas: Nasc. = Nascentes; Flor. = Florestas

*Teores de Ca, Mg, Al, CTC efetiva e H + Al no solo (cmol_c dm⁻³).

**Teores de K e P no solo (mg dm⁻³).

Após a coleta, o processamento das amostras de solo e o isolamento inicial de microorganismos, foram obtidos 240 isolados de microorganismos, passando para a etapa seguinte, onde se obteve cinco placas com microorganismos solubilizadores de fosfato (bactérias), ou seja, somente 2,083% dos microorganismos apresentaram capacidade de solubilizar fosfato, sendo os demais descartados (Gráfico 5). As cinco placas que apresentaram solubilizadores tiveram seus microorganismos repassados para meio GL acrescido de fosfato de cálcio, com a finalidade de analisar as características morfológicas das colônias.

Gráfico 5 – Número de bactérias solubilizadoras isoladas das áreas de nascente e de florestas no município de Laurentino/SC



Fonte: O Autor (2013)

Em relação às análises morfo-fisiológicas, algumas características predominaram frente às demais. Todas as colônias apresentaram crescimento rápido, formato circular, borda lisa e a mesma quantidade de muco. O início do crescimento pode ser observado no 2º dia, quando as colônias já apresentavam 2 mm de crescimento, e continuaram crescendo até o 7º dia de avaliação, com exceção da amostra A205 10^{-5} que não apresentou crescimento da colônia, permanecendo com 2 mm desde o 3º ao 7º dia de avaliação (dados apresentados na tabela 9, abaixo).

Referente a elevação, somente a colônia proveniente da amostra A303 10^{-7} apresentou elevação achatada, as demais apresentaram elevação cupular. Duas amostras, F303 10^{-6} e A205 10^{-5} , quando avaliadas sob o aspecto transparência, apresentaram-se opacas, sendo que nas demais se observou transparência translúcida. No tocante a análise de cor, todas as colônias apresentaram coloração branca, porém, a amostra F303 10^{-6} teve sua coloração alterada de branca para rosada ao 7º dia de crescimento, conforme dados apresentados na talbela 9, a seguir.

Tabela 9 - Caracterização morfo-fisiológica das bactérias solubilizadoras de fosfato oriundas das amostras de solo do município de Laurentino – SC

Características morfo-fisiológicas observadas											
Diluições	Muco	Transparência	Cor	3º dia (mm)	5ºdia (mm)	7º dia (mm)	Borda	Elevação	Crescmt.	Formato	Contagem de células
A106 10^{-7}	2	Translúcida	Branca	3	3	4	Lisa	Cupular	Rápido	Circular	$5,3248 \times 10^8$
A205 10^{-5}	2	Opaca	Branca	2	2	2	Lisa	Cupular	Rápido	Circular	$8,5196 \times 10^8$
A303 10^{-7}	2	Translúcida	Branca	3	3	4	Lisa	Achatada	Rápido	Circular	$6,1440 \times 10^8$
F101 10^{-7}	2	Translúcida	Branca	2	2	3	Lisa	Cupular	Rápido	Circular	$6,3897 \times 10^8$
F303 10^{-6}	2	Opaca	Branca/ Rosada*	2	2	4	Lisa	Cupular	Rápido	Circular	$7,4752 \times 10^8$

Fonte: O Autor (2013)

Nota: *Mudança de cor ao 7º dia.

Referentes aos trabalhos realizados em casa de vegetação e a campo com as espécies *C. myrianthum* e *A. sellowiana*, é possível destacar dados de extrema relevância. Devido ao grande número de tratamentos resultantes das combinações os resultados obtidos foram analisados por meio de contrastes. Para a espécie tucaneira, os contrastes realizados mostram que quando comparados àqueles contendo somente solubilizadores de fosfato (SF) com os tratamentos contendo solubilizadores de fosfatos adicionados a fungos micorrízicos arbusculares (FMA), a resposta em crescimento das plantas é variável. O contraste (C4) indica que plantas inoculadas com o tratamento SF4 + FMA apresentaram valores estatisticamente superiores de massa da parte aérea seca do que plantas que continham somente o tratamento SF4. Por outro lado, o contraste (C1) demonstra que plantas que continham somente o tratamento SF1 apresentaram biomassa de parte aérea seca superior estatisticamente ao tratamento contendo SF1 + FMA. Os resultados encontrados para a massa da parte aérea seca (g) das duas espécies são apresentados na tabela 10, a seguir.

Tabela 10 - Massa de parte aérea seca (MPAS, g) das espécies tucaneira goiaba serrana após 180 dias de cultivo

Contraste	Tucaneira		Goiaba serrana	
	Estimativa	Valor de Pr>f	Estimativa	Valor de Pr>f
C1: T ₄ - T ₉ *	1,08	0,0061	-1,39	0,0002
C2: T ₅ - T ₁₀	-0,102	0,7886	-1,62	<,0001
C3: T ₆ - T ₁₁	0,412	0,2812	-0,72	0,0462
C4: T ₇ - T ₁₂	-0,762	0,049	-1,11	0,0028
C5: T ₈ - T ₁₃	0,542	0,1579	-1,03	0,0050
C6: T ₂ - T ₄	-0,526	0,1703	0,99	0,0072
C7: T ₂ - T ₅	1,198	0,0025	1,05	0,0044
C8: T ₂ - T ₆	1,098	0,0053	0,65	0,0726
C9: T ₂ - T ₇	1,814	<,0001	0,89	0,0149
C10: T ₂ - T ₈	1,016	0,0096	0,41	0,2541
C11: T ₃ - T ₉	-0,624	0,105	-2,04	<,0001
C12: T ₃ - T ₁₀	-0,082	0,8293	-2,20	<,0001
C13: T ₃ - T ₁₁	0,332	0,3844	-1,71	<,0001
C14: T ₃ - T ₁₂	0,353	0,7406	-1,85	<,0001
C15: T ₃ - T ₁₃	0,38	0,3199	-2,26	<,0001
C16: 3T ₀ - T ₁ - T ₂ - T ₃	1,684	0,0748	-2,06	0,0209
C17: 5T ₀ - T ₄ - T ₅ - T ₆ - T ₇ - T ₈	3,42	0,0233	-4,59	0,0015
C18: 5T ₀ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	4,59	0,0028	-10,46	<,0001
C19: 5T ₁ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	-0,3	0,8387	-9,12	<,0001

Fonte: O Autor (2013)

Notas: Tratamentos: T₀: Controle, T₁ Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA), T₂: Todos os Solubilizadores de Fosfato (TSF), T₃: TSF + FMA, T₄: Solubilizador de Fosfato (SF1), T₅: SF2, T₆: SF3, T₇: SF4, T₈: SF5, T₉: SF1+ FMA, T₁₀: SF2 + FMA, T₁₁: SF3 + FMA, T₁₂: SF4 + FMA e T₁₃: SF5 + FMA.

Os resultados obtidos por meio dos contrastes para a espécie *A. sellowiana* demonstram que a união de todos os solubilizadores (T2) proporcionou incremento na massa de parte aérea seca quando

comparados com os tratamentos que continham os solubilizadores de fosfato de forma isolada (T4, T5, T6 e T7). Os dados indicam que os tratamentos contendo solubilizadores de fosfato acrescidos de FMAs (T9, T10, T11, T12 e T13) foram superiores a todos os demais tratamentos nesse mesmo parâmetro.

Em relação a massa seca de raiz, verificou-se que para a espécie tucaneira houve diferença significativa somente nos contrastes C8 e C9, sendo que nesses dois casos o tratamento T2 foi significativamente maior do que os tratamentos T6 e T7 (tabela 11). Todos os demais contrastes não apresentaram diferenças significativas nesse parâmetro.

Para goiaba serrana observou-se que os tratamentos T9, T10, T11, T21 e T13 foram estatisticamente superiores aos tratamentos T0, T1 e T3, demonstrando, assim, a eficiência da coinoculação de FMA e solubilizadores em relação a ação isolada dos mesmos na promoção da massa seca de raiz. O mesmo resultado ocorreu nos contrastes C2 e C4. Para esse parâmetro não foram encontradas diferenças significativas entre os contrastes na comparação do tratamento T0 com os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7 e T8 e, também, não foram observadas diferenças na comparação do tratamento T2 com os tratamentos T4, T5, T6, T7 e T8, sendo que todos estes dados se apresentam na tabela 11, a seguir.

Tabela 11 - Massa de raiz seca (MRS, g) das espécies tucaneira e goiaba serrana após 180 dias de cultivo

Contraste	Tucaneira		Goiaba serrana	
	Estimativa	Valor de Pr>f	Estimativa	Valor de Pr>f
C1: T ₄ - T ₉ *	0,10	0,6793	-0,216	0,0676
C2: T ₅ - T ₁₀	-0,24	0,3469	-0,356	0,0033
C3: T ₆ - T ₁₁	0,14	0,5651	-0,044	0,7056
C4: T ₇ - T ₁₂	-0,16	0,5332	-0,33	0,0061
C5: T ₈ - T ₁₃	0,29	0,2553	-0,208	0,0780
C6: T ₂ - T ₄	0,07	0,7715	0,12	0,3048
C7: T ₂ - T ₅	0,49	0,0558	0,206	0,0809
C8: T ₂ - T ₆	0,52	0,0397	0,054	0,6430
C9: T ₂ - T ₇	0,69	0,0074	0,22	0,0628
C10: T ₂ - T ₈	0,27	0,2825	0,052	0,6553
C11: T ₃ - T ₉	-0,42	0,0954	-0,44	0,0004
C12: T ₃ - T ₁₀	-0,35	0,1674	-0,494	<,0001
C13: T ₃ - T ₁₁	0,07	0,7795	-0,334	0,0056
C14: T ₃ - T ₁₂	-0,02	0,8041	-0,454	0,0002
C15: T ₃ - T ₁₃	-0,04	0,8666	-0,5	<,0001
C16: 3T ₀ - T ₁ - T ₂ - T ₃	0,66	0,2820	-0,312	0,2764
C17: 5T ₀ - T ₄ - T ₅ - T ₆ - T ₇ - T ₈	1,73	0,0772	-0,898	0,0502
C18: 5T ₀ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	1,88	0,0566	-2,052	<,0001
C19: 5T ₁ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	0,94	0,3356	-1,872	0,0001

Fonte: O Autor (2013)

Notas: Tratamentos: T₀: Controle, T₁ Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA), T₂: Todos os Solubilizadores de Fosfato (TSF), T₃: TSF + FMA, T₄: Solubilizador de Fosfato (SF1), T₅: SF2, T₆: SF3, T₇: SF4, T₈: SF5, T₉: SF1+ FMA, T₁₀: SF2 + FMA, T₁₁: SF3 + FMA, T₁₂: SF4 + FMA e T₁₃: SF5 + FMA.

Para a tucaneira os contrastes demonstraram que o tratamento controle (T0) foi estatisticamente superior a todos os demais no

crescimento em altura. Na comparação entre os tratamentos que continham somente SF com os que continham SF + FMA, observou-se que a altura do tratamento T12, que continha SF + FMA, foi significativamente superior a altura do que continha somente SF. Em contrapartida, os tratamentos T4, T6 e T8 que continham somente SF foram estatisticamente superiores aos T9, T11 e T13, que continham os mesmos SF adicionados de FMA. A adição conjunta de todos os SF (T2) proporcionou resultados estatisticamente superiores para altura do que a adição isolada dos solubilizadores, com exceção ao tratamento T4 que não diferiu do T2. Em relação aos contrastes realizados com o tratamento T3 (TSF + FMA), observou-se que este foi superior aos T11 e T13 para o parâmetro altura.

Já para a goiaba serrana, verificou-se que o tratamento T2 apresentou valores superiores para altura quando comparado de forma isolada aos tratamentos T4, T5, T6, T7 e T8, demonstrando que a inoculação conjunta de todos os solubilizadores produz resultados no crescimento maiores do que a inoculação dos solubilizadores de forma isolada. Na comparação realizada entre os tratamentos que continham solubilizadores de forma isolada com os que continham solubilizadores acrescidos de FMA, percebeu-se que a adição de inóculo de FMA (tratamentos T9, T10 e T11) garantiu maior crescimento em altura do que os que continham somente os solubilizadores (T4, T5 e T6). Os contrastes demonstraram, também, que os tratamentos que continham solubilizadores de fosfatos acrescidos de FMAs (T9, T10, T11, T12 e T13) foram superiores estatisticamente aos T0, T1 e T3 para altura. Ressalta-se, ainda, que o tratamento controle T0 foi significativamente inferior a todos os demais tratamentos. Todos os dados relativos aos tratamentos da tucaneira e da goiaba serrana estão expostos na tabela 12, a seguir.

Tabela 12 - Altura (cm) das espécies tucaneira e goiaba serrana após 180 dias de cultivo

Contraste	Tucaneira		Goiaba serrana	
	Estimativa	Valor de Pr>f	Estimativa	Valor de Pr>f
C1: T ₄ - T ₉ *	9,82	0,0005	-6,84	0,0170
C2: T ₅ - T ₁₀	-4,78	0,0789	-14,76	<,0001
C3: T ₆ - T ₁₁	6,66	0,0156	-8,78	0,0026
C4: T ₇ - T ₁₂	-8,2	0,0033	-4,46	0,1145
C5: T ₈ - T ₁₃	8,04	0,0039	-0,46	0,8692
C6: T ₂ - T ₄	-2,52	0,3495	6,14	0,0314
C7: T ₂ - T ₅	12,24	<,0001	13,82	<,0001
C8: T ₂ - T ₆	6,54	0,0175	10,36	0,0005
C9: T ₂ - T ₇	19,38	<,0001	7,14	0,0130
C10: T ₂ - T ₈	7,22	0,0091	6,68	0,0197
C11: T ₃ - T ₉	-0,5	0,8522	-17,84	<,0001
C12: T ₃ - T ₁₀	-0,34	0,8992	-18,08	<,0001
C13: T ₃ - T ₁₁	5,4	0,0480	-15,56	<,0001
C14: T ₃ - T ₁₂	-1,72	0,2110	-14,46	<,0001
C15: T ₃ - T ₁₃	7,46	0,0071	-10,92	0,0002
C16: 3T ₀ - T ₁ - T ₂ - T ₃	21,42	0,0018	-23,12	0,0013
C17: 5T ₀ - T ₄ - T ₅ - T ₆ - T ₇ - T ₈	50,96	<,0001	-44,46	0,0001
C18: 5T ₀ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	62,5	<,0001	-79,76	<,0001
C19: 5T ₁ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	10,6	0,3099	-55,66	<,0001

Fonte: O Autor (2013)

Notas: Tratamentos: T₀: Controle, T₁ Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA), T₂: Todos os Solubilizadores de Fosfato (TSF), T₃: TSF + FMA, T₄: Solubilizador de Fosfato (SF1), T₅: SF2, T₆: SF3, T₇: SF4, T₈: SF5, T₉: SF1+ FMA, T₁₀: SF2 + FMA, T₁₁: SF3 + FMA, T₁₂: SF4 + FMA e T₁₃: SF5 + FMA.

Para concentração de P, os contrastes demonstraram que a quantidade de P acumulada na parte aérea de plantas de tucaneira,

inoculadas com o tratamento T12 (SF4 + FMA) foram superiores estatisticamente aos valores obtidos para o tratamento T7, que continha somente o SF4. Além disso, a adição conjunta de todos os solubilizadores com FMA, tratamento T3, proporcionou maior acumulo de P quando comparado aos tratamentos T9, T10 e T11. Todos os demais contrastes não apresentaram diferenças estatísticas.

Os resultados obtidos para *A. sellowiana* demonstram que foram observadas diferenças estatísticas nos contrastes entre os tratamentos T7 e T12, onde o T7 apresentou valores acumulados significativamente superiores ao T12 para concentração de P na parte aérea. O contraste C19 demonstrou que a utilização isolada de FMA (T1) promoveu maior concentração de P na parte aérea do que a utilização conjunta de FMA com solubilizadores de fosfato (T9, T10, T11, T12 e T13). Os dados mencionados encontram-se expostos na tabela 13, a seguir.

Tabela 13 – Concentração de P na parte aérea das espécies tucaneira e goiaba serrana após 180 dias de cultivo

Contraste	Tucaneira		Goiaba serrana	
	Estimativa	Valor de Pr>f	Estimativa	Valor de Pr>f
C1: T ₄ - T ₉ *	1,10	0,7773	-2,95	0,6199
C2: T ₅ - T ₁₀	-0,66	0,8652	3,24	0,5854
C3: T ₆ - T ₁₁	4,90	0,2129	-3,20	0,5897
C4: T ₇ - T ₁₂	-9,65	0,0161	16,87	0,0060
C5: T ₈ - T ₁₃	-5,19	0,1870	7,99	0,1815
C6: T ₂ - T ₄	5,23	0,1839	-0,55	0,9258
C7: T ₂ - T ₅	3,54	0,3670	-2,32	0,6959
C8: T ₂ - T ₆	-1,62	0,6784	-1,84	0,7564
C9: T ₂ - T ₇	0,48	0,9024	-9,83	0,1015
C10: T ₂ - T ₈	-1,92	0,6242	-3,76	0,5274
C11: T ₃ - T ₉	11,68	0,0040	-3,90	0,5114
C12: T ₃ - T ₁₀	8,21	0,0391	0,52	0,9308
C13: T ₃ - T ₁₁	8,62	0,0307	-5,45	0,3601
C14: T ₃ - T ₁₂	3,24	0,3287	6,63	0,2665
C15: T ₃ - T ₁₃	-1,77	0,6510	3,83	0,5193
C16: 3T ₀ - T ₁ - T ₂ - T ₃	0,41	0,9662	-7,62	0,6003
C17: 5T ₀ - T ₄ - T ₅ - T ₆ - T ₇ - T ₈	22,65	0,1381	-17,02	0,4601
C18: 5T ₀ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	13,15	0,3862	4,94	0,8300
C19: 5T ₁ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	18,30	0,2292	47,66	0,0418

Fonte: O Autor (2013)

Notas: Tratamentos: T₀: Controle, T₁ Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA), T₂: Todos os Solubilizadores de Fosfato (TSF), T₃: TSF + FMA, T₄: Solubilizador de Fosfato (SF1), T₅: SF2, T₆: SF3, T₇: SF4, T₈: SF5, T₉: SF1+ FMA, T₁₀: SF2 + FMA, T₁₁: SF3 + FMA, T₁₂: SF4 + FMA e T₁₃: SF5 + FMA.

Os dados obtidos sobre o parâmetro % de colonização radicular são apresentados na tabela 14. Cabe ressaltar que, como o solo não foi

esterilizado, os resultados podem ter sido influenciados pela comunidade nativa de fungos micorrízicos arbusculares. Para a tucaneira, na comparação entre o tratamento T5 e T10 verificou-se que o T5 (SF2) apresentou significativamente maior % de colonização radicular do que o tratamento T10 (SF2 + FMA). Por outro lado, o contraste obtido entre os tratamentos T7 – T12 demonstrou que o T12 (SF4 + FMA) proporcionou, estatisticamente, maior colonização das raízes do que o T7 (SF4). Os contrastes indicam, também, que o tratamento T3 (TSF + FMA) foi estatisticamente superior aos que continham os solubilizadores de forma isolada adicionados com FMA (T9, T10, T11 e T13), com exceção do tratamento T12 que foi significativamente superior ao tratamento T3 para % de colonização.

Para *A. sellowiana*, o contraste realizado entre os tratamentos que continham somente solubilizadores com os que continham solubilizadores acrescidos a FMAs, demonstram que os tratamentos T4, T6 e T7 apresentaram valores de colonização radicular superiores aos T9, T11 e T12, respectivamente. A união de todos os solubilizadores (T2) apresentou menores valores de colonização em relação aos tratamentos que continham os solubilizadores de forma isolada na % de colonização. Na comparação entre o tratamento T3 com os T9, T10, T11, T12 e T13, de forma isolada, verificou-se que o T3 apresentou valores superiores de % de colonização em comparação aos demais. Ainda para a *A. sellowiana*, os tratamentos controle (T0) e SF (T1) apresentaram maiores valores de colonização quando comparados com os tratamentos de coinoculação.

Tabela 14 – Porcentagem de colonização radicular de tucaneira e goiaba serrana após 180 dias de cultivo

Tucaneira		Goiaba serrana		
Contraste	Estimativa	Valor de Pr>f	Estimativa	Valor de Pr>f
C1: T ₄ - T ₉ *	1,45	0,8106	23,68	<,0001
C2: T ₅ - T ₁₀	18,88	0,0027	4,974	0,1540
C3: T ₆ - T ₁₁	-7,42	0,2215	26,17	<,0001
C4: T ₇ - T ₁₂	-12,23	0,0464	21,354	<,0001
C5: T ₈ - T ₁₃	-3,82	0,5272	-2,338	0,4998
C6: T ₂ - T ₄	-2,72	0,6525	-40,264	<,0001
C7: T ₂ - T ₅	-22,96	0,0003	-22,546	<,0001
C8: T ₂ - T ₆	1,37	0,8203	-30,652	<,0001
C9: T ₂ - T ₇	-2,17	0,7189	-41,188	<,0001
C10: T ₂ - T ₈	-3,62	0,5488	-18,106	<,0001
C11: T ₃ - T ₉	30,30	<,0001	27,406	<,0001
C12: T ₃ - T ₁₀	27,49	<,0001	26,418	<,0001
C13: T ₃ - T ₁₁	25,52	<,0001	39,508	<,0001
C14: T ₃ - T ₁₂	-15,60	0,0059	24,156	<,0001
C15: T ₃ - T ₁₃	24,13	0,0002	23,546	<,0001
C16: 3T ₀ - T ₁ - T ₂ - T ₃	-24,48	0,1016	7,912	0,3520
C17: 5T ₀ - T ₄ - T ₅ - T ₆ - T ₇ - T ₈	-13,35	0,5682	-17,956	0,1834
C18: 5T ₀ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	-16,50	0,4809	55,884	<,0001
C19: 5T ₁ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	-18,48	0,4301	65,974	<,0001

Fonte: O Autor (2013)

Notas: Tratamentos: T₀: Controle, T₁ Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA), T₂: Todos os Solubilizadores de Fosfato (TSF), T₃: TSF + FMA, T₄: Solubilizador de Fosfato (SF1), T₅: SF2, T₆: SF3, T₇: SF4, T₈: SF5, T₉: SF1+ FMA, T₁₀: SF2 + FMA, T₁₁: SF3 + FMA, T₁₂: SF4 + FMA e T₁₃: SF5 + FMA.

Os dados relacionados a campo para os parâmetros altura e diâmetro estão apresentados nas tabelas 15 e 16, respectivamente. Em relação a altura, verifica-se que, para a espécie tucaneira, quando

comparados os tratamentos que receberam os solubilizadores de forma isolada com os que receberam os solubilizadores coinoculados com os fungos micorrízicos arbusculares, é possível visualizar que T4 foi superior estatisticamente ao T9, ou seja, não houve influência da adição de FMA na altura para esse tratamento. Por outro lado, o tratamento T13 foi superior ao T8, demonstrando, assim, que nesse caso a adição de FMA ao solubilizador resultou em efeito positivo na altura das plantas. Na comparação realizada entre o tratamento T2 com todos os demais que continham somente solubilizadores, verificou-se que a mistura de todos os solubilizadores proporcionou um efeito de incremento na altura das plantas de tucaneira em comparação com a inoculação dos solubilizadores de forma isolada. O tratamento T3 foi estatisticamente igual aos T9, T10, T11, T12 e T13, demonstrando, dessa forma, igualdade na altura entre as plantas. O tratamento controle T0 foi estatisticamente superior a todos os demais. O contraste C19 demonstra que a utilização isolada de FMA (T1) proporcionou um incremento significativo na altura das plantas de tucaneira quando comparado com os tratamentos que continham os solubilizadores de fosfato adicionados a FMA (T9, T10, T11, T12 e T13).

Para altura a campo de *A. sellowiana*, os contrastes realizados demonstram os tratamentos que contém adição conjunta de FMA e solubilizadores de fosfato (T10, T11 e T13) e que foram superiores estatisticamente aos T3, T5, T6 e T8. Para essa espécie, verificou-se, também, que o tratamento T2 foi estatisticamente igual aos T4, T5, T6 e T7 e estatisticamente inferior ao T8. Os contrastes C18 e C19 demonstram que a inoculação conjunta de solubilizadores e FMA proporciona valores superiores para o parâmetro altura verificados a campo do que os tratamentos T0 e T1. Tais dados e informações podem ser visualizados por meio da tabela 15, a seguir.

Tabela 15 – Altura a campo das espécies tucaneira e goiaba serrana após 1 ano de cultivo

Contraste	Tucaneira		Goiaba serrana	
	Estimativa	Valor de Pr>f	Estimativa	Valor de Pr>f
C1: T ₄ - T ₉ *	67,13	<,0001	-1,79	0,6875
C2: T ₅ - T ₁₀	2,75	0,8269	-13,75	0,0024
C3: T ₆ - T ₁₁	-20,75	0,1011	-16,58	0,0003
C4: T ₇ - T ₁₂	-31,38	0,0140	-7,28	0,1034
C5: T ₈ - T ₁₃	-28,88	0,0234	10,79	0,0163
C6: T ₂ - T ₄	-22,88	0,0711	-8,13	0,0695
C7: T ₂ - T ₅	43,00	0,0009	-1,58	0,7222
C8: T ₂ - T ₆	51,13	<,0001	-1,51	0,7348
C9: T ₂ - T ₇	53,75	<,0001	-7,00	0,1174
C10: T ₂ - T ₈	61,00	<,0001	-17,00	0,0002
C11: T ₃ - T ₉	10,38	0,4100	-5,92	0,1851
C12: T ₃ - T ₁₀	11,88	0,3459	-11,33	0,0118
C13: T ₃ - T ₁₁	-3,50	0,7807	-14,08	0,0018
C14: T ₃ - T ₁₂	-1,75	0,8893	-10,28	0,0220
C15: T ₃ - T ₁₃	7,50	0,8076	-2,21	0,6200
C16: 3T ₀ - T ₁ - T ₂ - T ₃	127,25	0,0102	6,00	0,5824
C17: 5T ₀ - T ₄ - T ₅ - T ₆ - T ₇ - T ₈	116,13	0,0187	-15,84	0,3589
C18: 5T ₀ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	130,50	0,0085	-44,45	0,0108
C19: 5T ₁ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	67,13	<,0001	-55,70	0,0015

Fonte: O Autor (2013)

Notas: Tratamentos: T₀: Controle, T₁ Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA), T₂: Todos os Solubilizadores de Fosfato (TSF), T₃: TSF + FMA, T₄: Solubilizador de Fosfato (SF1), T₅: SF2, T₆: SF3, T₇: SF4, T₈: SF5, T₉: SF1+ FMA, T₁₀: SF2 + FMA, T₁₁: SF3 + FMA, T₁₂: SF4 + FMA e T₁₃: SF5 + FMA.

Para *C. myrianthum*, a comparação entre os tratamentos que continham somente solubilizadores de fosfato contra os que continham

os solubilizadores e FMAs, verificou-se que na espécie tucaneira o T4 foi superior ao T9, indicando que não houve influência de FMA no diâmetro das plantas. Por outro lado, no contraste realizado entre os tratamentos T8 e T13 verificou-se que o T13 apresentou resultados significativamente superiores ao T8, sugerindo, assim, que houve influência do FMA no diâmetro. Na comparação do T2 com os tratamentos inoculados com os solubilizadores de forma isolada (T5, T6, T7 e T8), verificou-se que a adição conjunta de todos os solubilizadores garantiu um incremento no diâmetro quando comparada com a adição isolada dos solubilizadores. A utilização de FMA, tratamento T1, favoreceu o aumento do diâmetro quando comparados os resultados com os T9, T10, T11, T12 e T13. O tratamento controle T0 foi estatisticamente igual a todos os demais.

Para a espécie *A. sellowiana*, verificou-se que T10 e T11 apresentaram resultados de diâmetro superiores a T5 e T6. T4, T5, T7 e T8 foram superiores a T2, que continha a união de todos os solubilizadores, portanto, a união de todos os solubilizadores não foi capaz de aumentar significativamente o diâmetro do que a utilização isolada dos mesmos. Os contrastes C18 e C19 revelam que T0 e T1 foram significativamente menores que T9, T10, T11, T12 e T13. Tais dados e informações podem ser visualizados por meio da tabela 16, a seguir.

Tabela 16 - Diâmetro do caule a campo das espécies tucaneira e goiaba serrana após 1 ano de cultivo

Contraste	Tucaneira		Goiaba serrana	
	Estimativa	Valor de Pr>f	Estimativa	Valor de Pr>f
C1: T ₄ - T ₉ *	0,74	0,0115	-0,07	0,4114
C2: T ₅ - T ₁₀	-0,43	0,1387	-0,18	0,0249
C3: T ₆ - T ₁₁	-0,49	0,0919	-0,35	<,0001
C4: T ₇ - T ₁₂	-0,39	0,1750	0,03	0,6735
C5: T ₈ - T ₁₃	-1,14	0,0001	0,04	0,6075
C6: T ₂ - T ₄	0,15	0,6016	-0,24	0,0036
C7: T ₂ - T ₅	1,33	<,0001	-0,18	0,0249
C8: T ₂ - T ₆	1,24	<,0001	-0,03	0,7191
C9: T ₂ - T ₇	1,39	<,0001	-0,26	0,0018
C10: T ₂ - T ₈	1,49	<,0001	-0,32	0,0001
C11: T ₃ - T ₉	-0,40	0,1656	-0,11	0,1604
C12: T ₃ - T ₁₀	-0,39	0,1791	-0,18	0,0322
C13: T ₃ - T ₁₁	-0,54	0,0635	-0,19	0,0202
C14: T ₃ - T ₁₂	-0,94	0,0015	-0,03	0,6962
C15: T ₃ - T ₁₃	-0,70	0,3199	-0,09	0,2906
C16: 3T ₀ - T ₁ - T ₂ - T ₃	0,99	0,3754	-0,12	0,5431
C17: 5T ₀ - T ₄ - T ₅ - T ₆ - T ₇ - T ₈	-0,72	0,5185	-0,82	0,0098
C18: 5T ₀ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	0,01	0,9910	-1,35	<,0001
C19: 5T ₁ - T ₉ - T ₁₀ - T ₁₁ - T ₁₂ - T ₁₃	0,74	0,0115	-1,28	<,0001

Fonte: O Autor (2013)

Notas: Tratamentos: T₀: Controle, T₁ Fungo Micorrízico Arbuscular (FMA), T₂: Todos os Solubilizadores de Fosfato (TSF), T₃: TSF + FMA, T₄: Solubilizador de Fosfato (SF1), T₅: SF2, T₆: SF3, T₇: SF4, T₈: SF5, T₉: SF1+ FMA, T₁₀: SF2 + FMA, T₁₁: SF3 + FMA, T₁₂: SF4 + FMA e T₁₃: SF5 + FMA.

5.4 DISCUSSÃO

Os resultados das características morfo-fisiológicas apresentados anteriormente, demonstram que as colônias apresentaram características semelhantes quanto aos parâmetros analisados, contudo, somente uma pequena parte dos microrganismos isolados foi capaz de solubilizar fosfato nessa pesquisa. A variação da capacidade de solubilização de microorganismos é uma característica fundamental para o processo de seleção dos mesmos, sendo que, inicialmente, são realizados testes *in vitro* onde complexos de P-Ca são solubilizados pela redução do pH (SILVA FILHO; VIDOR, 2000; GYANESHWAR et al., 2002; RICHARDSON et al., 2009).

As amostras de solo foram coletadas em regiões rizosféricas que, segundo Hinsinger et al. (2008), são as que representam um dos mais diversos habitats do planeta, sendo essencial para o funcionamento do ecossistema. Moreira; Siqueira (2006) comentam que a região rizosférica sofre grande influência dos exsudados radiculares e, por isso, são locais propícios ao desenvolvimento de microrganismos. Contudo, o número de isolados obtidos nessa pesquisa foi relativamente baixo, podendo estar relacionado ao tipo de amostragem, a fatores ambientais do sistema e, também, ao meio utilizado na seleção.

Leyval; Berthelin (1993) relataram que a atividade de solubilizadores de fosfato é severamente afetada em condições de estresse do solo. Assim, como o isolamento ocorreu em áreas com ação antrópica, esse baixo valor obtido pode estar relacionado a intervenção humana no sistema. Entretanto, nessa pesquisa, obteve-se maior número de isolados de áreas com floresta do que das áreas de nascentes, indicando que locais com menor perturbação e mais preservados podem propiciar melhores condições de sobrevivência aos microrganismos. O baixo número de isolados obtidos também pode estar relacionado ao meio de isolamento, uma vez que a única fonte de fosfato que o meio apresentava era Cálcio, prejudicando o isolamento de microrganismos solubilizadores e outros fosfatos. Azziz et. al. (2012) relatam que a fonte de carbono do meio utilizado na seleção de bactérias pode omitir o desenvolvimento de espécies incapazes de utilizar essa fonte de nutriente, entretanto, esse fato não garante a não solubilização de fosfato por essas bactérias.

Fallah (2006) obteve somente 6% de microorganismos solubilizadores de fosfato, dado esse que corrobora o obtido nessa pesquisa. Em estudo realizado por Chagas Junior et. al. (2010), dentre

205 isolados estudados, 33,2% apresentaram capacidade de solubilizar P-Ca *in vitro*, via diminuição do pH do meio, dados esses que foram superiores aos obtidos nessa pesquisa. Embora a quantidade de solubilizadores seja bastante variável, a capacidade que os mesmos possuem de solubilizar fosfatos inorgânicos (P-Fe, P-Ca e P-Al) de baixa disponibilidade e limitantes para o crescimento das plantas, desperta grande interesse agrícola e ambiental (MOREIRA;SIQUEIRA, 2006), principalmente quando utilizados na forma de inoculantes (GOLDSTEIN et al., 1999). Sendo assim, essas bactérias tornam-se indispensáveis em solos de áreas degradadas que, frequentemente, apresentam baixa disponibilidade de P.

Os resultados obtidos para a espécie tucaneira revelaram que a inoculação conjunta de solubilizadores de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares não proporcionou resultados significativos para a maioria dos parâmetros avaliados, sendo que o tratamento controle foi o que mais propiciou incremento em massa de parte aérea seca e altura das plantas em casa de vegetação. Por outro lado, no experimento a campo, notou-se que o tratamento que continha a adição conjunta de todos os solubilizadores proporcionou um incremento na altura e no diâmetro das plantas quando comparado aos tratamentos que continham os solubilizadores isolados. Após um ano, os resultados demonstraram, também, que a adição isolada de FMA apresentou melhores resultados frente a adição conjunta de FMA e solubilizadores de fosfato para altura e diâmetro das plantas a campo. Frente a isso e nas condições que foram realizadas o experimento, notou-se que não houve ação sinergística entre os dois microrganismos testados. Contudo ressalta-se que houve sinergismo na ação dos solubilizadores de forma conjunta.

Os resultados referentes ao parâmetro altura a campo indicam que as duas espécies responderam aos tratamentos de forma diferenciada, sendo que a co-inoculação de *C. myrianthum* não proporcionou resultados no parâmetro em casa de vegetação. Contudo, no campo, alguns tratamentos de co-inoculação demonstraram-se vantajosos quando comparados a inoculação de forma isolada dos microrganismos. Esses resultados indicam que a co-inoculação de mudas de *C. myrianthum* com solubilizadores e FMAs pode favorecer a sobrevivência e o crescimento dessa espécie em condições de campo, contribuindo, assim, para a recuperação de áreas degradadas. Para a espécie *A. sellowiana*, a co-inoculação de solubilizadores e FMA favoreceu o crescimento das mudas em casa de vegetação e a campo, o que pode reduzir o tempo de permanência das mudas em local protegido e favorecer o crescimento no local a ser recuperado.

A falta de resposta da espécie arbórea a alguns dos tratamentos utilizados em casa de vegetação e em condições de campo pode ser oriunda de fatores bióticos e de manejo dos inoculantes. Devido a não esterilização do solo utilizado no experimento, pode ter ocorrido uma competição dos microrganismos inoculados com os já encontrados no solo, fazendo, assim, com que a população autóctone inibisse a ação das bactérias e fungos inoculados. Relatos encontrados na literatura indicam que o tipo de solo, a espécie e a idade das plantas afetam população de solubilizadores no campo (SOUCHIE et al., 2006).

A espécie *C. myrianthum* não apresentou respostas a inoculação isolada de FMA em casa de vegetação e a campo, resultado esse inesperado, já que 80% das espécies arbóreas respondem a micorrização (SMITH; READ 2008). Conforme Pasqualini; Uhlmann; Stürmer (2007), em condições de casa de vegetação, *C. myrianthum* apresentou resposta em crescimento e massa seca de parte aérea quando inoculada com diferentes isolados de FMA. Como o experimento foi conduzido em solo não estéril é provável que além do isolado de FMA inoculado, outros FMAs estavam presentes. Estudos têm demonstrado que uma mesma espécie de FMA pode apresentar grande diversidade em colonização e esporulação em diferentes espécies de plantas (EOM et al., 2000). Para Smith; Read (2008), espécies que podem promover o crescimento em uma planta hospedeira, podem diminuir em outra, fato esse verificado nas diferenças obtidas entre as condições de campo e casa de vegetação.

A diferença nas respostas de crescimento das duas espécies também pode estar relacionada a fatores intrínsecos e extrínsecos. Silva; Saggin Junior(2006) verificaram que a resposta das plantas a fungos micorrízicos arbusculares está diretamente relacionada com fatores que controlam o processo de reconhecimento planta-hospedeiro e com a quantidade de P disponível na solução do solo. O reconhecimento da planta com seu hospedeiro pode não ter ocorrido, fazendo com que os tratamentos que continham FMA inoculado não apresentassem respostas significativas. Razão pela qual algumas espécies não consigam formar micorriza pode estar relacionada à presença de compostos tóxicos ou exsudatos liberados pela raiz das plantas que atuam como sinalizadores no reconhecimento planta-fungo (SMITH; READ, 2008).

Os resultados obtidos para a espécie goiaba serrana foram completamente diferentes dos encontrados para tucaneira. Para a primeira, ficou evidente que a adição de cada um dos solubilizadores de fosfato com FMA e de todos os solubilizadores unidos acrescidos a

FMA proporcionou resultados estatisticamente superiores em quase todos os parâmetros avaliados nos experimentos em casa de vegetação e a campo. Isso demonstra que, nas condições em que foi realizado o experimento, houve sinergismo entre os três simbiontes: planta-fungobactéria. A simbiose com FMA em espécies arbóreas já foi relatada por Janos (1980), o qual mostrou que a maioria das espécies arbóreas depende de micorrizas para a obtenção de nutrientes e água em florestas tropicais da América Central. Siqueira; Saggin Junior (2001) verificaram que espécies pioneiras da mata atlântica brasileira apresentam-se dependentes e respondem a inoculação com FMA. Em solos degradados, Santos et. al. (2008) observaram que espécies arbóreas plantadas tiveram aumento na absorção total de N e P devido a inoculação com FMA. Caproni et. al. (2005) observaram que a inoculação de FMAs em espécies arbóreas contribuiu na diminuição do tempo nos processos de revegetação de solos degradados. Dessa forma, a inoculação de FMA em goiaba serrana pode trazer benefícios no crescimento e produtividade, além de beneficiar no processo de recuperação de áreas degradadas.

A grande maioria das pesquisas realizadas avaliam somente a ação isolada de solubilizadores de fosfato e FMA no crescimento de espécies vegetais. Geralmente, há um crescimento e maior acúmulo de P das plantas inoculadas quando comparadas com plantas sem inoculação em experimentos desenvolvidos em ambiente controlado (GYANESHWAR et al., 2002; HARVEY et al., 2009; ZAIDI et al., 2009). A ação de solubilizadores de fosfato em espécies arbóreas pode ser comprovada por Aslantas et al. (2007), onde a inoculação de plantas de macieira com estirpes de bactérias solubilizadoras de fosfato proporcionou incremento na produção de frutos. Na Colômbia, a utilização de inoculantes contendo solubilizadores de fosfato tem demonstrado que há um benefício sobre o crescimento de plantas de mangue e frutíferas (GALINDO et al., 2006). De acordo com Martinez; Martinez (2007), em plantas de lavoura como cana-de-açúcar (*Saccharum officinarus*) e batata crioula (*Solanum phureja*), a utilização de solubilizadores proporcionou aumento na altura e matéria seca parte aérea.

A utilização conjunta de bactérias e fungos já é amplamente estudada, porém, com pouco destaque para solubilizadores de fosfato e FMA. Jayasingheachchi e Seneviratne (2006) testaram a associação entre bactérias do gênero *Bradlirizobium*, com fungos comuns do solo *Aspergillus* e *Penicillium*, e verificaram que o sinergismo existente entre os diversos gêneros de microrganismos do solo são altamente benéficos

para o processo de solubilização de fosfato. Silva Filho; Vidor (2000) verificaram que isolados de *Penicillium* apresentaram potencial de solubilização igual ao de *Pseudomonas*, que por sua vez foi superior ao *Bacillus* e este ao de *Aspergilus*. Os resultados obtidos para goiaba serrana demonstram que a co-inoculação de FMA e solubilizadores proporcionou incremento em crescimento e porcentagem de P na parte aérea e que essa resposta pode ter ocorrido, principalmente, a fatores relacionados a planta, visto que os demais fatores, solo e simbiontes, foram iguais aos utilizados para a espécie tucaneira.

Essas relações são de difícil compreensão, mas o conhecimento delas torna-se essencial a medida que se quer descobrir a influência dos microrganismos nas plantas. Assim, o uso de inoculantes mistos compostos por microrganismos que atuam sob diferentes estratégias mostrou-se mais adequado para a espécie goiaba serrana do que somente a utilização de um único microrganismo. A compatibilidade entre bactérias e fungos e a ação sinérgica de ambos é relatada por (AZCON-AGUILAR; BAREA et al, 1997). Além desses autores, Toro et. al. (1997) relataram que a inoculação de *Bacillus subtilis*, uma bactéria solubilizadora de fosfato, com o isolado *Glomus intraradices*, na presença de fosfato de rocha, proporcionou maior incremento em massa seca, N e P em plantas de cebola. Ratti et. al. (2001) em experimento com *Cymbopogon martini* var. Motia encontrou resultados positivos para biomassa com a coinoculação de *Glomus aggregatum* e *Polymyxa bacillus*. Sendo assim, os resultados obtidos para a espécie goiaba serrana corroboram com os estudos apresentados acima, demonstrando o reconhecimento de sinalização entre os simbiontes e a compatibilidade funcional entre os microorganismos.

O motivo pelo qual ocorre o reconhecimento e a compatibilidade funcional não é bem explicado. Porém, para alguns autores, as bactérias solubilizadoras estimulam a colonização radicular por FMAs devido, principalmente, a produção de metabólitos específicos como vitaminas, aminoácidos e hormônio (RATTI et al., 2001; VIVAS et al., 2006). Por outro lado, a ação exercida do fungo sobre a bactéria não é muito conhecida, mas sabe-se que é de extrema importância. artursson, Finlay e Jansson (2006) relataram que algumas espécies bacterianas respondem à presença de determinado FMA, sugerindo um elevado grau de especificidade entre os simbiontes. Para Souchie et. al. (2007), uma possível explicação para esta estimulação é que bactérias podem ser estimuladas por exsudatos fúngicos específicos. Partindo desse pressuposto, a simbiose entre FMA, solubilizadores de

fosfatos e espécies florestais pode ser a regra e não a exceção em sistemas naturais.

A complexidade intrínseca da rizosfera gera uma dificuldade em distinguir os reais efeitos dos microrganismos inoculados ou co-inoculados nas espécies vegetais. Todavia, pesquisas que envolvem processos biológicos que visem garantir maior produtividade via inoculação de microorganismos vêm se destacando na última década. As razões para o aumento dessas pesquisas estão relacionadas ao fato de que a inoculação de bactérias e fungos em espécies arbóreas é barato, ambientalmente correto e de fácil aplicação (VONDERWELL e ENEBAK, 2000; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos e de FMAs no solo tem sido sugerida como alternativa para se substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante melhor aproveitamento do nutriente (VESSEY; 2003; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Entretanto, para espécies florestais as pesquisas ainda são poucas, fato esse que pode estar relacionado a baixa utilização de fertilizantes nas áreas de cultivo de florestas e, também, pela dificuldade em obter resultados a curto prazo, visto que plantas florestais possuem um ciclo de desenvolvimento mais lento. Dessa forma, novas pesquisas nesse âmbito devem ser realizadas, principalmente devido ao fato de que estes microorganismos já estão disponíveis no meio ambiente e na maioria dos solos, sendo assim, podem tornar uma fonte alternativa na disponibilidade de P para as plantas, garantindo menor impacto ambiental e maior produtividade.

5.5 CONCLUSÕES

- ✓ Áreas com menor ação antrópica apresentaram maior número de bactérias solubilizadoras de fosfato;
- ✓ As bactérias isoladas apresentaram morfotipos semelhantes;
- ✓ Houve sinergismo entre bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares;
- ✓ *C. myrianthum* apresentou melhores respostas a coinoculação a campo do que em casa de vegetação;
- ✓ *A. sellowiana* apresentou respostas semelhantes a campo e em casa de vegetação;
- ✓ A inoculação com FMA proporcionou melhores resultados para *A. sellowiana* do que para *C. myrianthum*;
- ✓ Estudos de caracterização molecular e de eficiência agronômica de solubilização devem ser realizados com o intuito de verificar

as possíveis diferenças genéticas entre os morfotipos, bem como, avaliá-los a campo.

6 CAPÍTULO IV - DEPENDÊNCIA MICORRÍZICA DAS ESPÉCIES ARBÓREAS GOIABA SERRANA (*ACCA SELLOWIANA*) E TUCANEIRA (*CITHAREXYLUM MYRIANTHUM*)

Resumo

Estudos realizados com espécies florestais indicam que os valores encontrados para dependência micorrízica são variáveis. Este trabalho teve como objetivo averiguar a dependência micorrízica das espécies florestais. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, combinando 4 níveis de inoculação (*R. clarus*, *C. etunicatus*, *D. heterogama* e controle sem FMA), 2 espécies arbóreas florestais (*C. myrianthum* A. *sellowiana*) e 3 níveis de disponibilidade de fósforo no substrato (0,02 mg dm³, 0,2 mg dm³ e 2,0 mg dm³), com 6 repetições para cada tratamento. Tubetes de 270 ml foram preenchidos com substrato estéril formado de areia e argila expandida, adicionados de um dos tratamentos de FMA e níveis de P e uma muda de cada espécie florestal. As mudas cresceram em casa de vegetação durante 90 dias e, em seguida foram coletadas para serem analisadas quanto a altura, crescimento, fósforo acumulado, % de colonização e dependência micorrízica. Os resultados foram submetidos a análise de variância e, quando significativos, foram submetidos ao teste de Tukey a 95% de confiabilidade. Os resultados revelam que a espécie *A. sellowiana* apresentou-se entre altamente e extremamente dependente de micorriza com os 3 isolados de FMAs. *C. myrianthum* apresentou um nível moderado de dependência micorrízica com os 3 FMAs. O isolado de FMA *R. clarus* foi o que apresentou melhores valores absolutos de dependência micorrízica nas duas espécies quando comparado com os isolados de *C. etunicatus* e *D. heterogama*.

Palavras chave: Micorrizas. Dependência. Inoculação.

6.1 INTRODUÇÃO

A simbiose micorrízica arbuscular existente entre os fungos micorrízicos arbusculares (Filو Glomermycota) e plantas representa a simbiose mais comum nos ecossistemas terrestres (SMITH; READ, 2008). O estudo dessa simbiose tem sido feito com plantas presentes tanto em agrosistemas como em ecossistemas naturais (SMITH; READ, 2008), visto o benefício que a mesma confere as plantas, qual seja,

aumento na aquisição de fósforo (P), fator limitante no crescimento vegetal (BALZERGUE, 2011). A simbiose na natureza é regra e entre as famílias que geralmente não se associam com micorrizas arbusculares citam-se a Amaranthaceae, Pinaceae, Betulaceae, Cruciferae, Chenopodiaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Proteaceae e Polygonaceae (HABTE, 2000).

Apesar da falta de especificidade entre planta e fungo, os efeitos dos FMAs são amplamente conhecidos, pois, além de aumentarem a área de absorção de P (SMITH; READ, 2008), contribuem para a fitossanidade das plantas, na resistência a estresses ambientais e na estruturação do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; RILLIG, 2004). Diversos fatores influenciam a simbiose, sendo que se destacam a disponibilidade de nutrientes e água no solo, mudanças na cobertura do solo (SIQUEIRA et al., 2007; ZANGARO et al., 2009), bem como as espécies de FMA e de plantas existentes.

A sobrevivência dos FMAs está condicionada a simbiose, pois sem ela não conseguem fechar seu ciclo reprodutivo. Por outro lado, as plantas, possuem uma faixa grande de resposta à simbiose, sendo pouco ou altamente responsivas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Desta forma, as espécies vegetais podem ser classificadas, quanto à dependência micorrízica em facultativas, obrigatórias ou não-micorrízicas (SMITH; READ, 2008).

As espécies facultativas podem ou não formar a simbiose e estão relacionadas com solos que possuem alta disponibilidade de nutrientes, sendo que nessas condições a simbiose é inibida via mecanismos genéticos controlados pela planta (LAMBAIS et al., 2003). Nesse caso, o benefício da simbiose ocorre somente em condições de baixa fertilidade do solo. As espécies micorrízicas obrigatórias são aquelas que se associam independente das condições de fertilidade do solo e as não micorrízicas são espécies que não necessitam da simbiose para a sobrevivência (SMITH; READ, 2008).

As plantas, de maneira geral, apresentam variações quanto a resposta e a dependência micorrízica. A resposta pode ser avaliada pelo crescimento e produtividade da planta (ROCHA et al., 2006), e varia conforme combinações fungo/planta/ambiente (SAGGIN JUNIOR et al., 1994). A dependência micorrízica, por outro lado, é avaliada por meio da resposta da planta à colonização de FMA em diferentes concentrações de P na solução do solo (HABTE; MANJUNATH 1991), sendo considerada uma propriedade intrínseca de cada espécie (ALLEN, 1991). Recentemente, Janos (2007) verificou que a dependência

micorrízica pode ser averiguada a partir da incapacidade de plantas não micorrizadas responderem ao fósforo aplicado ao solo.

Siqueira; Saggin Junior (2001) relatam que o incremento promovido pela inoculação oriundo da colonização micorrízica indica o grau de micotrofia (dependência micorrízica), podendo este ser baixo ou elevado. Esta diferença está relacionada a quantidade de P disponível, pois os FMAs promovem maiores benefícios com baixa disponibilidade de P, efeito que é diminuído com a maior disponibilidade desse nutriente, chegando ao ponto de o fungo ser desnecessário à planta (SIQUEIRA; SAGGIN-JÚNIOR, 2001; ROCHA et al., 2006). Muitas espécies podem ser responsivas a micorrizas e apresentarem baixa dependência micorrízica, deixando de responder à inoculação em condições de maior disponibilidade de P no solo (SIQUEIRA; SAGGIN JÚNIOR, 2001). Flores-Aylas et al. (2003) verificaram que nenhuma das espécies arbóreas pioneiras estudadas apresentou dependência micorrízica extremamente alta, visto que as mesmas não responderam à inoculação com suprimento de P adequado ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$). Esse comportamento foi verificado, também, por (CARNEIRO et al., 1996; PARON et al., 1997; POUYÚ-ROJAS; SIQUEIRA, 2000), mostrando uma tendência geral das espécies secundárias em não apresentarem dependência micorrízica elevada.

Embora muitas espécies não apresentem dependência micorrízica, podem apresentar resposta micorrízica que é a promoção do crescimento da planta em condições de disponibilidade de P conhecidas, proporcionada pela interação de uma espécie vegetal com FMAs (JANOS, 2007). A inoculação aumentaria a absorção de nutrientes e, consequentemente, a planta teria um acúmulo na matéria seca e no rendimento (ROCHA et al., 2006). Com base nesse princípio, estudos mostram quem a inoculação com FMAs proporcionou incrementos significativos no desenvolvimento das plantas, na nutrição fosfatada, peso da massa seca aérea e radicular e outros fatores de crescimento (SANTOS et al., 2008; CALDEIRA et al., 2003; ROCHA et al., 2006; BALOTA et al., 2011).

Contudo, a distinção dos conceitos de resposta e dependência micorrízica é delicada. Assim sendo, esse trabalho tem como objetivo verificar a dependência das espécies arbóreas goiaba serrana (*Acca sellowiana*) e tucaneira (*Citharexylum myrianthum*), potencialmente utilizadas no processo de recuperação de áreas degradadas.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de dependência micorrízica foi realizado nas espécies florestais *A. sellowiana* e *C. myrianthum*. O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, no esquema fatorial combinando 4 níveis de inoculação com fungo micorrízico, 2 espécies arbóreas florestais e 3 níveis de disponibilidade de fósforo no substrato, perfazendo um total de 24 tratamentos, com 6 repetições e 144 unidades amostrais. Os FMAs utilizados no estudo foram isolados de *Rhizophagus clarus* RZN102A, *Claroideoglomus etunicatus* RZN101A e *Dentiscutata heterogama* PNB102A, obtidos da Coleção Internacional de Culturas de Glomeromycota (CICG, www.furb.bc/cicg, Blumenau-SC).

Inicialmente determinou-se a curva de absorção de P do substrato que forneceu os dados para o cálculo das doses de P. estas foram estabelecidas com base na equação **$Y=1,634X+0,262$** ($R^2=0,9982$) onde X = P na solução do solo e Y = P aplicado. O nível P encontrado no substrato padrão foi de $0,02 \text{ mg dm}^{-3}$, valor esse estabelecido como nível zero (0). Os demais níveis foram de $0,2 \text{ mg dm}^{-3}$ nível (1) e $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$ nível (2), obtidos a partir da adição de KH_2PO_4 .

Sementes das duas espécies florestais foram deixadas em água contendo hipoclorito de sódio (5%), durante 5 minutos, com a finalidade de desinfetá-las superficialmente de fungos e bactérias. Após esse período, as sementes foram postas para secar em papel toalha e, em seguida, colocadas para germinar em bandejas de 128 células, preenchidas com substrato padrão (SP) estéril formado por areia e argila expandida 1:1(V:V). O substrato foi irrigado diariamente com água durante o período de germinação das sementes, que durou 45 dias. Após esse período, 90% das sementes haviam germinado, momento em que foram transplantadas para os tubetes. Cada tubete recebeu substrato padrão adicionado de 10% de solo inóculo de um dos quatro tratamentos de FMA e uma muda de cada espécie.

Os tubetes com as mudas de goiaba serrana e tucaneira cresceram em condições controladas de temperatura e umidade durante 90 dias, quando foram coletadas para serem analisadas quanto ao crescimento em altura, biomassa de raiz e parte aérea, porcentagem de colonização radicular e concentração de P na parte aérea. A parte aérea foi separada do sistema radicular e colocada para secar em estufa até peso constante para posterior determinação da massa seca de parte aérea. A parte radicular foi lavada e descolorida de acordo com a

metodologia de Koske; Gemma (1989). Após lavar as raízes, as mesmas foram acondicionadas em *beckers* e mergulhadas numa solução de KOH 10% para, em seguida, serem colocadas em banho-maria a 90°C por 50 minutos. Após esse período a solução de KOH foi descartada, as raízes foram lavadas em água corrente e cobertas com HCl 1% por 10 minutos em temperatura ambiente. O HCl foi descartado e as amostras foram mergulhadas em uma solução corante contendo azul de tripan (0,05%) e dispostas novamente em banho-maria por 50 minutos a 90° C. Após o descarte da solução corante, as raízes permaneceram em água a 4° C até a avaliação da % de colonização micorrízica de acordo com a metodologia de Giovannetti e Mosse, (1980).

Após a determinação da massa seca de parte aérea, realizou-se o cálculo da dependência micorrízica de acordo com Habte; Manjunat (1991). Em seguida, as amostras de massa seca de parte aérea foram encaminhadas a Epagri de Caçador/SC, para determinação da quantidade de P. Os resultados obtidos para porcentagem de colonização micorrízica foram transformados prioritariamente a análise estatística. Os dados dos parâmetros massa de parte aérea seca, massa de raiz seca, altura e fósforo na parte aérea foram analisados estatisticamente por meio do software SAS (SAS, 1999) e submetidos a análise de variância (ANOVA) para verificar o efeito dos tratamentos testados e, quando significativo, as médias foram comparadas por meio do teste de Tukey ($P<0,05$).

6.3 RESULTADOS

Ressalta-se que todos os dados contidos nas tabelas e gráficos a seguir foram levantados após 90 dias de cultivo em casa de vegetação. A análise de variância demonstrou que não houve efeito dos tratamentos de FMA, de adubação e de interação para massa seca de raiz e % de fósforo na parte aérea. O tratamento com FMA influenciou massa seca de parte aérea em ambas as espécies e o P influenciou altura em *A. sellowiana* (tabela 17).

Para altura de *A. sellowiana*, a inoculação com *R. clarus* proporcionou incremento superior a 25% em relação ao controle no nível de P de $0,02 \text{ mg dm}^{-3}$. Com a inoculação de *C. etunicatus* e *D. heterogama* o incremento na altura foi de 17%, aproximadamente, em relação ao controle no nível de P de $0,02 \text{ mg dm}^{-3}$ (gráfico 6). Nos demais níveis de P não foram observadas diferenças com nenhum dos FMAs utilizados (gráfico 6). Para massa de parte aérea, observou-se que nos níveis de P de $0,2 \text{ mg dm}^{-3}$ e $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$ não ocorreram diferenças

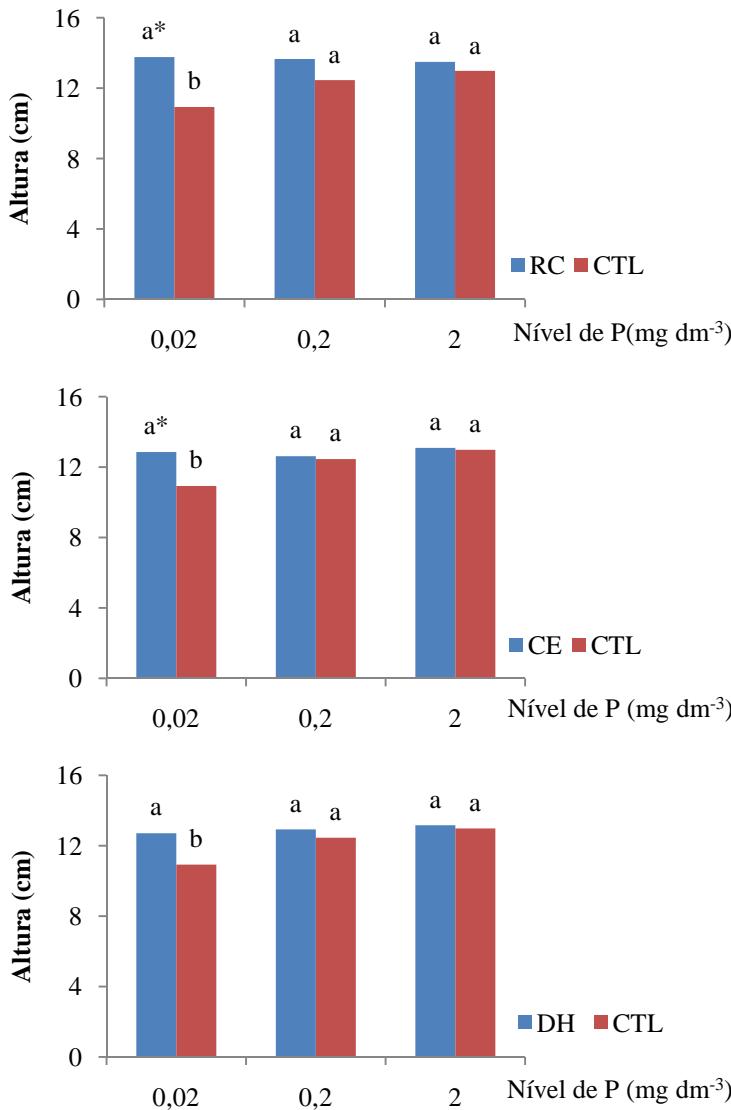
ente o tratamento controle e a inoculação com FMA para as duas espécies florestais (gráfico 7 e 8). No nível de P de 0,02 mg dm⁻³ foi observado que a espécie *C. myrianthum* quando inoculada com FMA apresentou um incremento médio na massa de parte aérea seca de 186% em relação ao tratamento controle (gráfico 7). Na espécie *A. sellowiana* a inoculação com *R. clarus* proporcionou um incremento de 455% quando comparado com o controle na massa parte aérea seca (gráfico 8). Quando inoculada com *C. etunicatus* e *D. heterogama*, o incremento na massa de parte aérea seca obtido foi de 375% e 333%, respectivamente, em relação ao tratamento controle (gráfico 8).

Tabela 17 – Análise de variância para os parâmetros de massa seca de parte aérea, massa seca de raiz, altura e fósforo (%)

	<i>C. myrianthum</i>			<i>A. sellowiana</i>	
	gl	F	P	F	P
Massa seca parte aérea					
Fungo (FMA)	3	4,56	0,048	3,42	0,039
Níveis de P	2	1,21	0,054	1,53	0,051
Níveis de P x Fungo (FMA)	6	1,47	0,116	1,42	0,096
Massa seca de raiz					
Fungo (FMA)	3	1,31	0,125	1,22	0,085
Níveis de P	2	1,14	0,103	1,16	0,093
Níveis de P x Fungo (FMA)	6	0,98	0,098	1,16	0,091
Altura					
Fungo (FMA)	3	2,12	0,123	1,63	0,074
Níveis de P	2	1,86	0,857	3,21	0,037
Níveis de P x Fungo (FMA)	6	1,41	0,922	0,81	0,071
Fósforo (%)					
Fungo (FMA)	3	2,21	0,111	1,08	0,098
Níveis de P	2	1,87	0,095	1,02	0,114
Níveis de P x Fungo (FMA)	6	0,86	0,102	1,35	0,084

Fonte: O Autor (2013)

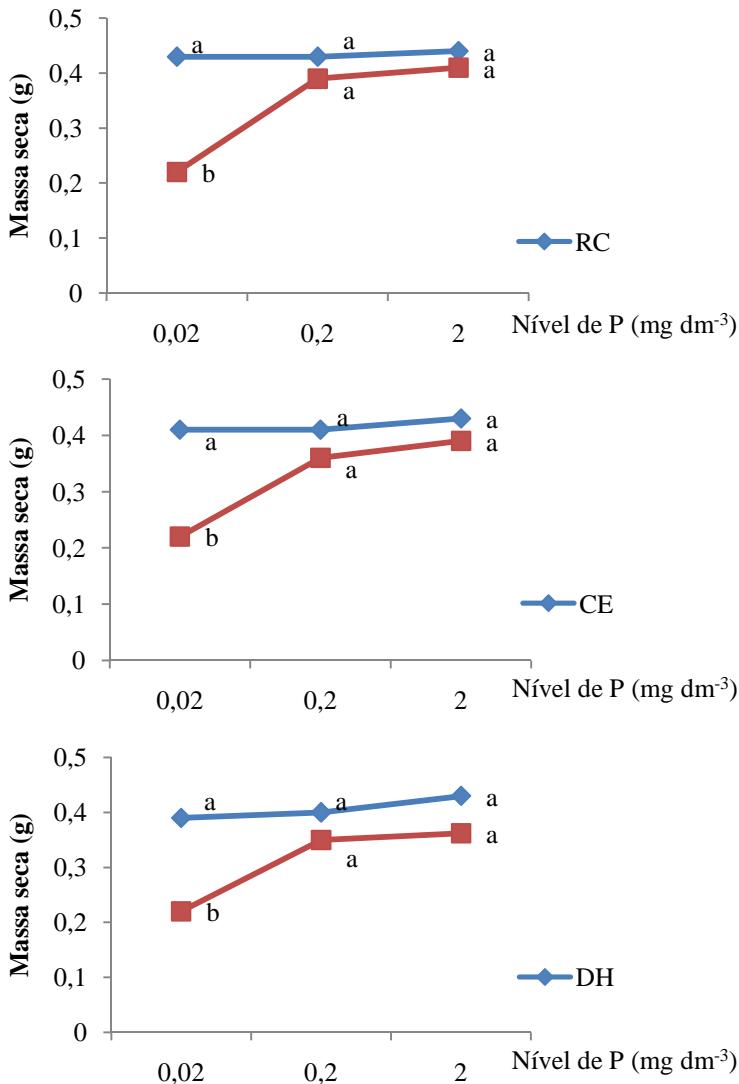
Gráfico 6 – Altura (cm) de *A. sellowiana* inoculada com *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama* em três níveis de P



Fonte: O Autor (2013)

Nota: *Barras com a mesma letra dentro do mesmo nível de P não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

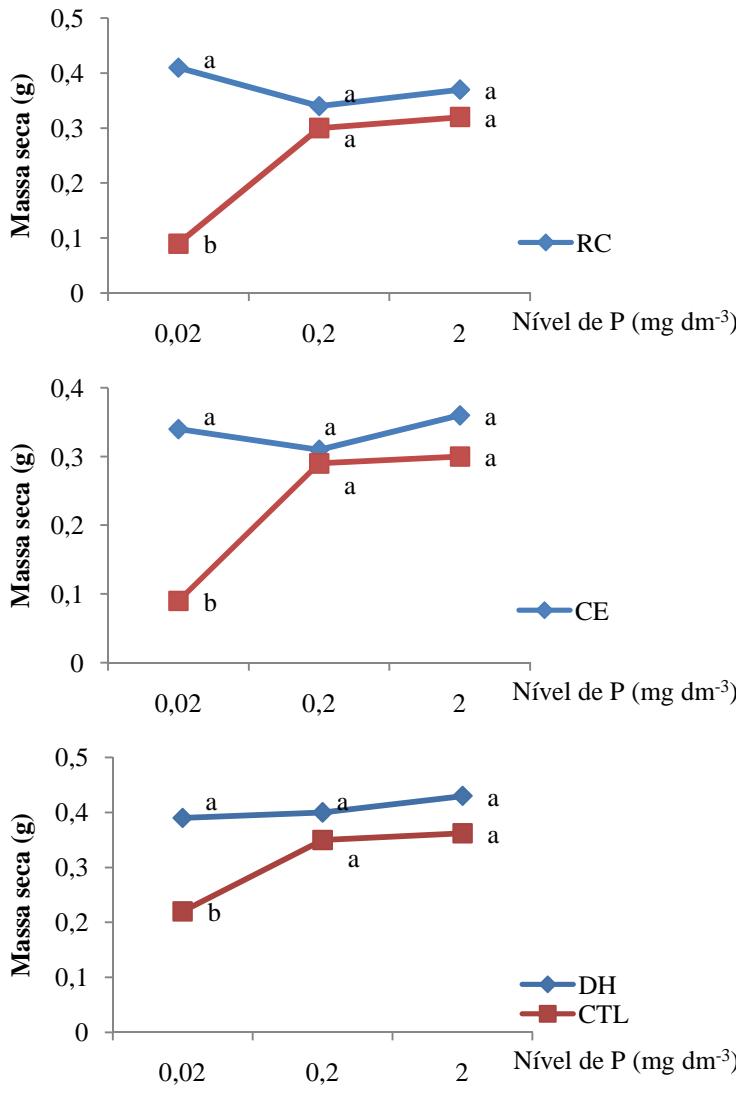
Gráfico 7 – Massa da parte aérea seca (g) de *C. myrianthum* inoculada com *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama* em três níveis de P



Fonte: O Autor (2013)

Nota: *Letras iguais dentro do mesmo nível de P não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

Gráfico 8 – Massa parte aérea seca (g) de *A. sellowiana* inoculada com *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama* em três níveis de P



Fonte: O Autor (2013)

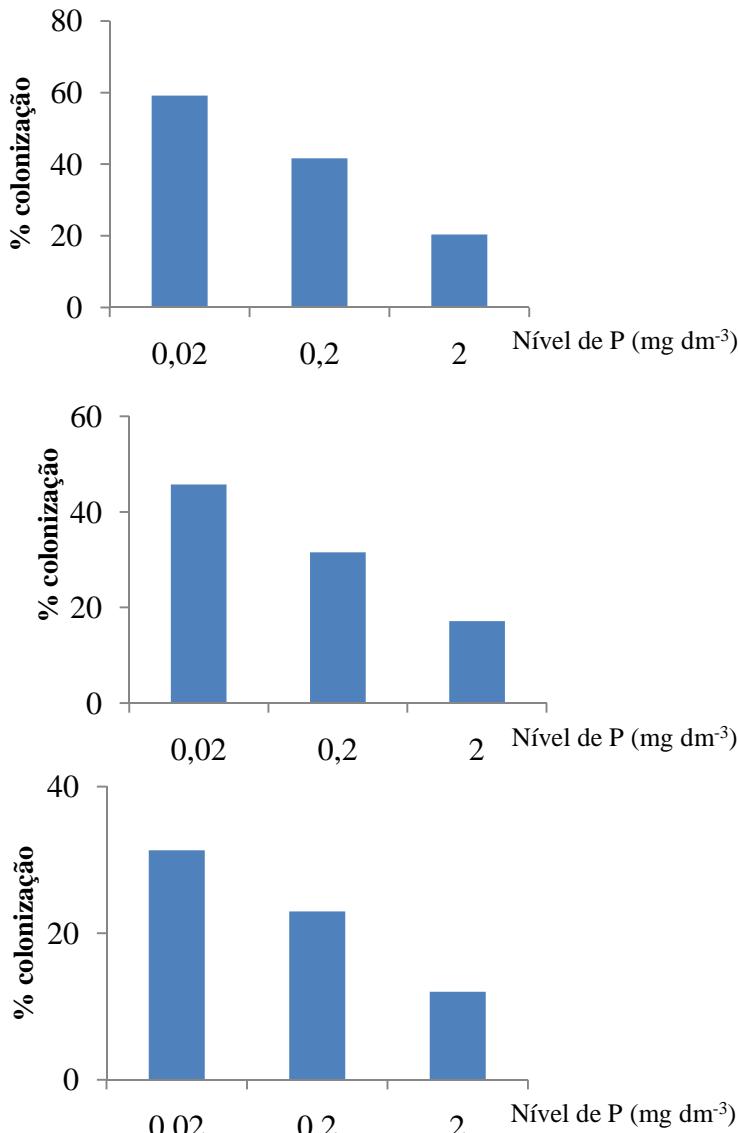
Nota: *Letras iguais dentro do mesmo nível de P não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 95% de confiabilidade.

O tratamento controle não apresentou colonização micorrízica em nenhuma espécie (gráficos 9 e 10). Para as duas espécies florestais houve diminuição da % de colonização com o aumento do nível de P

independente do FMA utilizado. Para a espécie *C. myrianthum*, os valores de colonização diminuíram em média 36% do nível de 0,02 mg dm⁻³ de P disponível ao nível 2,0 mg dm⁻³ de P disponível com todos os FMAs testados (gráfico 9). Na espécie *A. sellowiana*, o tratamento *R. clarus* apresentou 84,12% de colonização no nível de P disponível de 0,02 mg dm⁻³, entretanto no nível 2,0 mg dm⁻³ esse valor caiu para 22,63% (gráfico 10). O tratamento com *C. etunicatus* no nível 0,02 mg dm⁻³ de P disponível apresentou 58,04% de colonização e no nível 2,0 mg dm⁻³ esse valor foi de 19,25% (gráfico 10). *D. heterogama* apresentou diminuição superior a 50% de colonização quando comparados os valores no nível 0,02 mg dm⁻³ e 2,0 mg dm⁻³ de P disponível (gráfico 10).

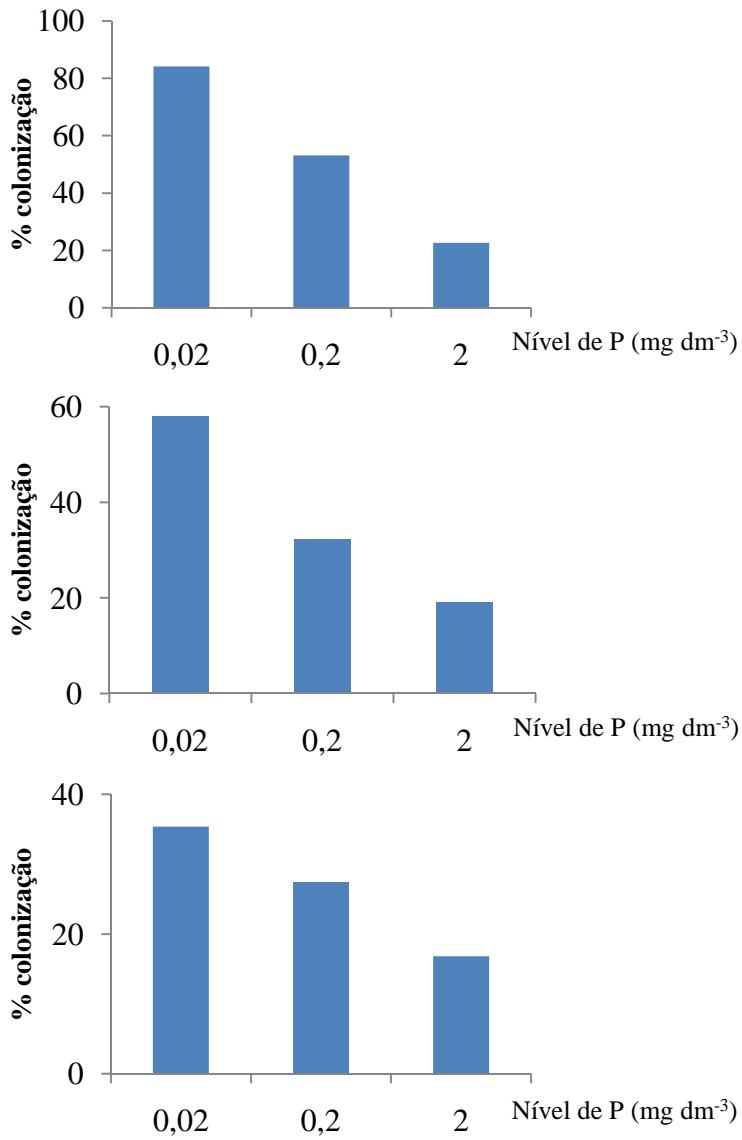
Os resultados de dependência micorrízica indicam que a espécie *C. myrianthum* apresentou valores de dependência de 48%, 46% e 43% com os tratamentos *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama*, respectivamente, valores esses que a classificam como moderadamente dependente de micorrizas (gráfico 11) Por outro lado, a espécie *A. sellowiana* apresentou valores de dependência de 73 e 70% com os tratamentos *etunicatus* e *D. heterogama*, respectivamente, sendo classificada como altamente dependente de micorrizas (gráfico 12). Com a utilização do tratamento *R. clarus* essa espécie apresentou 78% de dependência, sendo, então, classificada como extremamente dependente com esse FMA (gráfico 12).

Gráfico 9 – Porcentagem de colonização micorrízica de *C. myrianthum* inoculada com *R. clarus*, *C. etunicatus*, *D. heterogama* em 3 níveis de P



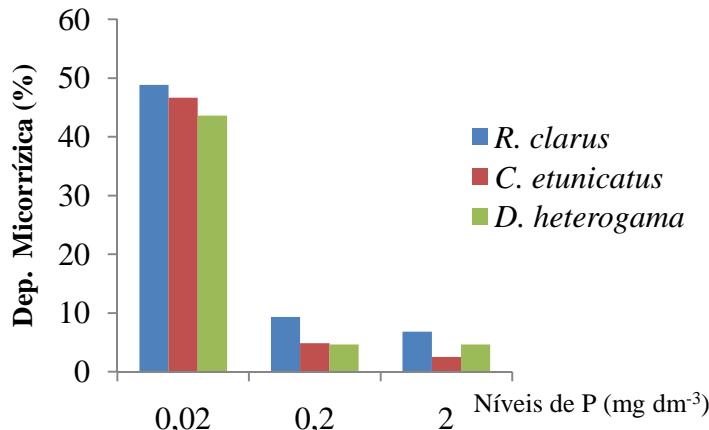
Fonte: O Autor (2013)

Gráfico 10 – Porcentagem de colonização micorrízica de *A. sellowiana* inoculada com *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama* em 3 níveis de P



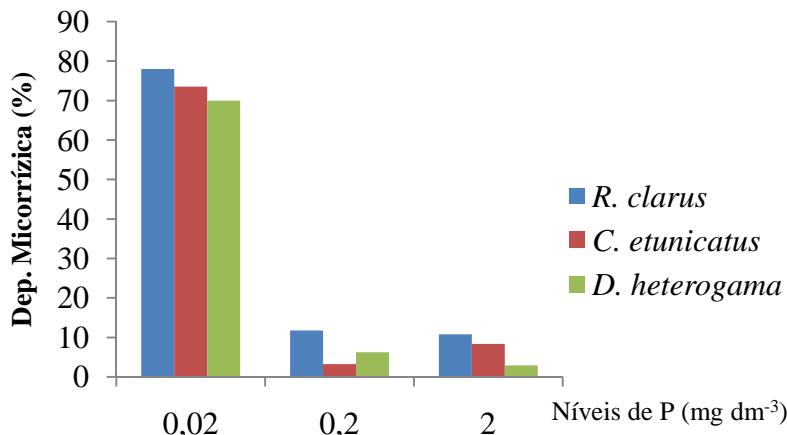
Fonte: O Autor (2013)

Gráfico 11 – Dependência micorrízica de *C. myrianthum* inoculada com *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama* em três níveis de P



Fonte: O Autor (2013)

Gráfico 12 – Dependência micorrízica de *A. sellowiana* inoculada com *R. clarus*, *C. etunicatus* e *D. heterogama* em três níveis de P



Fonte: O Autor (2013)

6.4 DISCUSSÃO

Os resultados de massa seca de raiz não diferiram em função dos tratamentos de FMAs e dos níveis de P no solo para as duas espécies, demonstrando, dessa forma, que a massa seca da raiz foi um parâmetro que apresentou resultados iguais estatisticamente, independente dos tratamentos utilizados, contudo, variou entre as espécies testadas. Siqueira; Saggin Junior (2001) verificaram em experimento semelhante que os parâmetros de raiz de espécies arbóreas variaram entre as espécies de plantas, mas não em função dos tratamentos testados, resultados esse que corroboram com o encontrado nesta pesquisa. Pasqualini, Uhlmann e Stürmer (2007) verificaram que a massa seca de raiz não foi influenciada em função da inoculação com FMA para espécies arbóreas secundárias. Em amendoim, Hippler et al. (2011) verificaram que o desenvolvimento e produção da massa seca de raiz não foi influenciado, significativamente, em função da presença ou não de FMA e da dosagem de P utilizada. Gemma; Koske; Habte (2002) verificaram que houve aumento na massa seca de raiz, a qual foi influenciada pelo nível de fósforo disponível no solo. Por outro lado, Kaldorf; Ludwig-Müller (2000) verificaram que a inoculação com *Glomus intraradices* em milho proporcionou aumento significativo em raízes laterais, porém, não sendo suficiente para modificar a massa das raízes em relação a plantas não inoculadas. Os resultados desta pesquisa demonstraram que o processo de inoculação e o aumento dos níveis de P disponível no solo não provocaram alterações nesse parâmetro.

Os resultados obtidos com a massa seca de parte aérea nas duas espécies testadas demonstram que no menor nível de P disponível, 0,02 mg dm⁻³, a inoculação com FMA proporcionou resultados superiores ao tratamento controle. Gemma; Koske; Habte (2002) verificaram que, em quatro espécies endêmicas do Havaí, o crescimento das raízes e a biomassa aérea foi significativamente melhor devido a inoculação com *Glomus aggregatum* do que plantas controle em níveis baixos de disponibilidade d P. Estes mesmos autores verificaram que a massa seca da parte aérea de plantas inoculadas foi 2,2 vezes maior do que a de plantas não inoculadas nas concentrações mais baixas de P no solo (0,001 mg dm⁻³ e 0,01 mg dm⁻³), dados esses que corroboram com os resultados desta presente pesquisa. Siqueira; Saggin Junior (2001) relatam que a matéria seca de 29 espécies arbóreas foi altamente afetada pelas doses de P e pela inoculação com FMA, sendo que em doses muito baixas, 0,002 mg dm⁻³ de P, o crescimento das espécies foi

extremamente reduzido, mesmo quando inoculadas com FMA. Nos níveis de disponibilidade de P de 0,2 mg dm⁻³ e 2,0 mg dm⁻³ não houve diferenças entre os tratamentos com FMA e controle. Estes resultados indicam que em solos com menor disponibilidade de P as plantas micorrizadas tendem a apresentar melhor crescimento quando comparadas com plantas não micorrizadas, fato esse que pode estar relacionado a participação dos FMAs na obtenção de maior quantidade de nutrientes, especialmente o P. Os resultados desse estudo indicam que os 3 FMAs testados promovem o aumento da biomassa aérea quando comparados ao controle com 0,02 mg dm⁻³ de P disponível.

Em relação a altura, esperava-se que os resultados obtidos fossem semelhantes aos da massa seca da parte aérea. Para *C. myrianthum* não houve diferença estatística em função dos níveis de P e da inoculação com FMA para esse parâmetro, resultado esse inesperado, visto que a inoculação com FMA proporcionou incremento na biomassa aérea. Para *A. sellowiana*, os resultados obtidos para altura seguiram o padrão dos encontrados para biomassa seca de parte aérea, onde no nível de P mais baixo (0,02 mg dm⁻³) houve incremento na altura das plantas micorrizadas frente ao tratamento controle. Koske; Gemma; Habte (2002) obtiveram aumento de 1,6x em resposta a inoculação e aumento nos níveis de P disponível no solo. Entretanto, com o aumento dos níveis de P, não houve acréscimo na altura das plantas provavelmente devido ao fato de que nos níveis 1 e 2 a quantidade de P disponíveis já estavam muito superiores a demanda da espécie vegetal. Habte; Mahnjunath (1991) descrevem que 0,02 mg dm⁻³ de P é considerada um valor ideal de disponibilidade.

A ausência resposta em altura de *C. myrianthum* pode estar relacionada ao pouco tempo de cultivo, visto que muitas espécies passam a responder a micorrização somente após 45 dias, pois na fase inicial utilizam as reservas da semente. Rocha et al. (2006) verificaram que, quando inoculadas com *G. margarita* e *R. clarus*, plantas de cedro (*Cedrela fissilis*) apresentaram diferenças significativas para altura somente aos 180 dias após a emergência. Para Saggin Junior; Siqueira (1995), Moreira; Siqueira (2006), as diferenças entre as espécies podem estar relacionadas ao balanço existente entre a nutrição promovida pelo FMA à planta e o dreno do fotoassimilado da planta para o fungo.

Não foram verificadas diferenças estatísticas na quantidade de P presente na parte aérea das duas espécies utilizadas em relação aos níveis de P e aos tratamentos com FMA. Siqueira; Saggin Junior (2001) verificaram que o aumento da disponibilidade de P no solo não teve efeito sobre a concentração de P de diversas espécies arbóreas, dado

esse que corrobora o encontrado nesse estudo. Entretanto, esses mesmo autores verificaram que esse efeito ocorreu, principalmente, em espécies com reduzida ou nenhuma resposta a P aplicado ou a inoculação com FMA, resultado esse diferente do encontrado nesse estudo, onde parâmetros de massa seca de parte aérea, % de colonização, altura e dependência micorrízica foram influenciados pelos tratamentos contendo FMA. A ausência de diferença pode ter ocorrido devido ao fato de que, mesmo no nível 0 de disponibilidade de P, a quantia deste nutriente disponível já era suficiente para o crescimento das plantas.

O aumento nos níveis de disponibilidade de fósforo no solo provocou uma diminuição na porcentagem de colonização radicular nas duas espécies estudadas e com todos os FMAs testados. Esse resultado era esperado, visto que acima de $0,02\text{ mg dm}^3$ de P disponível há uma tendência a ocorrer a diminuição no processo de colonização do sistema radicular devido a disponibilidade de P no próprio solo. Siqueira; Saggin Junior (2001), em estudo com 29 espécies florestais, verificaram que a colonização radicular foi inibida em maiores níveis de P, sendo que esse efeito foi mais evidenciado em espécies exibindo elevado grau de colonização. Os níveis de colonização variaram de 35% a 85% em *A. sellowiana*, e de 31% a 59% em *C. myrianthum*. Zangaro et al (2007) verificaram, em estudo realizado no Sul do Brasil, que o grupo sucessório a qual pertence a planta foi o responsável pela determinação da taxa de colonização micorrízica. Conforme esses autores, espécies pioneiras apresentam maiores taxas de colonização frente a espécies secundárias.

As duas espécies estudadas nessa pesquisa são pioneiras e nativas da floresta atlântica do sul do Brasil, sendo assim, apresentavam características que favoreciam a colonização. Segundo Janos (1988), a quantidade de P no solo não é o principal regulador do processo de colonização. Gemma; Koske; Habte (2002) sugerem a formação da simbiose, bem como sua funcionalidade, serem dependentes prioritariamente das características da espécie vegetal, sendo as características intrínsecas e genéticas das plantas responsáveis pelo processo de colonização.

A classificação das espécies de acordo com a dependência micorrízica foi realizada segundo Habte; Manjunath (1991), os quais propuserem que a dependência micorrízica deve ser calculada com base nos dados de massa seca de parte aérea de plantas colonizadas e não colonizadas no nível de $0,02\text{ mg dm}^3$ de P disponível no solo. De acordo com essa classificação, a *A. sellowiana* é alta e extremamente

dependente de micorriza e *C. myrianthum* apresentou-se moderadamente dependente. Interessante ressaltar que os maiores valores absolutos de dependência micorrízica foram encontrados para ambas as plantas quando associadas com *R. clarus*. Siqueira; Saggin Junior (2001), ao aplicar as categorias de dependência propostas por Habte; Manjunath (1991) em 29 espécies florestais nativas do Brasil inoculadas somente com *C. Etunicatus*, encontraram 10 espécies independentes, 12 extremamente dependentes, 1 altamente dependente e seis que não se encaixaram em nenhuma categoria. Pouyú Rojas (2002), ao avaliar 16 espécies florestais de distintos grupos sucessionais com inoculação de diferentes FMA, constatou que *R. clarus* proporcionou maior benefício em mudas de cedro. Rocha et al. (2006) verificaram que *R. clarus* foi mais eficiente em promover o crescimento de cedro. Esses resultados indicam que *R. clarus* possui grande capacidade de formar simbiose com espécies vegetais, proporcionando maior crescimento das mesmas, fator esse que pode ser determinante na sobrevivência da espécie a campo.

Com o aumento dos níveis de P disponível no solo para 0,2 e 2,0 mg dm³, ocorreu uma redução nos valores obtidos para dependência micorrízica. Esse resultado era esperado, pois, conforme haja aumento na disponibilidade de P, as plantas dependem menos do FMAs para obtenção de nutrientes. Tavares et al. (2001) observaram que a adição de fertilizantes causou a diminuição da dependência micorrízica, fato esse observado, também, por Janos (1988). Siqueira; Saggin Junior (2001) relatam que os efeitos da inoculação de *C. etunicatus* foram observados nos níveis 0,002 e 0,02 mg L⁻¹ de P na solução do solo, porém, deixaram de existir no nível 0,2 mg L⁻¹ de P, nível esse considerado ótimo para o desenvolvimento da maioria das espécies vegetais (Habte; Manjunath, 1991).

Segundo Smith; Read (2008), o aumento na disponibilidade de P interfere negativamente na formação da simbiose. Durante esta fase a planta cede a energia necessária (fotossintatos) para o crescimento e reprodução do fungo e, em troca, fungos absorvem nutrientes e os disponibilizam para células do córtex das raízes das plantas colonizadas (SOUZA et al., 2008). Contudo, esse processo é oneroso e, a partir do momento que o fósforo disponível no solo apresenta melhor relação custo/benefício para a planta do que a simbiose micorrízica, a planta passa a não ser mais dependente dos FMAs para a sobrevivência e seu estabelecimento.

Estudos de dependência micorrízica de espécies arbóreas são de extrema importância, principalmente para a recuperação de locais

degradados e com baixa disponibilidade de nutrientes, em especial o P. Nessas situações, espécies que se apresentam dependente de micorrizas, como as duas testadas nesse estudo, quando levadas a campo pré-inoculadas, possuem maior capacidade de sobrevivência e estabelecimento, garantindo aceleração no processo de recuperação dessas áreas. Novos estudos devem ser realizados com espécies que possam ser utilizadas em processos de recuperação de áreas degradadas, devendo avaliar-se, também, a dependência frente às diferentes espécies de FMA, pois sabe-se que não há especificidade entre planta-fungo. Entretanto, a preferência existente em algumas simbioses pode ser determinante no processo de infecção, colonização, resposta e dependência micorrízica e nem sempre inóculos de FMAs introduzidos são mais promissores do que os encontrados nas próprias áreas.

6.5 CONCLUSÕES

- As duas espécies diferiram em relação a dependência micorrízica;
- O isolado de *R. clarus* foi o que apresentou melhores resultados para as duas espécies;
- O aumento na disponibilidade de P reduz a ação da simbiose.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microbiota do solo possui papel fundamental nos sistemas agrícola e florestal devido às funções desempenhadas pelos microrganismos na ciclagem e disponibilidade de nutrientes. As relações entre os diferentes grupos de microrganismos são altamente complexas e, por isso, ainda pouco conhecidas. Assim, estudos com essa finalidade são fundamentais para a busca por alternativas para uma produção mais sustentável. Fungos micorrízicos arbusculares e bactérias solubilizadoras de fosfato podem propiciar maior disponibilidade de P para espécies agrícolas e florestais, garantindo, dessa forma, ganho na nutrição, crescimento e produtividade. Entretanto, o entendimento existente deixa lacunas no processo de interação e nos resultados que pode gerar. A elucidação desse processo passará por pesquisas que:

- ✓ Verifiquem como ocorre o reconhecimento entre os simbiontes (fungo-bactéria-planta) e de que forma é regulado;
- ✓ Avaliem quais microrganismos interferem mais efetivamente na nutrição fosfatada das plantas;
- ✓ Busquem métodos que viabilizem a multiplicação em escala comercial de inoculantes de fungos micorrízicos arbusculares;
- ✓ Testem novos microrganismos solubilizadores e fungos micorrízicos em novas espécies agrícolas e florestais, em condições de campo e em casa de vegetação.

Respostas oriundas das pesquisas acima citadas orientarão o correto manejo dos microrganismos do solo. Assim sendo, espera-se que nas próximas décadas novas tecnologias de inoculação com microrganismos do solo, como bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares, tornem-se realidade para pequenos, médios e grandes produtores agrícolas e florestais, garantindo, dessa forma, uma forma mais sustentável de produção. Entretanto, para que isso seja realidade, é necessário que os resultados saiam da academia em canais de comunicação que cheguem ao agricultor.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A. D. Factors influencing in the occurrence of vesicular arbuscular mycorrhizas. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 35, n. 2/3, p. 121-150, 1991.
- ABDEL-LATEF, A. A. H.; CHAOXING, H. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. **Sci. Hortic.**, v. 127, p. 228-233, 2011.
- ABRAMOVAY, Ricardo. Agricultura familiar e uso do solo. **São Paulo em Perspectiva**, abr/jun, vol. 11, n. 2, p. 73-78, 2004.
- ALAM, S. et al. In: Vitro solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganism (PSM) from maize rhizosphere. **Intl. J. Agric. Biol.**, v. 4, n. 4, p. 454-458, 2002.
- ALEXANDER, M. Most-probable-number method for microbial populations. In: Black, C.A. (Ed.), Methods in Soil Analysis. **American Society of Agronomy**, Madison, WI, p. 1467-1472, 1965.
- ALLEN, M. F. The ecology of mycorrhizae. **Cambridge Universiti Pres.**, p. 1-20, Cambrige, 1991.
- ANJOS, E. C. T. et al. Produção de mudas de maracujá-doce micorrizadas em solo desinfestado e adubado com fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, p. 345-351, 2005.
- ANPII - Agencia nacional produção inoculantes, 2012. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/?legislacao/16/>>. Acesso em: 10. fev. 2013.
- ANTUNES, V.; SILVEIRA, A. P. D.; CARDOSO, E. J. B. N. Interação entre diferentes tipos de solo e fungos micorrízicos vesículo-arbusculares na produção de mudas de café (*Coffea arabica* L.). **Turrialba**, San José, v. 38, n. 2, p. 117-122, 1988.

ARATO, H. D.; MARTINS, S. V.; FERRARI, S. H. S. Produção e decomposição de serrapilheira em um sistema agroflorestal implantado para recuperação de área degradada em Viçosa-MG. **Revista Arvore**, v. 27, n. 5, p. 715-721, 2003.

ARRIAGADA, C. et al. Improved zinc tolerance in *Eucalyptus globulus* inoculated with *Glomus deserticola* and *Trametes versicolor* or *Coriolopsis rigida*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 118-124, 2010.

ARTURSSON, V.; FINLAY, R. D.; JANSSON, J. K. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and bacteria and their potential for stimulating plant growth. **Environmental Microbiology**, v. 8, p. 1-10, 2006.

ASEA, P. E et al. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. **Biol. Biochem.**, v. 20, n. 4, p. 459-464, 1988.

ASSIS, R. L. de; ROMEIRO, A. R. Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 6, p. 67-80, 2002.

AUGÉ, R. M. Water relations, drought, and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v. 11, p. 3-42, 2001

AUMOND, J. J. Teoria dos sistemas: uma nova abordagem para recuperação e restauração ambiental. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 2., 2003, Itajaí. **Anais...** Itajaí, UNIVALI, 2003, p. 10-16.

AVI, Valdemiro. Prefeitura Municipal de Laurentino. **Município**, 2012. Disponível em: <<http://www.laurentino.sc.gov.br/home/index.php?#>>. Acesso em: 07 fev. 2012.

AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J. M. Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens: an overview of the mechanisms involved. **Mycorrhiza**, v. 6, n. 6, p. 457-464, 1997.

AZZIZ G. et al. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop–pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **Soil Ecology**. v. 61, p. 302-326, 2012.

BAGYARAJ, D. J.; REDDY, B. J. D. Application of arbuscular mycorrhizal fungi in horticulture. In: MEHROTRA, V. S. (Ed). **Mycorrhiza: role and applications**, p. 237-254, 2005.

BAGYARAJ, J. D. ; STÜRMER, S. L. .Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs). In: Moreira, F. M. S.; Huisng, E. J.; Bignell, D. E. (Org.). **Manual de biologia dos solos tropicais**: amostragem e caracterização da biodiversidade. Lavras, MG: UFLA, 2005, p. 205-225.

BALOTA, E. L.; MACHINESKI, O. M.; STENZEL, N. M. C. Resposta da acerola à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares em solo com diferentes níveis de fósforo. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 166-175, 2011.

BALOTA, E. L et al. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 22, p. 641-649, 1998.

BALZERGUE, C. et al. The regulation of arbuscular mycorrhizal symbiosis by phosphate in pea involves early and systemic signalling events. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 3, p. 1049-1060, 2011.

BAREA, J. M. et al. Microbial co-operation in the rhizosphere. **Journal of experimental botany**, v. 56, n. 417, p. 1761-1778, 2005.

BARROSO, C. B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve communities in tallgrass prairie. **Oecologia**, n. 122, p. 435-444, 2008.

BECARD, G.; FORTIN, J. A. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, n. 108, p. 211-218, 1988.

BECARD, G.; PICHE, Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 55, p. 2320-2325, 1989.

BECK-NIELSEN, D.; MADSEN, T. Occurrence of vesicular–arbuscular mycorrhiza in aquatic macrophytes from lakes and streams. **Aquat Bot**, n. 71, p. 141-148, 2001.

BERBARA, R. L. L.; FONSECA, H. M. A. C. Colonização e esporulação de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. In: SIQUEIRA, J. O. **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. p. 39-65.

BOTTOMLEY, P. J. Microbial ecology. In: SYLVIA, D. M. et al. **Principles and applications of soil microbiology**. 2.ed. New Jersey: Upper Saddle River, 2005. p. 463-488.

BRUNDRETT, M. C.; ABBOTT, L. K.; JASPER, D. A. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia. I. Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. **Mycorrhiza**, n. 8, p. 305-314, 1999.

BUÉE, M. et al. The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. **Molecular Plant Microbe Interaction**, n. 13, p. 693-698, 2000.

CALDEIRA, M. V. W. et al. Determinação de carbono orgânico em povoamentos de *Acacia mearnsii* De Wild plantados no Rio Grande do Sul. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 1, n. 2, p. 47-54, 2003.

CAMPELLO, E. F. C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. de (Ed.). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV, 1998. p. 183-194.

- CANTARELLA, H. et al. Response of citrus to NPK fertilization in a network of field trials in São Paulo State, Brazil. In: INTERNATIONAL CITRUS CONGRESS, Acireale, 1992. **Proceedings**. Acireale: International Society of Citriculture, 1992. v. 2, p. 607-612, 1992.
- CAPRONI, A. L. et al. Colonization of arbuscular mycorrhizae fungi in substrate, after bauxite mining, vegetated with *Acacia mangium*. **Revista Árvore**, v. 29, n. 03, p. 373-381, 2005.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; DAVIDE, A. C. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya Trec*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Lavras, v. 34, n. 3, p. 119-125, 2004.
- CARNEIRO, M. A. C et al. Fungo micorrízico e superfosfato no crescimento de espécies arbóreas tropicais. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 50, p. 21-36, dez., 1996.
- CARVALHO, D. A.; OLIVEIRA FILHO, A. T.; VILELA, E. A. Flora arbustivo-arbórea de mata ripária do Médio Rio Grande (Conquista, Minas Gerais). **Cerne**, v. 2, n. 2, p. 48-68, 1996.
- CAVALCANTI, Clovis. Sustentabilidade da economia: paradigmas alternativos da realização econômica. In: CAVALCANTI, Clovis (org.). **Desenvolvimento e natureza**: estudo para uma sociedade sustentável. São Paulo: Cortez; Recife, PE: Fundação Joaquim Nabuco. 1998.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P. Stimulation de la croissance du maÔs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p. 941-947, 1993.
- CHADA, S. S.; CAMPELLO, E. F. C.; FARIA, S. M. Sucessão vegetal em uma encosta reflorestada com leguminosas arbóreas em Angra dos Reis, RJ. **Revista Árvore**, v. 28, n. 6, p. 801-809, 2004.

CHAGAS JUNIOR, A. F. **Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia.** (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Amazonas - UFAM/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. 157 p, 2007.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.

CHEN, B. D. et al. The role of arbuscular mycorrhiza in zinc uptake by red clover growing in a calcareous soil spiked with various quantities of zinc. **Chemosphere**, v. 50, p. 839-846, 2003

CHEN, Y. P. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied and Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 33-41, 2006.

COMERFORD, N. B. et al. Modeling P bioavailability and uptake in agroforestry systems. In: GAMA-RODRIGUES, A.C. et al. **Sistemas agroflorestais:** bases científicas para o desenvolvimento sustentável. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense. p. 303-315, 2006.

CONTE, E. et al. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatase ácida pela aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 4, p. 925-930, 2002.

COOPER, M. **Curso de recuperação de áreas degradadas:** a visão da ciência do solo no contexto do diagnóstico, manejo, indicadores de monitoramento e estratégias de recuperação. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2008.

CORRÊA, J. C.; MAUAD, M.; ROSENBLUM, C. A. Fósforo no solo e desenvolvimento de soja influenciados pela adubação fosfatada e cobertura vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 39, p. 1231-1237, 2004.

- COSTA, C. M. C. et al. Fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de mangabeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 03, p. 225-232, 2005.
- COSTA, C. M. C. et al. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 893-901, 2001.
- CUNHA, G. M. et al. Fósforo orgânico em solos sob florestas montanas, pastagens e eucalipto no norte fluminense. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 31, p. 667-672, 2007.
- CUNHA, S. B.; GUERRA, A. J. T.(org). **A questão ambiental:** diferentes abordagens. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2003.
- DALAL, R. C. Soil organic phosphorus. **Adv. Agron.**, n. 29, p. 83-117, 1977.
- DALPÉ, Y.; MONREAL, M. Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems. **Crop Management**, v. 10, p. 1094-1104, 2004.
- BARBOSA, G.M. de Cesare ; TAVARES FILHO, J. Uso agrícola do lodo de esgoto: Influência nas propriedades químicas e físicas do solo, produtividade e recuperação de áreas degradadas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 4, p. 565-580, 2006.
- DECLERCK, S.; STRULLU, D. G.; FORTIN, J. A. (Ed.). **In vitro culture of mycorrhizas.** Berlin: Springer-Verlag, v. 4, p. 73-91, 2005.
- DESHWAL, V. K.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI, D. K. Isolation of plant growth promoting strains of *Bradyrhizobium* (*Arachis*) sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. **Curr. Sci.**, v. 84, n. 3, p. 443-44, 2003.

DIAS, L. E.; GRIFFITH, J. J. Conceituação e caracterização de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed.). **Recuperação de áreas degradadas.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa/Departamento de Solos/ Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, p. 1-7, 1998.

DODD J. C. et al. The management of populations of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in acidinfertile soils of savanna ecosystem. I. The effect of pre-cropping and inoculation with VAM-fungi on plant growth and nutrition in the field. **Plant Soil**, n. 122, p. 229–240, 1990a.

DODD J.C. et al. The management of populations of vesicular–arbuscular mycorrhizal fungi in acidinfertile soils of savanna ecosystem. II The effects of pre-crops on the spore populations of native and introduced VAM-fungi. **Plant Soil**, n. 122, p. 241–247, 1990b.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. **Defining soil quality for a sustainable environment**, n. definingsoilqua, p. 1-21, 1994.

DOUDS D. D. Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. **Mycorrhizan**, n. 12, p. 163-167, 2002.

DOUDS, D. D.; C. REIDER. Inoculation with mycorrhizal fungi increases the yield of Green Peppers in a High P Soil. **Biological Agriculture and Horticulture**, n. 2, p. 91-102, 2003.

DOUDS, D. D.; NAGAHASHI, G.; HEPPERLY, P. On farm-production onf indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculums production. **Bioresource Technology**, n. 101, p. 2326-2330, 2010.

DOUDS, D. D et al. Utilization of inoculum of AM fungi produced on-farm for the production of Capsicum annuum: a summary of seven years of field trials on a conventional vegetable farm. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 28, n. 2, p. 129-145, 2012.

- DOUDS, D. D. JR. Relationship between hyphal and arbuscular colonization and sporulation in a mycorrhiza of *Paspalum notatum* Flugge. **New Phytol.**, n. 126, p. 233–237, 1994.
- DOUDS, D. D. JR.; SCHENCK, N. C. Cryopreservation of sports of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Physiologist**, n. 115, p. 667-674, 1990.
- DOUDS, D. D. JR.; SCHENCK, N. C. Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. **New Phytologist**, n. 116, p. 621-627, 1990.
- DOUDS, D. D. JR. et al. Choosing a mixture ratio for the on-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Compost Science and Utilization**, n.16, p. 52–60, 2008.
- DOUDS, D. D. JR. et al. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. **Biological Agriculture and Horticulture**, n. 25, p .67–78, 2007.
- DOUDS, D. D. JR. et al. On-farm production and utilization of arbuscular mycorrhizal fungus inoculum. **Can J PlantSci**, n. 85, p. 15-21, 2005.
- DOUDS, D. D. JR. et al. On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Biores Tech**, n. 97, p. 809-818, 2006.
- DUFFY, E. M.; CASSELLS, A. C. The effect of inoculation of potato (*Solanum tuberosum* L.) microplants with arbuscular mycorrhizal fungi on tuber yield and tuber size distribution. **Applied Soil Ecol.**, n. 15, p. 137-144, 2000.
- DUGASSA, D. G.; GRUNEWALDT-STÖCKER, G.; SCHÖNBECK, F. Growth of *Glomus intraradices* and its effect on linseed (*Linum usitatissimum* L.) in hydroponic culture. **Mycorrhiza**, n. 5, p. 279-282, 1995.

DUPRÉ DE BOULOIS, H. et al. Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under in vitro conditions. **Environ Microbiol.**, n. 8, p. 1926-1934, 2006.

ELMES, R. P.; MOSSE, B. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production II Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. **Can J Bot**, n. 62, p. 1531-1536, 1984.

EOM, A. et al. Host plant species effects on arbuscular mycorrhizal fungal. **Environmental Science and Technology**, v. 5, n. 3, p. 142-154, 2000.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e de Extensão Rural de Santa Catarina. **Zoneamento agroecológico e socioeconômico do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis, 1999.

EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e de Extensão Rural de Santa Catarina. **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2009-2010**. Florianópolis: Epagri: Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola, 2009.

FAGERIA, N. K.; BALIGAR, V. C. Lowland rice response to nitrogen fertilization. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 32, p. 1405-1429, 2001.

FALCÃO, N. P. S.; SILVA, J. R. A. Características de adsorção de fósforo em alguns solos da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 3, p. 337-342, 2004.

FALLAH, A. Abundance and distribution of phosphate solubilizing bacteria and effluent by bacterial species isolated Tannery effluent affected soil. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, n. 3, p. 142-154, 2006.

FELDMANN, F.; GROTKASS, C. Directed inoculum production—shall we be able to design AMF populations to achieve predictable symbiotic effectiveness? In: Gianinazzi S, Schüepp H, Barea JM, Haselwandter K (eds) **Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts**. Birkhauser, Basel, p. 261-279, 2002.

FERREIRA, C. A. G. **Efeito do uso do solo de horizonte A e do gesso no comportamento de espécies florestais em áreas degradadas pela disposição de resíduo de bauxita.** 2001. 124 f. Tese (Doutorado em Conservação e Manejo de Recursos). Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro, 2001.

FLORES-AYLAS, W. W et al. Efeito de *Glomus etunicatum* e fósforo no crescimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 2, p. 257-266, 2003.

FORTES, J. L. O.; BALIEIRO, F. C.; FRANCO, A. A. Leguminosas arbóreas como agentes de recuperação de áreas degradadas. In: MOURA, E. G. (Coord.). **Agroambientes de transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil:** atributos; alterações; uso na produção familiar. São Luiz: Uema, 2004. p. 101-132.

FRANCO, A. A. et al. Uso de leguminosas florestais noduladas e micorrizadas como agentes de recuperação e manutenção da vida no solo: um modelo tecnológico. In: Esteves, F. (ed.). **Oecologia Brasilienses.** Rio de Janeiro: UFRJ, 1995. p. 459-467.

GADAGI, R. S.; SA, T. New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminium phosphates using dyes. **Soil Science and Plant Nutrition**, n. 48, p. 615-618, 2002.

GALINDO H.; OLSON, D.; PALUMBI, S. Seascape genetics: a coupled oceanographic-genetic model predicts population structure of Caribbean corals. **Current Biology**, n. 16, p. 1622-1626, 2006.

GAMA-RODRIGUES, A. C.; BARROS, N. F.; COMERFORD, N. B. Biomass and nutrient cycling in pure and mixed stands of native tree species in Southeastern Bahia, Brazil. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 23, n. 31, p. 287-298, 2007.

GARG, S. K. et al. In vitro fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by Azotobacter strains in aquatic system. **Bioresource Technology**, Fayettevill, v. 80, p. 101-109, 2001.

GASPARINO, D.; MALAVASI, V. C.; MALAVASI, M. M. Revegetação de matas ciliares na região oeste do Estado do Paraná. **Varia Scientia**, Cascavel, n. 2, p. 121-129, 2001.

GATIBONI, L. C. **Disponibilidade de formas de fósforo do solo às plantas.** (Tese de Doutorado). 231 f. Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria, 2003.

GAUR, A. **Inoculum production technology development of vesicular-arbuscular mycorrhizae.** Ph. D. thesis. Univ. of Delhi, Delhi, India, 1997.

GAUR, A.; ADHOLEYA, A. Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. **BiolFertil Soils**, n. 35, p. 214-218, 2002.

GAUR, A.; ADHOLEYA, A. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. **Mycorrhiza**, n. 10, p. 43-48, 2000 .

GERDEMANN, J. W. Vesicular–arbuscular mycorrhizae. In: Torrey, J.G. & Clarkson, D.T. (Eds.) **The development and function of roots.** New York: Academic Press, 1975.

GIANINAZZI, S. et al. Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts. **Birkhäuser Verlag**, Switzerland, p. 187-197, 2002.

GIANINAZZI, S.; VOSÁTKA, M. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. **Canadian Journal of Botany**, n. 82, p. 1264-1271, 2004.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: gettingto the roots of the symbiosis. **The Plant Cell**, n. 8, p. 1871-1883, 1996.

GIOVANETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytol.**, n. 8, p. 489-500, 1980.

GOLDSTEIN, A. H.; BRAVERMAN, K.; OSORIO, N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) bacterium. **FEMS Microbiol. Ecol.**, n. 3, p. 295-300, 1999.

GONÇALVES, J. L.M et al. Cinética de adsorção de fósforo em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 9, p. 107-111, 1985.

GONÇALVES, J. L. M. et al. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. (Orgs.). **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 2000. p. 310-350.

GRABOW, W. Waterborne diseases: update on water quality assessment and control. **Water S/A.**, v. 22, n. 2, p. 193-202, 1996.

GRAHAM, J. H.; SYVERTSEN, J. P. Host determinants of mycorrhizal dependency of citrus rootstock seedlings. **New Phytol**, v. 101, p. 667-676, 1985.

GRAHAM, P. H., AND VANCE, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater utilization. **Plant Physiol**, v. 131, p. 872-877, 2003.

GRANT, C. A et al. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 95, 2001.

GRYNDLER, M. et al. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 22, p. 283-287, 2003.

GUERRA, A. J. T.; CUNHA, S. B. da. **Geomorfologia e meio ambiente**. 4. ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2003.

- GULL, M. et al. A. Phosphorus uptake and growth promotion of chickpea by co-inoculation of mineral phosphate solubilising bacteria and a mixed rhizobial culture. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 44, n. 6, p. 623-628, 2004.
- GUPTA, V.; SATYANARAYANA, T.; GARG, S. General aspects of mycorrhiza. In: Mukerji, K.G., B.P.; Singh, Chamola & J. (eds). **Mycorrhizal Biology**, p. 27-44, 2000.
- GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83-93, 2002.
- HABT, M. 2000, plant nutrient management in Hawaii's soils, approaches for tropical and subtropical agriculture. J. A. Silva and Uchida, eds. **College of Tropical Agriculture and Human Resources**, University of Hawaii at Manoa, 2000.
- HABTE, M.; MANJUNATH, A. Categories of vesiculararbuscular mycorrhizal dependency of host species. **Mycorrhiza**, v. 1, p. 3-12, 1991.
- HAMEED, S. et al. *Rhizobium*, *BradyRhizobium* and *Agrobacterium*strains isolated from cultivated legumes. **Biol. Fertil. Soils**, v. 39, p. 179-185, 2004.
- HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.
- HARRISON, M. J. Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Ann. **Rev. Microbiol.**, v. 59, p. 9-42, 2005.
- HART, M. M.; READER, R. J. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytol**, v. 153, p. 335-344, 2002.
- HARTEMINK, A. E. Nutrient stocks of short-term fallows on high base status soils in the humid tropics of Papua New Guinea. **Agroforestry Systems**, v. 63, p. 33-43, 2004.

HARVEY, P.R.; WARREN, R. A.; WAKELIN, S. Potential to improve root access to phosphorus: the role of non-symbiotic microbial inoculants in the rhizosphere. **Crop Pasture Sci**, v. 60, p. 144-151, 2009.

HAWKINS, H. J.; GEORGE, E. Hydroponic culture of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* with *Linum usitatissimum* L., *Sorghum bicolor* L. and *Triticum aestivum* L. **Plant Soil**, v. 196, p. 143-149, 1997.

HAYGARTH, P. M.; JARVIS, S. C. Transfer of phosphorus from agricultural soils. **Advances in Agronomy**, v. 66, p. 195-249, 1999.

HAYNES, R. J.; MOKOLOBATE, M. S. Amelioration of Al toxicity and P deficiency in acid soils by additions of organic residues: a critical review of the phenomenon and the mechanisms involved. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 59, p. 47-63, 2001.

HE, Z. L et al. Seasonal responses in microbial biomass carbon, phosphorus and sulphur in soils under pasture. **Biol. Fert. Soils**, v. 24, p. 421-428, 1997.

HECHT, S. A evolução do pensamento agroecológico. In: ALTIERI, M. **Agroecologia: as bases científicas da agricultura alternativa**. 4. ed. Rio de Janeiro: PTA/FASE, 2000.

HETRICK, B. A. D.; WILSON, G. W. T.; TODD, T. C. Mycorrhizal responses in wheat cultivars: relationship to phosphorus. **Canadian Journal of Botany**, v. 74, n. 1, p. 19-25, 1996.

HINSINGER, P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. **Plant and Soil**, v. 237, p. 173-195, 2001.

HINSINGER, P. et al. Soil-Root-Microbe Interactions in the Rhizosphere: A Key to Understanding and Predicting Nutrient Bio availability to Plants. **R.C. Suelo Nutr. Veg.**, Temuco, v. 8, n. especial, 2008.

HODGE, A.; CAMPBELL, C. D.; FITTER, A. H. An arbuscular mycorrhizal fungi accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. **Nature**, London, v. 413, n. 20, p. 297-299, 2001.

ICEPA, 2010 - **Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2009-2010**: novo retrato da agricultura familiar em Santa Catarina. Disponível em:<http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2010/sintese%202010_inteira.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2013.

IJDIO, M; CRANENBROUCK, S; DECLERCK, S. Methods for large-scale production of AM fungi:past, present, and future. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 1-6, 2011.

ILLMER, P.; SCHINNER, F. Solubilization of hardly-soluble AlPO₄ with P-solubilizing microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 265-270, 1995.

ISHERWORD, K. F. Fertilizer use and environment. In: N. Ahmad and A. Hamid (eds.), Proc. Symp. **Plant nutrition management for sustainable agricultural growth**. NFDC, Islamabad, p. 57-76, 1998.

IYAMUREMYE, F.; DICK, R. P.; BAHAM, J. Organic amendments and phosphorus dynamics: I. Phosphorus chemistry and sorption. **Soil Sci**, v. 161, p. 426-435, 1996.

JANOS, D. P. Plant responsiveness to mycorrhizas differs from dependence upon mycorrhizas. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 02, p. 75-91, 2007.

JANOS, D.P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. **Ecology**, v. 6, n. 1, p. 151-162, 1980.

JANOS, D. P.; CAIN, C. L. Mcorrhiza in review. **Mycorrhiza**, v. 7, p. 331-333, 1988.

JARSTFER, A. G.; SYLVIA, D. M. Aeroponic culture of VAM fungi. In: Varma, A.; Hock, B. (eds.). **Mycorrhiza** : structure, function,molecular biology and biotechnology. Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. p. 427-441.

- JAYASINGHEARACHCHI, H. S.; SENEVIRATNE, G. Fungal solubilization of rock phosphate is enhanced by forming fungal-rhizobia biofilms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 405-408, 2006a.
- JOHANSSON, J. F.; PAUL, L. R.; FINLAY, R. D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 48, p. 1-13, 2004.
- JOHNSON, N. C.; GRAHAM, J. H.; SMITH, F. A. Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism: parasitism continuum. **New Phytol**, v. 135, p. 575-585, 1997.
- KALDORF, M.; LUDWIG-MÜLLER, J. Fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butryric acid biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, n. 109, v. 1, p. 58-67, 2000.
- KARASAWA, T.; KASAHARA, Y.; TAKEBE, M. Differences in growth responses of maize to preceding cropping caused by fluctuation in the population of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 851-857, 2002.
- KIERS, E. T. et al. Measured sanctions: legume hosts detect quantitative variation in rhizobium cooperation and punish accordingly. **Evol. Ecol. Res.**, v. 8, p. 1077-1086, 2006.
- KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **J. Lab. Clin. and Med.**, n. 44, p. 301-307, 1954.
- KIRIACHEK, S. G. et al. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbustivais. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, v. 33, p. 1-16, 2009.
- KLEINSCHMIDT, G. D.; GERDEMANN, J. W. Stunting of citrus seedlings in fumigated nursery soils related to the absence of endomycorrhizae. **Phytopathology**, v. 62, p. 1447-1453, 1972.
- KOBIYAMA, Masato. Preservation of the atlantic forests. In: WORKSHOP ON INTERNATIONAL COLLABORATION FOR FOREST CONSERVATION. 2001, Osaka. Proceedings. Tokyo: Japan Wildlife Research Center, 2001. v. 1, p. 39-44.

KOBIYAMA, M.; MINELLA, J. P. G.; FRABRIS, R. Áreas degradadas e sua recuperação. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, n. 210, v. 22, p. 10-17, 2001.

KOIDE, R. T. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. **New Phytologist**, v. 117, p. 365-386, 1991.

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

KUCEY, R. M .N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 63, p. 671-678, 1983.

LAMBAIS, M. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da relação fungo-planta em micorrizas arbusculares. In: Siqueira, J. O. (org.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras, MG: universidade federal de lavras, 1996, p. 5-38.

LAMBAIS, M. R.; RIOS-RUIZ, W. F.; ANDRADE, R. M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **NewPhytol.**, v. 160, p. 421-428, 2003.

LEITE, L. L.; MARTINS, C. R.; HARIDASAN, M. Propriedades físico-hídricas do solo de uma cascalheira e de áreas adjacentes com vegetação nativa de campo sujo e cerrado no Parque Nacional de Brasília. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 1., 1992, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR/Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1992. p. 392-399.

LEYVAL, C.; BERTHELIN, J. Rhizodeposition and net release of soluble organic compounds by pine and beech seedlings inoculated with rhizobacteria and ectomycorrhizal fungi. **Biology e Fertility of Soils**, v. 15, p. 259-267, 1993.

LIU, G. et al. Comparisons of two quick methods for evaluating phosphorus efficiency genotypes. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PHOSPHORUS DYNAMICS IN THE SOIL-PLANT CONTINUUM, 3., 2006. Uberlândia. **Proceedings...** Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. p. 100-101.

LOUGHMAN, B. C.; ROBERTS, S. C.; GOODWIN-BAILEY, C. I. Varietal differences in physiological and biochemical responses to changes in the ionic environment. **Plant and Soil**, The Hague, v. 72, p. 245-259, 1983.

MA, S.; YOKOYAMA, K.; MARUMOTO, T. Effect of peat on mycorrhizal colonization and effectiveness of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Soil Sci Plant Nutr**, v. 53, p. 744–752, 2007.

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

MARLEEN, I.; SYLVIE, C.; STÉPHANE, D. Methods for large scale production of AM fungi: past, present and future. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 1-16, 2011.

MARTINAZZO, R. et al. Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto afetado pela adição de fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 3, p. 563-568, 2007.

MARTINEZ, A.; MARTINEZ-SALGADO, M. Effects of phosphatesolunilizing bacteria during the rooting period of sugar cane (*Saccharum officinarum*), Venezuela 51-71 variety, on the grower's oasis substrate. In: **microbial Phosphate solubilizing**, v. 102, p. 317-323. 2007.

MARTINS, S. V. **Recuperação de matas ciliares**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil, 2001.

MASCHIO, L. et al. Microrganismos e auto sustentação de ecossistemas em solos alterados. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 1992, Curitiba. **Anais...**Curitiba: UFPR/Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1992. p. 440-445.

McBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils.** New York: Oxford University, 1994.

McDOWELL, R. W. et al. Connecting phosphorus loss from agricultural landscapes to surface water quality. **Chemistry and Ecology**, Colchester, v. 20, p. 1-40, 2004.

MELLONI, R. et al. Fósforo adicionado e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e nutrição mineral de limoeiro-cravo [Citrus limonia (L.) Osbeck]. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 767-775, 2000.

MENDES, I. C.; REIS Jr, F. B. **Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos:** uma análise crítica. Embrapa Cerrados, 2003.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny base on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.

MIELNICZUK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed). **Fundamentos da matéria orgânica do solo:** Ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, Genesis, 1999. p. 1-8.

MIKANOVÁ, O.; NOVÁKOVÁ, J. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. **Rostlinná Výroba**, v. 48, n. 9, p. 397-400, 2002.

MILLNER, P. D.; KITT, D. G. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 2, p. 9-15, 1992.

MOHAMMAD, A.; KHAN, A.; KUEK, C. Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 9, p. 337-339, 2000.

MOLLA, M. A. Z. et al. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. **Plant Soil**, v. 78, p. 393-399, 1984.

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. **Am. J. Bot.**, v. 66, p. 14-18, 1979.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006.

MOSSE, B. The establishment of vesicular–arbuscular mycorrhiza under aseptic conditions. **J Gen Microbiol**, v. 27, p. 509-520, 1962.

MOSSE, B. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an Endogone sp. causing vesicular–arbuscular mycorrhiza. **Trans Br Mycol Soc**, v. 42, p. 273-286, 1959.

MOSSE, B. et al. Ecology of mycorrhizae and mycorrhizal fungi. **Advances in microbial ecology**, v. 5, p. 137-210, 1981.

MOSSE, B.; HEPPER, C. M. Vesicular-arbuscular infections in root-organ cultures. **Physiol Plant Pathol**, v. 5, p. 215-233, 1975.

MOSSE, M.; THOMPSON, J.P. (1981) Production of mycorrhizal fungi. US Pat. No 4294037. Disponível em:
<http://www.google.com/patents/US4294037>. Acesso em: 21. abr. 2013.

MUGNIER, J.; MOSSE, B. Vesicular–arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. **Phytopathology**, v. 77, p. 1045–1050, 1987.

MUTHUKUMAR, T.; UDAIYAN, K. Seasonality of vesicular–arbuscular mycorrhizae in sedges in a semiarid tropical grassland. **Acta Oecol**, v. 23, p. 337-347, 2002.

NAHAS, E. Factors determining rock phosphate solubilization by microrganisms isolated from soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, n. 6, p. 567-572, 1996.

NAHAS, E. Solubilização microbiana de fosfatos e de outros elementos. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 467-486.

NAHAS, E.; ASSIS, L. C. Efeito da concentração de fosfato na solubilização de fluorapatita por *Aspergillus niger*. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 23, p. 37-42, 1992.

NAHAS, E.; BANZATTO, D. A.; ASSIS, L. C. Fluorapatite solubilization by *Aspergillus niger* in vinasse medium. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, n. 8, p. 1097-1101, 1990.

NAHAS, E.; CENTURION, J. F.; ASSIS, L. C. Efeito das características químicas dos solos sobre os microrganismos solubilizadores de fosfato e produtores de fosfatases. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 49-53, 1994a.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 170, p. 65-270, 1999.

NIELSEN, M. M.; WINDING, A. Microorganisms as indicators of soil health. Denmark, **National Environmental Research Institute**, 2002. 84 p.

NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, p. 329-338, 2000.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R.F. et al. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 471-537.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999.

OEHL, F. et al. Kinetics of microbial phosphorus uptake in cultivated soils. Biology and Fertility of Soils of biotrophic status by a vesicular - arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, v. 112, p. 77-83, 2001.

OMAR, S.A. The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. **World J. Microbiol. Biotech.**, v. 14, p. 211-218, 1998.

ORTEGA-LARROCEA, M. P. et al. Plant and fungal biodiversity from metal mine wastes under remediation at Zimapán, H. **Environmental Pollution**, v. 158, p. 1922-1931, 2010.

PASQUALINI, D.; UHLMANN, A.; STÜRMER, S. L. Arbuscular mycorrhizal fungal communities influence growth and phosphorus concentration of woody plants species from the Atlantic rain forest in South Brazil. **For. Ecol. Manag.**, v. 245, p. 148-155, 2007.

PARON, M. E.; SIQUEIRA, J. O.; CURI, N. Fungos micorrízicos, fósforo e nitrogênio no crescimento inicial da trema e do fededoso. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 21, p. 567-574, 1997.

PAUL, E. A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic, 1996.

PELLEGRINI, J. B. **Fósforo na água e no sedimento na microbacia hidrográfica do Arroio Lino – Agudo – RS**. 2005. 98 f. (Dissertação de mestrado). Ciência do Solo. Universidade Federal de Santa Maria - Centro de Ciências Rurais. Santa Maria, 2005.

PÉREZ, E. et al. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 2905-2914, 2007.

- PIERZYNSKI, G. M.; McDOWELL, R.; SIMS, J. T. Chemistry, cycling, and potential movement of inorganic phosphorus in soils. In: **Phosphorus: Agriculture and the Environment.** Sims, J. T.; Sharpley, A. N. (eds.). ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, 2005. p. 53-86.
- PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. Soil phosphorus and environmental quality. In: PIERZYNSKY, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. **Soil and Environmental Quality.** 2.ed. Boca Raton, 2000. p. 155-208.
- PLENCHETTE, C. A.; FORTIN, A.; FORLAN, N. Growth response of several plant species to mycorrhiza in a soil of moderate P-fertility. I. Mycorrhizae under field conditions. **Plant Soil.**, v. 70, p. 199-203, 1983.
- POUYÚ-ROJAS, E.; SIQUEIRA, J. O. Micorriza arbuscular e fertilização do solo no desenvolvimento pós-transplante de mudas de sete espécies florestais. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 35, p. 103-114, 2000.
- POUYÚ-ROJAS, E. **Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com mudas de espécies arbóreas tropicais.** 2002. 90 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.
- PRIMACK, R. P.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação.** Londrina: Editora Rodrigues, 2001.
- RAIJ, Bernardo Van. **Fertilidade do solo e adubação.** Piracicaba: Agronômica Ceres, Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1991.
- RATTI, N. et al. Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii* var. *motia* by rhizobacteria, AMF and *Azospirillum* inoculation. **Microbiol. Res.**, Jena, v. 156, n. 2, p. 145-149, 2001.
- RAVEN, P. H.; EVERET, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal.** 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2007.
- REBOUCAS, A. C. Água doce no mundo e no Brasil. Águas doces no Brasil. **Notícias UNESCO**, Brasília, n. 20, p. 6-7, jan./abr. 2003.

REDDY, S. R.; PINDI, P. K.; REDDY, S. M.; Molecular methods for research on arbuscular mycorrhizal fungi in india: problems and prospects. **Current Science**, v. 89, p. 1699-1709, 2005.

REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Sci.**, v. 289, p. 1920-1921, 2000a.

REDECKER, D.; MORTON, J. B.; BRUNS, T. D. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). **Molec. Phylog. Evol.**, v. 14, p. 276-284, 2000b.

REIS, A.; ESPÍNDOLA, M. B.; VIEIRA, N. K. **Restauração de áreas degradadas**: imitando a natureza. Florianópolis: LEF, 2003. p. 38.

RESH, H. M. **Cultivos hidropónicos**: nuevas tecnicas de producción. 4. ed. Editora Mundi – Prensa Libros S.A., 1997.

RHEINHEIMER, D. S.; ANGHINONI, I.; CONTE, E. Fósforo da biomassa microbiana em solos sob diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 589-597, 2000.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, n. 9, p. 897-906, 2001.

RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 322, p. 17-24, 2009.

RILLIG, M. C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 84, p. 355-363, 2004.

ROCHA, F. S. et al. Dependência e resposta de mudas de cedro a fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 1, p.77-84, 2006.

RODRIGUES, R. R.; LEITÃO FILHO, H. F. L. **Matas ciliares**: conservação e recuperação. EDUSP, 2000.

RODRIGUES, R. R.; GANDOLFI, S; Restauração de florestas tropicais: subsídios para uma definição metodológica e indicadores de avaliação e monitoramento. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Eds.). **Recuperação de áreas degradadas.** Viçosa: UFV, SOBRADE, 1998. p. 203-215.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 319-339, 1999.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 155-161, 2000.

ROVEDDER, A. P.M. et al. Organismos edáficos como bioindicadores da recuperação de solos degradados por arenização no Bioma Pampa. **Ci. Rural**, v. 39, p. 1061-1068, 2009.

RUIVO, M. L. P. Recuperação de áreas de mineração: uma experiência bem sucedida na Amazônia. In: FERREIRA, E.J.G. (Eds.). **Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia.** Manaus: INPA, 1993. p. 383-404.

SAGGIN JUNIOR, O. J. **Micorrizas arbusculares em mudas de espécies arbóreas do sudeste brasileiro.** (Tese- Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas). Lavras: UFLA, 1997. 120 p.

SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O. Avaliação da eficiência simbiótica de fungos endomicorrízicos para o cafeeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 19, p. 221-228, 1995.

SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SIQUEIRA, J. O. Micorrizas arbusculares em cafeeiro. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.). **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas.** Lavras: UFLA: DCS: DCF, 1996, p. 203-254.

SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Micorriza Arbuscular: Papel, funcionamento e aplicação da simbiose. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Eds). **Processos biológicos no sistema soloplanta: ferramentas para uma agricultura sustentável.** Brasília: Embrapa Informação e Tecnológica, 2005, p. 101-149.

SAGGIN JÚNIOR, O. J. et al. Interação fungos micorrízicos versus superfosfato e seus efeitos no crescimento e teores de nutrientes do cafeiro em solo não fumigado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 18, p. 27-36, 1994.

SAITO, M.; MARUMOTO, T. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi: the status quo in Japan and the future prospects. **Plant and Soil**, v. 244, p. 273-279, 2002.

SANCHEZ, P. A.; LOGAN, T. J. Myths and science about the chemistry and fertility of soils in the tropics. In: LAL, R.; SANCHEZ, P.A. (Ed.). **Myths and science of soil of the tropics**. Madison: SSSA/ASA, 1992. p. 35-46. (Special Publication, 29).

SANTOS, G. A. et al. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênesis, 2008. v. 2.

SAS. **SAS Software**. Version 9.1. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 1999.

SCHROEDER, M. S.; JANOS, D. P. Phosphorus and intraspecific density alter plant responses to arbuscular mycorrhizas. **Plant Soil**, n. 264, p. 335–348, 2004.

SCHUBERT, A.; LUBRACO, G. Mycorrhizal inoculation enhances growth and nutrient uptake of micropropagated apple rootstocks during weaning in commercial substrates of high nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, v. 15, p. 113-118, 2000.

SCHUBER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Micol.Res.**, v. 105, p. 1413–1421, 2001.

SEVEGNANI, Lucia; SANTOS, Jorgeane. Contribuição à ecologia das planícies aluviais do Rio Itajaí-Açu: relações entre cotas de inundações e espécies vegetais. In **Revistas de Estudos Ambientais**. FURB: Janeiro/Abril, 2000. Disponível em: <http://www.casan.com.br/docs/Projeto_Mata_ciliar.pdf>. Acesso em: 03 nov. 2011.

SHARMA, N. et al. Effect of NaCl salinity on photosynthetic rate, transpiration rate, and oxidative stress tolerance in contrasting wheat genotypes. **Photosynthetica**, v. 43, p. 609-613, 2005.

SHARMA, S.; ADHOLEYA, A. Hexavalent chromium reduction in tannery effluent by bacterial species isolated from tannery effluent contaminated soil. **Journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, p. 142-154, 2012.

SHARPLEY, A. Identifying sites vulnerable to phosphorous loss in agricultural runoff. . **Journal of Environmental Quality**, v. 24, p. 947-951, 1995.

SIEVERDING, E. **Vesicular–arbuscular mycorrhiza management in tropical agroecosystems:** deutsche gesellschaft fur technische zusammenarbeit, Bremer, Germany, 1991.

SIKES, B. A., KOTTENIE, K. KLIRONOMOS, J. N. Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas. **Journal of Ecology**, v. 97, p. 1274-1280, 2009.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, n. 2, p. 311-329, 2000.

SILVA, E. M. R. da; SAGGIN JIUNIOR, O. J. Estrategias biológicas para la recuperación de áreas degradadas.In: ASCONEGUI, M. A. M. de; GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; MIYAZAKI, S. S. **Biología del suelo: transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos.** Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 2004. p. 13-16.

SILVEIRA, A. P. D.; GOMES, V. F. F. Micorrizas arbusculares em plantas frutíferas tropicais. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS. S. S. (Ed.). **Microbiota do solo e qualidade ambiental.** Campinas: Instituto Agronômico, 2007. p. 57-78.

SIMS, J. T. et al. Phosphorus: agriculture and the environment. **American Society of Agronomy**, p. 263-316. 2005.

SINGH, B. R.; LAL, R. Phosphorus Management in Low-Input Agricultural Systems. In: Sims, J.T. et al. **Phosphorus**. agriculture and the environment. American Society of Agronomy, 2005. p. 729-760.

SINGH, C.; SHARMA, A. K.; JOHRI, B. N. Host genotype determines the impact of soil phosphorus on arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize (*Zea mays* L.). **Symbiosis**, v. 33, p. 145-164, 2002.

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

SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN JÚNIOR, O. J. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. **Mycorrhiza**, Heidelberg, v. 11, n. 5, p. 245-255, 2001.

SIQUEIRA, J.O.; COLOZZI FILHO, A.; OLIVEIRA, E. Ocorrência de micorrizas vesicular-arbuscular em agro e ecossistemas do Estado de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, p. 1499-1506, 1989.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo**. MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, Brasília, p. 125-177, 1988.

SIQUEIRA, J. O. et al. Crescimento de mudas e produção do cafeeiro sob influência de fungos micorrízicos e superfosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 17, p. 53-60, 1993.

SIQUEIRA, J. O. et al. Micorrizas e degradação do solo: caracterização, efeitos e ação recuperadora. In: CERETTA, C. A; SILVA, L. S.; REICHERT, J. M. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 219-306.

SIQUEIRA, J. O. et al. Mycorrhizal colonization and mycotrophic growth of native woody species as related to successional groups in Southeastern Brazil. **For. Ecol. Manag.**, v. 107, p. 241-252, 1998.

SMITH, S. E; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 3rd. ed. San Diego, Academic Press. CA, 2008.

SOUCHIE E. L et al. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. **An AcadBras Cienc**, v. 78, p. 1-11, 2006.

SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilizadores de fosfatos *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, n. 23, p. 53-60, 2007.

SOUCHIE, E. L et al Mudas de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. Curitiba, **Floresta**, v. 35, n. 2, p. 329-334, Mai/Ago. 2005.

SOUZA, L. A. G. et al. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 207-217, 2008.

ST-ARNAUD, M., C. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of the host roots. **Mycol. Res.**, v. 100, p. 328-332, 1996.

STAUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Fósforo essencial para a vida. In: YAMADA, T.; BADALLA, S. R. S. SIMPÓSIO FÓSFORO NA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2004, Piracicaba. **Anais ...** Piracicaba: Potatos, p. 1-11.

STRULLU, D. G.; ROMAND, C. Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci. Vie, v. 303, p. 245-250, 1986.

SYLVESTER-BRADLEY, R., et al. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. **Acta Amazonica**, v. 12, p. 15-22, 1982.

SYLVIA, D. M.; HUBBELL, D. H. Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. **Symbiosis**, v. 1, p. 259-267, 1986.

SYLVIA, D. M.; JARSTFER, A. G. **The production and introduction of arbuscular mycorrhizal fungi in the native plant nursery.** Florida Agricultural Experiment Station. Florida, 1992.

SYLVIA, D. M.; JARSTFER, A. G. Production of inoculum and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. In: Robson, A. D.; Malajczuk, N. (eds). **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry.** Dordrecht: Academic Publishers, 1994. p. 231-238.

SYLVIA, D. M.; SCHENCK, N. C. Germination of chlamydospores of three Glomus species as affected by soil matric potential and fungal contamination. New York, **Mycologia**, v. 75, p. 30-35, 1983.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiología vegetal.** 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TISDALE, S. L. Elements required in plant nutrition in soil fertility and fertilizers. NY: **McMillan Publishing Co.,** p. 48-49, 1993.

TIWARI, P.; ADHOLEYA, A. In vitro co-culture of two AMF isolates Gigaspora margarita and Glomus intraradices on Ri T-DNA transformed roots. **FEMS microbiology letters**, v. 206, n. 1, p. 39-43, 2002.

TORO, M.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock phosphate bioavailability (P32) and nutrient cycling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 11, p. 4408-4412, 1997.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ, V. et al. **Tópicos em ciência do solo.** Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. v. 2, p. 195-276.

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

TUCCI, C. E. M. **Águas doces no Brasil:** capital ecológico, uso e conservação: água no meio urbano. São Paulo, SP: Escrituras , 1999.

VANDAME, P. et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate of roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, p. 507-512, 2002.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agroindustrial wastes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, p. 435-440, 2003.

VAZQUEZ, P. et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biol. Fertil Soils**, v. 30, p. 460-468, 2000.

VERMA, S. C., LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promotion and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **J.Biotechnol**, v. 91, p. 127-141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria.** Oxford: Blackwell, 1970.

VIVAS, A. et al. Two bacterial strains isolated from a Zn-polluted soil enhance plant growth and mycorrhizal efficiency under Zn-toxicity. **Chemosphere**, v. 62, p. 1523-1533, 2006.

VOETS, L. et al. Development of an autotrophic culture system for the in vitro mycorrhization of potato plantlets. **FEMS Microbiol Lett**, v. 248, p. 111-118, 2005.

VONDERWELL, J. D; ENEBAK, S. A. Differential effects of rhizobacterial strain and dose on the ectomycorrhizal colonization of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, v. 46, p. 437-441, 2000.

WHITE LAW, M. A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99-151, 2000.

- WHITELAW, M. A.; HARDEN, T. J.; HELYAR, K. R. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. Oxford, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 655-665, 1999.
- WILSON G. W.; HARTNETT, T. D. C. Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. **American Journal of Botany**, v. 85, p. 1732-1738, 1998.
- WILSON, G. W. T.; HARTNETT, D. C. Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in prairie grasses and forbs. **American Journal of Botany**, v. 85, p. 1732-1738, 1998.
- WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; XIA, R. X. Effects of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. **Eur. J. Soil Biol.**, v. 42, p. 166-172, 2006.
- ZAHRAN, H. H. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 143-153, 2001.
- ZAIDI, P. H et al. Resilient maize for improved and stable productivity of rain-fed environment of South and South-East Asia. Maize for Asia - emerging trends and technologies. **Proc. 10th Asian Regional Maize Workshop**, p. 20-23, 2009.
- ZANGARO, W.; NOGUEIRA, M. A.; ANDRADE, G. Arbuscular mycorrhizal fungi used as biofertilizers in revegetation programmes. In: MAHENDRA. Rai (Org.). *Dvances in Fungal Biotechnology*. 1 ed. New Delhi: I.K. **International Publishing House Pvt. Ltd.**, v. 1, p. 351-378, 2009.
- ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.
- ZOBEL, R. W.; TREDICE, P. D.; TORREY, J. G.. Methods for growing plants aeroponically. **Plant Physiology**, v. 57, p. 344-346, 1976.

ZUCARELI, C. et al. Adubação fosfatada, componentes de produção, produtividade e qualidade fisiológica em sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 01, p. 5-15, 2006.