



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

INGRID ALEXSSANDRA NERIS LINO

**BIOINSUMOS MICROBIANOS NO DESENVOLVIMENTO DO
FEIJÃO-CAUPI E SEU POTENCIAL IMPACTO NA MICROBIOTA
AUTÓCTONE DO SOLO**

**Recife
2018**

INGRID ALEXSSANDRA NERIS LINO

**BIOINSUMOS MICROBIANOS NO DESENVOLVIMENTO DO
FEIJÃO-CAUPI E SEU POTENCIAL IMPACTO NA MICROBIOTA
AUTÓCTONE DO SOLO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Micologia básica e aplicada

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Mayumi Yano-Melo

Coorientadoras: Prof.^a Dr.^a Leonor Costa Maia

Prof.^a Dr.^a Lindete Míria Vieira Martins

**Recife
2018**

Catálogo na fonte
Elaine C Barros CRB4/1728

Lino, Ingrid Alexssandra Neris

Bioinsumos microbianos no desenvolvimento do feijão-caupi e seu potencial impacto na microbiota autóctone do solo / Ingrid Alexssandra neris Lino – 2018.

99 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Adriana Mayumi Yano de Melo

Coorientadoras: Leonor Costa Maia e Lindete Mária Vieira Martins

Tese (doutorado) – Universidade federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de fungos. Recife, 2018. Inclui referências.

1. Fungos micorrízicos-arbusculares 2. *Vigna unguiculata* 3. Enzimas
I. Yano-Melo, Adriana Mayumi (orient.) II. Maia, Leonor Costa (coorient.) III. Martins, Lindete Mária Vieira (coorient.) IV. Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019-325

INGRID ALEXSSANDRA NERIS LINO

**BIOINSUMOS MICROBIANOS NO DESENVOLVIMENTO DO
FEIJÃO-CAUPI E SEU POTENCIAL IMPACTO NA MICROBIOTA
AUTÓCTONE DO SOLO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 31/08/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr.^a Adriana Mayumi Yano-Melo – (Orientadora)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Dr. Antônio Félix da Costa – (Examinar Externo)
Instituto Agronômico de Pernambuco- IPA

Prof^a Dr.^a Carolina Etiene de R. Silva Santos – (Examinador externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr.^a Iolanda Ramalho da Silva – (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr.^a Gabriella Frosi – (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Ao Deus vivo
Digno de toda honra e glória
Ofereço.

Ao meu esposo Thiago Correia,
à minha filha Isis Valentina
e à minha amiga Danielle Karla
Dedico essa obra.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Ser Supremo, pela dádiva de estar viva e saudável, por ter me acolhido como filha, por estar atento às minhas orações e súplicas, por derramar bênçãos de força e consolo nos momentos difíceis da minha vida e por ter me permitido viver todos os milagres que eu vivi.

Ao meu marido Thiago Correia pelo imenso amor, companheirismo, preocupação, pelos abraços de conforto, pelos momentos de cumplicidade, por não ter desistido de mim, pelo respeito durante esses quatorze anos que estamos juntos e pelo apoio e incentivo nas minhas realizações.

Aos meus pais, José Alexandre e Verônica Maria, e à minha sogra, Sueli Araújo por sempre acreditarem e apoiarem os meus sonhos, pela educação, pela torcida, por darem o abraço, o aconchego e o carinho à minha filha quando eu não pude dar. Às minhas irmãs Thacianna e Stephanie pelos momentos maravilhosos que passamos juntas, pelo carinho e brincadeiras que confidenciamos.

À minha amiga Danielle Karla, por sua contribuição inominável na construção e realização da Tese. Por sua amizade, seus ensinamentos, sua orientação, seus conselhos, seu apoio, seu incentivo, por acreditar em mim, quando nem eu mesma acreditava.

Aos familiares que entenderam esse momento importante na minha vida.

À Fundação de Amparo à ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco -FACEPE pela bolsa de estudos.

À profa. Adriana Mayumi Yano-Melo, pela orientação e construção do projeto de doutorado, pelas sugestões sempre pertinentes e por todo o apoio, o qual me permitiu concluir essa importante etapa acadêmica.

Às professoras Leonor Costa Maia e Lindete Míria Vieira Martins pela co-orientação, sugestões, apoio e amizade.

Ao Dr. Fritz pelo ensinamento e ajuda na identificação morfológica dos glomerosporos e ao Dr. Antônio Felix pela concessão da cultivar Miranda IPA 207.

Aos estagiários Marco Aurélio e Ubirajara pela ajuda na manutenção dos experimentos e realização de análises.

Aos amigos do Laboratório de Micorrizas, em especial, a Joana Suassuna, pela amizade, e a Indra Elena Escobar pela ajuda na análise dos dados, na etapa de atividade microbiana (respiração celular, atividade enzimática) e conselho na discussão dos artigos.

Por fim, a todos os que de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“Melhor é o fim das coisas do que o princípio delas.”

Eclesiastes 7: 8

RESUMO

Considerando os importantes impactos da inoculação com micro-organismos no solo e na plantas, avaliaram-se os potenciais impactos da inoculação micorrízica, combinada ou não com bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), na performance do feijão-caupi (BRS Pujante e Miranda IPA 207 estabelecidos, respectivamente, nos solos: Neossolo Fluvico e Argiloso Vermelho Amarelo distrófico), em conjunto aos efeitos no solo, em especial na comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Na primeira etapa da Tese, realizou-se um experimento em delineamento inteiramente casualizado com 17 tratamentos: quatro com FMA, três com BFN, seis com FMA+BFN, dois com fósforo, um com nitrogênio e um controle, em cinco repetições. Avaliaram-se: o crescimento e conteúdo nutricional da planta, a colonização micorrízica, o número de glomerosporos, as assembleias de FMA e índices ecológicos (diversidade de Shannon, equitabilidade de Pielou e índice de dominância de Simpson). Observou-se que os isolados microbianos diferiram quanto aos efeitos no crescimento e nas taxas de colonização da variedade BRS Pujante. Em geral, a expansão foliar e a colonização micorrízica foram maiores quando a inoculação com FMA é isolada ou combinada com BFN (BR3267). A introdução do *Acaulospora longula* promoveu mudanças na estrutura da comunidade de FMA, apresentando similaridade das assembléias micorrízicas. Na segunda etapa da Tese, dois ensaios sendo um em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos (três de inoculação e um controle) e o segundo em um delineamento fatorial duplo + 1 tratamento adicional (controle), foram considerados para avaliar a performance da planta no primeiro e no segundo ciclo da cultura, respectivamente. Observou-se que no primeiro ciclo não houve benefício da inoculação. A inoculação consecutiva favoreceu a fase de floração, as taxas de colonização micorrízica e o número de folhas, sugerindo que os benefícios advindos da micorrização são evidenciados após o segundo ciclo. A biomassa vegetal das plantas foi favorecida pela reinoculação quando comparada às plantas não-reinoculadas. Ainda na segunda etapa da Tese foi considerada a análise dos atributos bioquímicos e ecológicos do solo em resposta a inoculação com isolado de *Gigaspora albida*, com delineamento em arranjo fatorial 4x3 (quatro tratamentos de inoculação vs. três ciclos da cultura). Observou-se que a curto prazo: a inoculação promoveu um impacto indireto na diversidade de FMA ao gerenciar mudanças na população mais abundante (*Glomus macrocarpum*). A inoculação consecutiva promoveu efeito direto na abundância da espécie (*G. albida*), na riqueza e nos propágulos infectivos de FMA do solo,

como também, no carbono da biomassa microbiana. O feijão-caupi apresenta respostas diferentes à inoculação com isolados de FMA alóctones (combinados ou não com BFN) sendo sua expansão foliar e colonização radicular facilmente favorecidas pela inoculação micorrízica. As assembleias micorrízicas são influenciadas direta e indiretamente pela introdução de bioinsumos (BFN e FMA), modificando a estrutura e composição da comunidade nativa, com estabelecimento significativo dos isolados de FMA introduzidos, especialmente *A. longula* e *G. albida*. Este estabelecimento na comunidade nativa, observado com a inoculação com *G. albida* após ciclos consecutivos, pode contribuir com o aumento da riqueza de espécies de FMA e aporte de carbono da biomassa microbiana.

Palavras-Chaves: *Vigna unguiculata*. Diversidade. Enzimas.

ABSTRACT

It was evaluated the potential impacts of mycorrhizal inoculation, combined or not with nitrogen fixing bacteria (NFB), in the performance of cowpea (BRS Pujante and Miranda IPA 207 established respectively, in the soils: Fluvisol and Lixisols), joint with the soil effects, especially in the arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities. In the first stage of the thesis, a completely randomized experiment was carried out with 17 treatments: four with AMF, three with NFB, six with AMF+NFB, two with phosphorus, one with nitrogen and one control, with five repetitions. Plant growth and nutritional content, mycorrhizal colonization, number of glomerospores, AMF assemblages and ecological indexes (Shannon diversity, Pielou equitability and Simpson's index of dominance) were evaluated. It was observed that the microbial isolates differed regarding the effects on growth and colonization rates of BRS Pujante. In general, leaf expansion and mycorrhizal colonization were greater when AMF inoculation was isolated or combined with NFB (BR3267). The introduction of *Acaulospora longula* promoted changes in AMF community structure, presenting similarity of mycorrhizal assemblages. In the second stage of the thesis, a completely randomized experimental design with four treatments (three of inoculation and one control) and a double factorial design + 1 additional treatment (control) were considered to evaluate the performance of the plant in the first and second cycle of culture, respectively. It was observed that in the first cycle there was no benefit of the inoculation. The consecutive inoculation favored the flowering phase, the mycorrhizal colonization rates and the number of leaves, suggesting that the benefits of mycorrhization are evidenced after the second cycle. Plant biomass was favored by reinoculation when compared to non-reinoculated plants. Also in the second stage of the thesis, it was considered the analysis of the biochemical and ecological attributes of the soil in response to inoculation with *Gigaspora albida* isolate, with a 4x3 factorial arrangement (four inoculation treatments and three crop cycles). It was observed that

in the short term: inoculation promoted an indirect impact on AMF diversity by managing changes in the most abundant population (*Glomus macrocarpum*). Consecutive inoculation promoted a direct effect on the abundance of the species (*G. albida*), on the richness and the infective propagules of AMF from the soil, as well as on the microbial biomass carbon. Cowpea presents different responses to inoculation with isolates of AMF allochthonous (combined or not with NFB) and its foliar expansion and root colonization are easily favored by mycorrhizal inoculation. Mycorrhizal assemblages are influenced directly and indirectly by the introduction of bioinputs (NFB and AMF), modifying the structure and composition of the native community, with significant establishment of the introduced AMF isolates, especially *A. longula* and *G. albida*. This establishment in the native community observed with the inoculation with *G. albida* after consecutive cycles, can contribute with the increase of the AMF species richness and the microbial biomass carbon.

Key-words: *Vigna unguiculata*; diversity; enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Distribuição da produção de feijão-caupi por continente.....	23
Figura 2 -	Glomalina produzida em hifas e esporos de FMA no solo e nas raízes.....	28
Figura 3 -	Potenciais efeitos da inoculação com FMA. Efeitos e resultados funcionais que são potencialmente mediados pela presença de uma comunidade nativa. Em asterisco, encontram-se hipóteses que devem ser analisadas por investigação experimental.....	37
Figura 4 -	Identificação morfológica dos FMA baseada na morfologia dos esporos.....	41
Figura 5 -	Percentual de colonização micorrízica em plantas de feijão-caupi (BRS Pujante) inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (AL: <i>A. longula</i> ; CE: <i>C. etunicatum</i> ; GA: <i>G. albida</i>) e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio (BR3267 e BR3296), após 45 dias da semeadura em casa de vegetação; fonte de p*: 0,0825 g; NI: não inoculado; fonte de p**: 0,165 g; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.....	55
Figura 6 -	Número de glomerosporos em solo com plantas de feijão-caupi (BRS Pujante) inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (AL: <i>A. longula</i> ; CE: <i>C. etunicatum</i> ; GA: <i>G. albida</i>) e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio (BR3267 e BR3296), após 45 dias da semeadura em casa de vegetação; fonte de p*: 0,0825 g; NI: não inoculado; fonte de p**: 0,165 g; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.....	55

Figura 7 - Análise de escalonamento multidimensional (MDS) baseado na comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na rizosfera de feijão-caupi provenientes de solo inoculado com FMA e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio após 45 dias da semeadura em casa de vegetação. T1: *A. longula* (AL); T2: *C. etunicatum* (CE); T3: *G. albida* (GA); T4: MIX FMA (AL+CE+GA); T5: Rizóbio BR3267; T6: Rizóbio BR3296; T7: MIX Rizóbio (BR3267 + BR3296); T8: AL + BR3267; T9: AL + BR3296; T10: CE + BR3267; T11: CE + BR3296; T12: GA + BR3267; T13: GA + BR3296; T14: 0,0825 g DE P; T15: N (UREIA); T16: Controle (não inoculado); T17: 0,165 g De P; NT: Solo nativo em pousio..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tratamentos de inoculação e de fertilização.....	47
Tabela 2 -	Tratamentos de inoculação testados no segundo ciclo de crescimento da cultura.....	49
Tabela 3 -	Área foliar, teores de P e de N da parte aérea de plantas de feijão-caupi (BRS Pujante) inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), após 45 dias da semeadura em casa de vegetação.....	54
Tabela 4 -	Coefficiente de correlação de Pearson entre as variáveis.....	56
Tabela 5 -	Espécies e abundância de FMA isolados do solo inicial e do solo inoculado com FMA e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio, após 45 dias da semeadura em casa de vegetação.....	58
Tabela 6 -	Índice de diversidade de Shannon, dominância e equitabilidade de Pielou referentes à comunidade de FMA do solo em pousio e do solo inoculado com FMA e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio, após 45 dias da semeadura em casa de vegetação.....	60
Tabela 7 -	Crescimento, concentração de nutrientes e colonização micorrízica de feijão-caupi em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares alóctones, em solo não esterilizado, após o primeiro ciclo da cultura.....	63
Tabela 8 -	Crescimento do feijão-caupi em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares alóctones, em solo não esterilizado, após o segundo ciclo da cultura.....	64

Tabela 9 -	Porcentagens de nutrientes da biomassa seca aérea e taxas de colonização micorrízica de plantas de feijão-caupi em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares alóctones, em solo não esterilizado, após o segundo ciclo da cultura.....	65
Tabela 10 -	Identificação e abundância de táxons de FMA isolados do solo controle (sem inoculação) e do solo inoculado com <i>Gigaspora albida</i> no primeiro ciclo (GAP), em ciclos alternados (GAL) e em todos os ciclos (GAT) do feijão-caupi.....	68
Tabela 11 -	Abundância de <i>Gigaspora albida</i> e de <i>Glomus macrocarpum</i> e riqueza de FMA dos solos controle (sem inoculação) e inoculados com <i>G. albida</i> no primeiro ciclo (GAP), no primeiro e terceiro ciclo (GAL) e em todos os ciclos (GAT) do feijão-caupi.....	70
Tabela 12 -	Número de glomerosporos (GLO) e índice de diversidade de Shannon do solo controle (sem inoculação) e dos solos inoculados com <i>G. albida</i> no primeiro ciclo (GAP), no primeiro e terceiro ciclo (GAL) e em todos os ciclos (GAT) do feijão-caupi.....	70
Tabela 13 -	Número mais provável de propágulos infectivos de FMA no final do terceiro ciclo, em solo controle e em solo inoculado com <i>G. albida</i> uma vez (GAP), duas vezes (GAL) e três vezes (GAT) em rizosfera de feijão-caupi.....	71
Tabela 14 -	Carbono (C-BM) e respiração (C-CO ₂) da biomassa microbiana e o coeficiente metabólico correspondentes aos solos controle e inoculados com <i>G. albida</i> no primeiro ciclo (GAP), no primeiro e terceiro ciclo (GAL) e em todos os ciclos (GAT).....	72
Tabela 15 -	Atividade da Fosfatase ácida e da β-glucosidase em solo controle (sem inoculação) e em solos inoculados com <i>G.</i>	

albida, no primeiro ciclo (GAP), no primeiro e terceiro ciclo (GAL) e em todos os ciclos (GAT) do feijão-caupi.....

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	OBJETIVOS.....	22
1.1.1	Objetivo Geral.....	22
1.1.2	Objetivos Específicos.....	22
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
2.1	FEIJÃO-CAUPI.....	23
2.2	BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO.....	25
2.3	FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA).....	27
2.3.1	Inoculantes micorrízicos.....	30
2.4	INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM CULTURAS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA.....	32
2.5	DUPLA INOCULAÇÃO EM CULTURAS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA.....	34
2.6	EFEITO DA INOCULAÇÃO MICORRÍZICA NA DIVERSIDADE DE FMA NATIVOS DO SOLO.....	36
2.6.1	Índices ecológicos.....	40
2.7	EFEITO DA INOCULAÇÃO COM FMA NA BIOMASSA E ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO.....	42
3	MÉTODO.....	45
3.1	MÉTODOS GERAIS.....	45
3.1.1	Inoculantes micorrízicos.....	45
3.1.2	Análises de crescimento e nutricionais das plantas.....	45
3.1.3	Colonização micorrízica.....	45
3.1.4	Extração e contagem de glomerosporos.....	45
3.1.5	Identificação morfológica dos glomerosporos e contagem por espécies.	46
3.2	ARTIGO 1 - ESTRUTURA DE ASSEMBLEIAS MICORRIZICAS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA RIZOSFERA DE FEIJÃO-CAUPI E CRESCIMENTO DESTA LEGUMINOSA APÓS INOCULAÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES NO SOLO.....	46

3.2.1	Condições experimentais e coleta do solo.....	46
3.2.2	Inoculante bacteriano.....	46
3.2.3	Delineamento experimental.....	46
3.2.4	Análises complementares de crescimento vegetal.....	47
3.2.5	Contagem dos nódulos bacterianos.....	47
3.2.6	Índices ecológicos.....	47
3.2.7	Análise dos Dados.....	48
3.3	ARTIGO 2 - PERFORMANCE DE <i>Vigna unguiculata</i> [L] Walp EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ALÓCTONES EM CICLOS CONSECUTIVOS.....	48
3.3.1	Condições experimentais.....	48
3.3.2	Delineamento experimental.....	49
3.3.3	Análises complementares da planta.....	49
3.3.4	Análise dos dados.....	49
3.4	ARTIGO 3 - POTENCIAL IMPACTO DA INOCULAÇÃO COM GIGASPORA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DIVERSIDADE E PROPÁGULOS INFECTIVOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM CICLOS CONSECUTIVOS DE FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS.....	50
3.4.1	Condições experimentais.....	50
3.4.2	Delineamento experimental.....	50
3.4.3	Análises microbiológicas.....	51
3.4.3.1	Número de propágulos infectivos de FMA.....	51
3.4.3.2	Carbono da biomassa microbiana (C-BM).....	51
3.4.3.3	Respiração edáfica basal (C-CO ₂).....	51
3.4.3.4	Coeficiente metabólico q_{CO_2}	51
3.4.3.5	Atividade da fosfatase ácida.....	52
3.4.3.6	Atividade da β -glucosidase.....	52
3.4.3.7	Análise dos dados.....	52
4	RESULTADOS.....	53
4.1	ARTIGO 1 – ESTRUTURA DE ASSEMBLEIAS MICORRIZICAS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA RIZOSFERA DE FEIJÃO-CAUPI E CRESCIMENTO DESTA LEGUMINOSA APÓS	

	INOCULAÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES NO SOLO.....	53
4.2	ARTIGO 2 – PERFORMANCE DE <i>Vigna unguiculata</i> [L] Walp EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ALÓCTONES EM CICLOS CONSECUTIVOS.....	61
4.3	ARTIGO 3 – POTENCIAL IMPACTO DA INOCULAÇÃO COM GIGASPORA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DIVERSIDADE E PROPÁGULOS INFECTIVOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM CICLOS CONSECUTIVOS DE FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS.....	66
5	DISCUSSÃO.....	74
5.1	ARTIGO 1 – ESTRUTURA DE ASSEMBLEIAS MICORRIZICAS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA RIZOSFERA DE FEIJÃO-CAUPI E CRESCIMENTO DESTA LEGUMINOSA APÓS INOCULAÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES NO SOLO.....	74
5.2	ARTIGO 2 – PERFORMANCE DE <i>Vigna unguiculata</i> [L] Walp EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ALÓCTONES EM CICLOS CONSECUTIVOS.....	77
5.3	ARTIGO 3 – POTENCIAL IMPACTO DA INOCULAÇÃO COM GIGASPORA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DIVERSIDADE E PROPÁGULOS INFECTIVOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM CICLOS CONSECUTIVOS DE FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS.....	79
6	CONCLUSÕES.....	83
6.1	ARTIGO 1 – ESTRUTURA DE ASSEMBLEIAS MICORRIZICAS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA RIZOSFERA DE FEIJÃO-CAUPI E CRESCIMENTO DESTA LEGUMINOSA APÓS INOCULAÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES NO SOLO.....	83
6.2	ARTIGO 2 – PERFORMANCE DE <i>Vigna unguiculata</i> [L] Walp EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ALÓCTONES EM CICLOS CONSECUTIVOS.....	83

6.3	ARTIGO 3 – POTENCIAL IMPACTO DA INOCULAÇÃO COM GIGASPORA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DIVERSIDADE E PROPÁGULOS INFECTIVOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM CICLOS CONSECUTIVOS DE FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS.....	84
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
	REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], pertencente à família Fabaceae, constitui importante fonte de proteína na dieta de países em desenvolvimento, sendo cultivado em solos pouco férteis e com baixo teor de nutrientes (BALLESTEROS-ALMANZA *et al.*, 2010). Esta leguminosa é uma das mais importantes no cenário agrícola mundial, permitindo ao Brasil destaque como um dos maiores produtores e consumidores da cultura no continente latino-americano (FAO, 2016). O Nordeste brasileiro é o maior produtor e consumidor de feijão-caupi de todo o país, com estimativa de produção de 177.527 mil toneladas (EMBRAPA, 2017). As produções ocorrem nas áreas rurais, onde o cultivo desempenha importante papel socioeconômico na agricultura familiar, especificamente (COSTA *et al.*, 2013; REGO *et al.*, 2015; CRUZ *et al.*, 2017). O baixo custo de produção aliado à possibilidade de bons rendimentos são os principais atrativos para o seu cultivo (EMBRAPA, 2016).

O feijão-caupi forma associações com micro-organismos do solo que além de propiciarem melhores condições de crescimento e desenvolvimento, o beneficiam nutricionalmente (MARINHO *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2017). Entre os micro-organismos do solo, destacam-se as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), ambos atuam em processos diferentes e importantes para o ambiente agrícola. As BFN induzem a formação de nódulos nas raízes de leguminosas e são comumente conhecidas como rizóbios, possibilitando a fixação biológica do N que, por sua vez, é disponibilizado à planta. As BFN chegam a anular ou amenizar a limitação imposta pelo N às culturas (ARAÚJO *et al.*, 2007; CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010). Os FMA são simbioses benéficos do solo que formam as micorrizas arbusculares com a maioria das plantas terrestres. O funcionamento dessa simbiose se baseia na troca de serviços, onde o fungo fornece importantes nutrientes minerais (tais como o P e N) e recebe carboidratos e lipídios (BONFANTE & GENRE, 2010; RICH *et al.*, 2017).

A expansão da agricultura requer o desenvolvimento de práticas agrícolas que incrementem a produtividade vegetal e que tenham baixo impacto ambiental e o uso de micro-organismos no alcance desses objetivos tem sido indispensável (OMIROU *et al.*, 2016; MARINHO *et al.*, 2017; IGIEHON & BABALOLA, 2017).

A combinação de BFN e FMA pode atuar de forma positiva na melhoria das condições da planta e do solo (DE CARVALHO & MOREIRA, 2010; YASMEEN *et*

al., 2012; ORDOÑEZ *et al.* 2016; HARO *et al.*, 2018), justificando a busca por combinações eficientes de isolados para plantas de interesse agrícola. No entanto, a busca por maior produtividade vegetal faz com que os benefícios da inoculação com micro-organismos nas plantas recebam mais atenção do que os efeitos na estrutura, no funcionamento e na diversidade microbiana do solo.

Embora o uso de inoculantes seja uma prática atraente, deve-se considerar que se trata de organismos vivos e as promessas de melhoria no desempenho do vegetal, proporcionadas pelos inoculantes, não deveriam se sobrepor à saúde e à qualidade do solo, uma vez que esse recurso é importante para a produção de alimentos e pode ser exaurido.

Os efeitos da introdução de micro-organismos exóticos na diversidade microbiana nativa do solo têm sido discutidos (ANTUNES *et al.*, 2009; KOCH *et al.*, 2011; TRABELSI & MHAMDI, 2013), especialmente sobre a estrutura e composição da comunidade nativa de grupos funcionais, *i.e.* de FMA, que influenciam fortemente o desempenho e a diversidade da comunidade vegetal e a estruturação do solo (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1998; RILLIG *et al.*, 2004; BRAGHIROLI *et al.*, 2012; TURRINI *et al.*, 2018).

Estudos direcionados à comunidade de FMA têm contribuído no entendimento das mudanças no solo ocasionadas pelos manejos adotados nos sistemas agrícolas (BALOTA & LOPES, 1994; KÖHL *et al.*, 2014; PONTES *et al.*, 2017). Informações a seu respeito são relevantes não só por ampliar a compreensão da distribuição dos fungos e seus serviços ecossistêmicos (KÖHL *et al.*, 2014; OEHL *et al.*, 2017) como também, por fornecer dados de FMA eficientes a serem utilizados como inoculantes (TURRINI *et al.*, 2018).

A diversidade de FMA está suscetível aos manejos adotados nos sistemas agrícolas (KÖHL *et al.*, 2014) e mudanças na sua riqueza e composição podem ser conhecidas por meio da identificação morfológica dos glomerosporos extraídos do solo (OEHL *et al.*, 2017). A identificação baseada na morfologia tem ampliado o registro de espécies presentes em sistemas agrícolas, superando, inclusive registros por métodos moleculares (WETZEL *et al.*, 2014; OEHL *et al.*, 2017). Nesse sentido, a aplicação de índices ecológicos tem ajudado a compreender se as mudanças na riqueza e abundância das espécies são significativas ou não, permitindo que o objetivo do manejo seja alcançado na produção agrícola e a diversidade micorrízica local seja mantida ou ampliada.

Mudanças nas propriedades biológicas do solo após a inoculação micorrízica também não são bem conhecidas e considerando a importância da atividade dos microrganismos do solo para o funcionamento do ecossistema (KÖHL *et al.*, 2014), a compreensão dos mecanismos que alteram sua atividade e funcionalidade é altamente relevante, especialmente quando se almeja a sustentabilidade e o uso prolongado do solo. Entre os diversos índices microbiológicos e bioquímicos sensíveis a alterações no solo, destacam-se: a biomassa microbiana, a respiração basal do solo, o coeficiente metabólico e a atividade enzimática (β -glucosidase e Fosfatase ácida).

No intuito de ampliar o conhecimento sobre: a) as mudanças na composição e diversidade da comunidade nativa de FMA em resposta à introdução de isolados exóticos (FMA e/ou BFN), b) se isolados microbianos modificam, significativamente, a riqueza, a abundância das espécies de FMA e a atividade biológica do solo ao longo dos ciclos reprodutivos, e c) se as respostas de crescimento e desenvolvimento da planta são resultados direto da ação dos organismos aplicados ou de um efeito indireto, por meio de mudanças na comunidade nativa, dividiu-se a presente tese em duas etapas e, testaram-se as seguintes hipóteses:

Etapa 1 - a) A introdução de isolados exóticos de FMA, combinados ou não com BFN, afeta a estrutura e a composição das assembleias da comunidade nativa de FMA, e b) Os isolados microbianos diferem quanto aos efeitos no crescimento do feijão-caupi (cultivar BRS Pujante), os quais são maximizados quando a inoculação é com ambos os inoculantes (FMA e rizóbio) (Artigo 1).

Etapa 2 – a) A aplicação de inóculos de FMA alóctones é eficiente em promover o crescimento de feijão-caupi (Miranda IPA 207) em solo não desinfestado e b) A reinoculação com FMA favorece o crescimento de feijão-caupi (Artigo 2); c) Estudos de inoculação micorrízica realizados por mais de um ciclo em feijão-caupi (Miranda IPA 207) ajudam a esclarecer os potenciais efeitos da inoculação no solo, d) A inoculação micorrízica favorece os atributos biológicos e bioquímicos do solo com o tempo; e, e) Aplicações repetitivas de inoculante promovem mudanças mais significativas na estrutura das assembleias de FMA como maior abundância da espécie introduzida do que aplicações alternadas ou realizadas apenas uma vez (Artigo 3).

Uma análise ampla dos potenciais efeitos dos inoculantes microbianos em diversos aspectos ambientais e ecológicos (desempenho da planta - diversidade e comunidade de FMA - atividade biológica e enzimática do solo) é difícil, sendo crucial a contribuição de vários pesquisadores na interpretação dos dados. Embora complexos,

os estudos de inoculação e comunidade autóctone contribuem com informações e dados relevantes a serem considerados na adoção de práticas agronômicas que visam a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, não podendo mais ser negligenciados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a performance do feijão-caupi em resposta à inoculação microbiana e os potenciais impactos da inoculação na comunidade de FMA e na atividade biológica e bioquímica do solo, em condições de microcosmos.

1.1.2 Objetivos Específicos

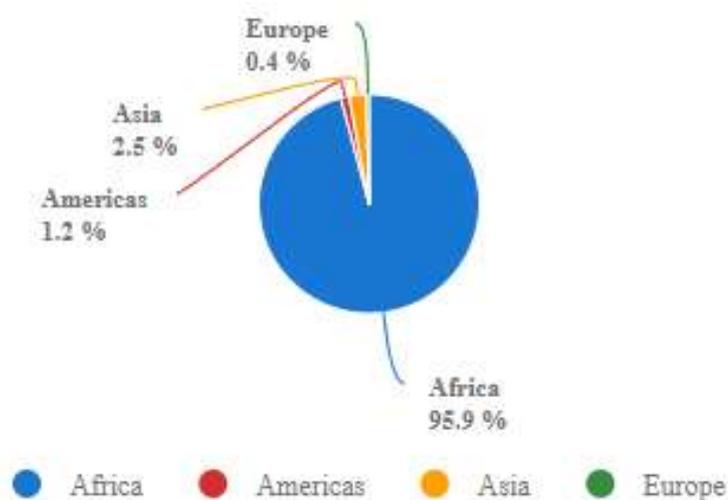
- a) Verificar se a coinoculação ou a inoculação isolada (FMA e BFN) é eficiente em incrementar o crescimento do feijão-caupi em solo com comunidade microbiana autóctone.
- b) Investigar se a introdução de isolados exóticos de FMA, combinados ou não com BFN, promovem mudanças na comunidade nativa de FMA.
- c) Avaliar se há diferença na colonização micorrízica e na performance de plantas inoculadas ou não, em ciclos consecutivos.
- d) Determinar se os isolados de FMA exóticos modificam a distribuição e ocorrência dos FMA nativos e a atividade biológica e bioquímica do solo, em ciclos consecutivos.
- e) Investigar se aplicações consecutivas ou alternadas de inóculo de FMA promovem mudanças significativas na comunidade de FMA e atividade microbiana do solo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FEIJÃO-CAUPI

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] pertencente à família Fabaceae, constitui importante fonte de proteína na dieta de países em desenvolvimento, sendo cultivado em solos pouco férteis e com baixo teor de nutrientes (BALLESTEROS-ALMANZA *et al.*, 2010). Dados do último levantamento, realizado em 2016, mostram produção mundial de 6,9 milhões de toneladas, aproximadamente, em 12,3 milhões de hectares (FAO, 2016). Possivelmente esses dados são subestimados visto que países como Brasil e Índia não apresentam estatísticas separadas de feijão-caupi (*V. unguiculata*) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (EMBRAPA, 2016). Os maiores produtores e consumidores do feijão-caupi são os continentes africano, asiático e latinoamericano (FAO, 2016); nesse último, destaca-se o Brasil (Fig. 1).

Figura 1. Distribuição da produção de feijão-caupi por continente



Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations- FAO, 2016

A cultura é bem adaptada às condições edafoclimáticas brasileiras (SIQUEIRA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2012a), cultivada por pequenos e grandes produtores em todas as regiões e possui destaque como componente alimentar básico (por ser rica em proteínas, minerais e fibras) em comunidades rurais e urbanas do Norte e Nordeste do Brasil (COSTA *et al.*, 2013; EMBRAPA, 2016). Nessas regiões e no Centro-Oeste concentram-se as maiores produções, representando significativa fonte de renda e emprego para as comunidades locais (COSTA *et al.*, 2013). O baixo custo de produção

aliado a possibilidade de bons rendimentos são os principais atrativos para o seu cultivo (EMBRAPA, 2016).

No Nordeste, o cultivo concentra-se nas áreas semiáridas, onde outras culturas leguminosas anuais não se desenvolvem satisfatoriamente em virtude das altas temperaturas e irregularidades das chuvas. Tradicionalmente, o cultivo no Nordeste é realizado no primeiro semestre do ano; no entanto, cultivos nos perímetros irrigados do Vale do São Francisco têm sido estabelecidos no segundo semestre. Essa mudança no período de produção tem exigido cultivares adequadas que vêm sendo desenvolvidas pela Embrapa Semiárido. Entre essas, destaca-se a BRS Pujante, obtida por meio do cruzamento da linhagem TE 90-180-26F com a Epace 10, em 1995. A BRS Pujante é indicada para consórcio na fase inicial de estabelecimento de fruteiras irrigadas e está registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento -MAPA.

Em 2013, uma nova cultivar foi indicada para o Nordeste brasileiro, a Miranda IPA-207, resultante do cruzamento dos genótipos Vita 3 e CNCx 11-9D (COSTA *et al.*, 2013). Segundo os autores, é indicada para as Mesorregião da Mata, Agreste e Sertão nordestino em sistemas de sequeiro e irrigado.

O conhecimento de diversos manejos como a definição da densidade populacional adequada para maior produção (BEZERRA *et al.*, 2008), a seleção de genótipos com tolerância à deficiência hídrica (NASCIMENTO *et al.*, 2011) e o uso adequado de inoculantes microbianos e adubação mineral (GUALTER *et al.*, 2008) tem ampliado a produtividade do feijão-caupi, a qual pode ser afetada positiva ou negativamente por diversos fatores, especialmente, pela fertilidade natural do solo. A baixa fertilidade edáfica é uma das condições que mais prejudica a produtividade da cultura (CHAGAS JÚNIOR *et al.*, 2010).

A fertilidade do solo pode ser melhorada em função dos processos mediados pelos micro-organismos edáficos tais como as bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN) e os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (DE CARVALHO & MOREIRA, 2010), os quais atuam em processos diferentes (tais como o ciclo do carbono e nitrogênio, respectivamente) e fundamentais para o solo e a planta.

Considerando que a expansão da agricultura requer o desenvolvimento de práticas agrícolas que incrementem a produtividade vegetal e que tenham baixo impacto ambiental (LINO, 2014), é indispensável o uso de micro-organismos no alcance desses objetivos. Isso porque os processos resultantes da microbiota do solo proporcionam às plantas melhores condições e aproveitamento dos recursos ambientais (ARAÚJO *et al.*,

2007; PELLEGRINO *et al.*, 2012; MARINHO *et al.*, 2017). O uso de micro-organismos na agricultura é uma ferramenta que deve ser desenvolvida e consolidada de modo a incrementar a produção de alimentos de forma segura, atendendo a necessidade populacional (RODRIGUES & SANDERS, 2015).

2.2 BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO

O N desempenha papel relevante no metabolismo vegetal por participar da biossíntese de proteínas e clorofilas; no entanto, encontra-se em quantidades insuficientes na maioria dos solos brasileiros, condição que requer fornecimento em concentração adequada desse nutriente para o estabelecimento das culturas (DEUNER *et al.*, 2008). Para o desenvolvimento completo da cultura de feijão-caupi é preciso uma quantidade igual ou superior a 100 kg de N ha⁻¹; no entanto, por ser uma cultura com eficiente sistema de fixação biológica de N, pode-se dispensar a adubação (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2002; BRITO *et al.*, 2011).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é realizada por bactérias diazotróficas e consiste na conversão do N₂ em compostos nitrogenados (amônio ou nitrato), que são fundamentais na nutrição das plantas. Apenas as bactérias com “nitrogenase” possuem a capacidade de reduzir o N₂ e são chamadas de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN). As bactérias do gênero *Rhizobium* são as mais comuns na realização desse processo (ARAÚJO *et al.*, 2007).

As BFN induzem a formação de nódulos nas raízes de plantas pertencentes, principalmente, a família das leguminosas (Fabaceae). Nessa simbiose mutualista, tanto a planta como as bactérias são beneficiadas. As bactérias recebem parte dos carboidratos produzidos pela planta, que por sua vez, se beneficia do N fixado. O uso de BFN chega a anular ou amenizar a limitação imposta pelo N às culturas, tornando-se uma prática alternativa a aplicação de fertilizantes nitrogenados que, além de caros, podem prejudicar o meio ambiente e a saúde do solo se manejados de forma inadequada (MOURA *et al.*, 2009; DE CARVALHO & MOREIRA, 2010). Devido ao suprimento de N, a inoculação bacteriana melhora o estado nutricional das plantas noduladas e aumenta a tolerância à seca (BALLESTEROS-ALMANZA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012a). O teor de N do feijoeiro comum (*P. vulgaris*), por exemplo, foi incrementado nas plantas inoculadas apenas com BFN quando comparadas às plantas que não foram inoculadas - controle (ARAÚJO *et al.*, 2007). De acordo com os autores, a inoculação

de estirpes eficientes tem a mesma capacidade de incorporar N à planta que os fertilizantes nitrogenados. Silva *et al.* (2012a) por sua vez constataram que o teor de N de plantas de feijão-caupi, submetidas a diferentes concentrações de inoculantes bacterianos, foi maior que o registrado em plantas fertilizadas com N.

Na agricultura, sobretudo, na familiar, o fertilizante nitrogenado é pouco disponível, e nesse caso, o aporte de nitrogênio no solo via associação leguminosas-rizóbio torna-se fundamental, sendo muitas vezes a única possibilidade de fornecimento desse elemento ao sistema. O fornecimento de N mineral nem sempre proporciona ganhos consideráveis à cultura (ARAÚJO *et al.*, 2007) e na busca de uma alternativa mais econômica e sustentável para substituir a adubação nitrogenada, diversas estirpes de rizóbios têm sido testadas em várias espécies vegetais, incluindo variedades de feijão-caupi. Algumas dessas têm incrementado a produtividade sendo indicadas como inoculantes tais como a UFLA 3-84, UFLA 3-154 (42c8), BR3267, UFLA 3-155, INPA 03 11B (BR 3301) (RUMJANEK *et al.*, 2006; CHAGAS JÚNIOR *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011).

Avaliando o potencial de fixação de N₂ do feijoeiro submetido à inoculação bacteriana, Araújo *et al.* (2007) constataram que a produtividade da cultura foi maior que a de plantas não inoculadas e igual à de plantas fertilizadas com 100 kg ha⁻¹ de uréia na cobertura. Moura *et al.* (2009) constataram que a inoculação com *Rhizobium tropici* (Martínez-Romero) na semeadura somada à adubação nitrogenada na cobertura (80 kg ha⁻¹) possibilitou produtividade similar à obtida por plantas adubadas no ato da semeadura (10 kg ha⁻¹) e na cobertura (80 kg ha⁻¹), confirmando que o uso inicial de BFN pode substituir aplicações de fertilizantes nitrogenados sem ocasionar perdas no rendimento dos grãos. Economia no uso de fertilizantes também foi observada por Chagas Junior *et al.* (2010) que testaram várias estirpes bacterianas em feijão-caupi, incluindo a BR 3267 (estirpe amplamente indicada para a cultura), e constataram que a produtividade foi similar à de plantas adubadas com N. De acordo com os autores, é imprescindível a difusão dessa biotecnologia de baixo custo, uma vez que resulta de um processo ecológico e economicamente vantajoso.

Por outro lado, a alta disponibilidade de N no solo pode influenciar negativamente a simbiose que ocorre entre as plantas e as BFN interferindo diretamente na produtividade da cultura. Aplicando 10 kg ha⁻¹ de N em feijões (*P. vulgaris*) inoculados com *R. tropici*, Moura *et al.* (2009) constataram redução na produtividade de grãos em relação à obtida pelas plantas apenas inoculadas; demonstrando que a

aplicação de uma fonte nitrogenada no ato da semeadura prejudicava a simbiose planta-bactéria, resultando em perdas no rendimento. Similarmente, Andrade *et al.* (2009) observaram que a nodulação foi inibida quando fertilizante mineral foi adicionado à cultura de feijão-caupi. Os autores atribuíram ao sulfato de amônio, presente no fertilizante, a capacidade de interferir na formação dos nódulos e na atividade da nitrogenase. Posteriormente, Costa *et al.* (2011) e Silva *et al.* (2012a) observaram o mesmo efeito inibidor do N mineral sobre a nodulação em feijão-caupi.

Embora a prática de manejo com BFN gere respostas consistentes e positivas, sua adoção nas práticas agrícolas nem sempre resulta em benefícios significativos, visto que os solos apresentam populações de rizóbios nativos capazes de nodular a planta e, conseqüentemente, beneficiá-las. No entanto, se as concentrações aplicadas dos inóculos forem superiores à densidade das populações nativas, a nodulação e as contribuições da BFN introduzida podem ser significativas (CHAGAS JUNIOR *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012a).

Tecnologias que maximizem a eficiência do uso do N são de grande relevância visto que os fertilizantes nitrogenados apresentam alto custo e geralmente não estão ao alcance dos pequenos agricultores. Esses são responsáveis pela maior produção de feijão-caupi no semiárido, portanto, qualquer pesquisa voltada para atender à necessidade desses produtores pode ter grande impacto na economia.

2.3 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)

Similarmente às BFN, os FMA são micro-organismos de alta relevância no funcionamento e na manutenção dos ecossistemas terrestres, visto que formam associações simbióticas mutualísticas com as raízes da maioria das plantas terrestres, denominadas micorrizas arbusculares (FOLLI-PEREIRA *et al.*, 2012; TRABELSI & MHAMDI, 2013; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2015) e podem trazer diversos benefícios às plantas associadas. Esses fungos, pertencentes ao Filo Glomeromycota (TEDERSOO *et al.*, 2018), são encontrados comumente no solo, na forma de esporos denominados glomerosporos (GOTO & MAIA, 2006). Os FMA possuem características peculiares, dentre estas o biotrofismo obrigatório, condição que os faz dependentes da planta fisiologicamente ativa para completar o seu ciclo de vida e produzem glomalina (Fig. 2), uma glicoproteína que promove a agregação das partículas do solo e a retenção da umidade. A glomalina possui funções importantes nos ecossistemas terrestres e

representa uma fonte de C e N para a microbiota edáfica (RILLIG *et al.*, 2004; BRAGHIROLI *et al.*, 2012).

Além da formação dos glomerosporos, os FMA produzem outros propágulos no solo tais como micélios extrarradiculares. A distribuição dos fungos micorrízicos no solo não é uniforme, conforme demonstrado em vários estudos (CARRENHO *et al.*, 2001; COSTA *et al.*, 2002; LINO, 2014) e o crescimento das suas estruturas ocorre simultaneamente nos sistemas intra e extrarradiculares. No sistema extrarradicular é expressiva a quantidade de glomerosporos, células auxiliares e micélio, este último atua como complemento da raiz ampliando a ocupação do solo (BRAGHIROLI *et al.*, 2012; WILLIS *et al.*, 2013). A partir do micélio extrarradicular ocorre a absorção e translocação de nutrientes, que são transferidos às plantas, especialmente os elementos que são limitantes para o crescimento vegetal como fósforo e nitrogênio. Em troca, os fungos recebem cerca de 10 a 20% do carboidrato produzido (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2015) pela planta para sustentar seu desenvolvimento.

Figura 2. Glomalina produzida abundantemente em hifas e esporos de FMA no solo e nas raízes.



Fonte: <https://invam.wvu.edu/methods/mycorrhizae/glomalalin-extraction>

No interior das células corticais, os FMA podem formar estruturas denominadas vesículas (estruturas de armazenamento de lipídeos), arbúsculos (locais em que ocorre intensa troca de nutrientes), hifas enoveladas e intrarradiculares (BRAGHIROLI *et al.*, 2012). A colonização micorrízica é o ponto chave da simbiose podendo ser afetada por inúmeros fatores, como: a espécie e a idade da planta, a densidade de raízes e de propágulos de FMA no solo, a quantidade e tipo de adubo aplicado e o manejo adotado (MARTINEZ *et al.*, 2010; ANGELINI *et al.*, 2012; LINO, 2014). A taxa de colonização micorrízica geralmente diminui à medida que as concentrações de P no solo aumentam (MACHINESKI *et al.*, 2011) e recentemente foi relatado que estirpes bacterianas também influenciam a colonização intra e extrarradicular pelos FMA (ORDOÑEZ *et al.*, 2016). Tendo em vista a importância da colonização micorrízica para a manutenção de formação de propágulos de FMA e aumento da permanência do fungo no ambiente, a

compreensão dos mecanismos que regulam esta simbiose é extremamente importante para o manejo adequado do solo visando sua sustentabilidade.

Muitas plantas são colonizadas por vários fungos micorrízicos, os quais não apresentam especificidade hospedeira e podem colonizar outras ao mesmo tempo, permitindo uma interconectividade entre as plantas abaixo do solo (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2015). A existência dessa rede implica na transferência de nutrientes e de outros recursos de uma planta para outra por meio da rede de micélio micorrízico. Embora não haja especificidade entre o fungo e o hospedeiro, preferências ou seletividade entre eles têm sido referidos (GUO *et al.*, 2013; VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2015). Entretanto, há de se relatar que a colonização micorrízica por um ou mais isolados de FMA pode resultar em diferenças no aporte de P, reforçando a existência de combinações mais favoráveis (JANSA *et al.*, 2008).

As maiores taxas de colonização nem sempre retratam maior efetividade, ou seja, maior benefício adquirido pelo vegetal devido a presença do micobionte (KÖHL *et al.*, 2016). Porém, de modo geral, as plantas micorrizadas apresentam maiores taxas de crescimento (TIAN *et al.*, 2013), sobrevivência (VANDRESEN *et al.*, 2007), acúmulo de nutrientes (SILVA *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2013), resistência ao ataque de fitopatógenos (ODEYEMI *et al.*, 2010), tolerância a estresses hídricos (FOLLI-PEREIRA *et al.*, 2012) e salinos (LÚCIO *et al.*, 2013; FROSI *et al.*, 2017) comparadas às não micorrizadas. Nesses casos, as plantas micorrizadas tornam-se mais atrativas ao mercado agrícola e ambiental.

A contribuição dos FMA na produção alimentar foi discutida por Rodrigues & Sanders (2015), e consiste no fato de culturas de importância econômica naturalmente formarem simbiose com os FMA, os quais são eficientes na obtenção de fósforo do solo. Ainda, segundo esses autores, dois fatores ameaçam a produção alimentar ao longo dos anos: a) o rápido empobrecimento dos estoques de fertilizantes fosfatados e b) o aumento à procura de fósforo para a produção vegetal; esses fatores podem potencialmente ser contornados por meio da aquisição eficiente de fósforo realizada pelos FMA. Considerando sua função de apoio na nutrição dos vegetais, os FMA são muitas vezes referidos como biofertilizantes. No entanto, Pellegrino *et al.* (2012) sugeriram que é melhor denominá-los “biorrealçadores” do desempenho da planta, pois ao contrário das bactérias fixadoras de nitrogênio, não contribuem com novos nutrientes minerais.

Levando em consideração a importância ecológica dos FMA na construção e na estabilidade dos ecossistemas terrestres, dados referentes à sua comunidade, como riqueza, abundância e diversidade de táxons, colonização, atividade e infectividade micorrízica muitas vezes são mais eficientes em evidenciar efeitos de mudança de cobertura vegetal, manejos e diferenças entre solos que outras variáveis biológicas tais como biomassa microbiana e respiração edáfica (ANGELINI *et al.*, 2012; KÖHL *et al.*, 2016; TURRINI *et al.*, 2018), permitindo assim que esses fungos sejam considerados indicadores de qualidade do solo (SCHLOTTER *et al.*, 2003).

2.3.1 Inoculantes micorrízicos

Esforços direcionados à produção de inoculantes micorrízicos têm sido observados no Brasil (COELHO *et al.*, 2014; SANTANA *et al.*, 2014). A multiplicação pode ser de várias formas sendo a mais comum em vasos sob condições controladas (casa de vegetação) utilizando substratos que favoreçam a esporulação do fungo e espécies vegetais de rápido crescimento, susceptíveis à micorrização. A produção e a aplicação no Brasil ainda são destinadas a estudos realizados em casa de vegetação e a pequenos ensaios em campo (MONTE JUNIOR *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012). A comercialização de inóculos micorrízicos em larga escala ainda é um grande desafio para a ciência brasileira, ao contrário do observado em vários países europeus e asiáticos em que se disponibilizam em mercados e em lojas específicas a venda de inoculantes micorrízicos.

A indicação de inoculantes bacterianos é mais estabelecida que a de inoculantes micorrízicos e por isso as pesquisas com inoculação bacteriana em culturas de importância agrícola são mais expressivas que as realizadas apenas com isolados de FMA. A regulamentação da produção de inoculantes bacterianos pelo MAPA, associado à fácil produção dos mesmos (comparada à de FMA) são alguns dos fatores que contribuem para esse resultado.

Práticas de inoculação com FMA têm sido questionadas pelo fato de o fungo já se encontrar difundido no solo. No entanto, em sistemas agrícolas impactados, o potencial micorrízico nativo pode ser insuficiente em quantidade e qualidade (KOIDE & MOSSE, 2004), resultando em baixa contribuição dos fungos para a comunidade vegetal, sendo a inoculação importante manejo para o restabelecimento do potencial infectivo do solo.

Investigando os efeitos da inoculação com *Rhizoglyphus irregularis* (Sieverd, Silva & Oehl) em leguminosa semeada em diferentes solos agrícolas suíços, Köhl *et al.* (2016) observaram que a inoculação também pode ser viável e bem sucedida (em termos de biomassa vegetal e estabelecimento do isolado entre os FMA indígenas) quando há alta disponibilidade de P no solo e as comunidades nativas de FMA são abundantes, contrariando a ideia de que a inoculação se restringe a solos pobres nutricionalmente e com baixas concentrações de inóculos de FMA.

De modo geral, a aplicação tem como alvo principal possibilitar à planta maiores chances de ser colonizada e, conseqüentemente, receber benefícios advindos da micorrização como melhor aproveitamento dos recursos edáficos disponíveis (ANTUNES *et al.*, 2009). A inoculação micorrízica contribui para maiores taxas de colonização radicular, resultando em melhores condições vegetais (PELEGRINO *et al.*, 2012; COZZOLINO *et al.*, 2013).

O sucesso da inoculação é alcançado quando o rendimento da cultura é maior que o obtido pela cultura sem inoculação. Pesquisa mostra que os estudos de inoculação em áreas tropicais (onde a disponibilidade de fosfato no solo é baixa ou escassa, condição que resultaria em maior atuação das micorrizas arbusculares) ainda são incipientes em comparação a estudos realizados em áreas temperadas (RODRIGUES & SANDERS, 2015). Essa realidade serve de estímulo para a realização de mais estudos em solos tropicais.

A introdução de inóculos micorrízicos no ambiente também tende a aumentar o número de glomerosporos no solo, não só pelo efeito da adição de esporos, mas também pela influência exercida nas espécies nativas. Por exemplo, *Acaulospora dilatata* (J.B. Morton) apresentou aumento de 38% na sua esporulação em resposta à introdução de inóculo de *Gigaspora margarita* W.N. Becker & I.R. Hall (BALOTA & LOPES, 1996). Posteriormente, Lino (2014) observou que a inoculação com *Claroideoglyphus etunicatum* [(W. N. Becker & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler] e *Acaulospora longula* (Spain & N.C. Schenck) em cultura do milho, proporcionou aumento de três e 15 vezes, respectivamente, na quantidade de glomerosporos no solo.

Ressalta-se que para que os resultados positivos da inoculação micorrízica sejam alcançados é importante que o isolado de FMA seja altamente competitivo, infectivo, eficiente e persistente; além disso, espera-se que o inóculo não só incremente o teor de nutrientes e o crescimento da planta como também produza alta biomassa no solo (RILLIG *et al.*, 2004). De acordo com Rodrigues & Sanders (2015), para ser indicado

para uso em nível mundial, o FMA deve ser adaptado ao solo (e/ou à cobertura vegetal) e apresentar as seguintes características: ampla distribuição geográfica, elevada variação genética e efeitos no crescimento das plantas, devem ser adequados para estudos de genômica populacional e ter efeitos significativos na produção de cultura(s) importante(s) mundialmente, entre outros.

Em virtude do comportamento diferenciado de isolados da mesma (SILVA *et al.*, 2009; KOCH *et al.*, 2011) ou de espécies diferentes (ANDRADE *et al.*, 2009; RANGEL, 2011), e considerando que fatores bióticos a bióticos são determinantes nos efeitos dos inóculos aplicados (KÖHL *et al.*, 2016), a seleção prévia de inoculante deve ser realizada antes da recomendação. Pesquisas que visem determinar a melhor combinação fungo-planta são importantes e devem ser incentivadas com o objetivo de aplicação em campo (BERRUTI *et al.* 2017).

2.4 INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM CULTURAS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA

A planta de feijão-caupi é positivamente influenciada pela associação com FMA. Siqueira *et al.* (2003) observaram que a inoculação com *Claroideoglomus etunicatum* (= *Glomus etunicatum*) proporcionou aumento significativo na área foliar e biomassa fresca e seca da parte aérea da planta. Determinando o efeito de 51 isolados de FMA provenientes de diferentes sistemas de uso de solo em feijão-caupi, Silva *et al.* (2009) verificaram aumento no crescimento vegetal de 33 a 148%, em comparação com as plantas não inoculadas, e observaram que a origem do isolado influenciou na eficiência dos isolados. Os autores constataram também que 95% dos fungos testados favoreceram a absorção de P e que os tratamentos com máxima eficiência continham espécies de *Acaulospora* e *Glomus*; além disso, verificaram correlação positiva entre o grau de colonização e a eficiência fúngica. Benefícios diferenciados em função da espécie e/ou isolado de FMA também foram observados por Andrade *et al.* (2009), os quais encontraram maior incremento na biomassa seca aérea do feijão-caupi (cultivar IPA 206) em função da associação com *C. etunicatum* do que com *G. albida* Schenck & Smith.

Pesquisas direcionadas à ocorrência e aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em cultura de feijão-caupi são importantes, não apenas em virtude dos benefícios promovidos pelos FMA às plantas, mas também aos efeitos positivos dos

fungos na estruturação do solo agrícola e na associação com as BFN (simbiose tripartite) (ANDRADE *et al.*, 2009; LIMA *et al.*, 2011). As leguminosas se encontram micorrizadas comumente na natureza e, quando noduladas, formam uma simbiose tripartite “BFN-leguminosa-FMA”. Esse sistema apresenta um custo alto de energia para a planta de modo que ela precisa controlar ambas as simbioses de acordo com as suas necessidades (DE CARVALHO & MOREIRA, 2010).

O processo de FBN é muito influenciado pela nutrição da planta com relação ao P, nutriente relacionado ao metabolismo energético (DE CARVALHO & MOREIRA, 2010). Na sua ausência, há leguminosas, por exemplo, que não se beneficiam da simbiose com as bactérias (JESUS *et al.*, 2005). Nesse contexto, os FMA podem ser decisivos para o sucesso da nodulação, já que atuam na captação e transferência do P para as plantas. Efeitos positivos da micorrização na fixação biológica de nitrogênio têm sido documentados (GROSS *et al.*, 2004; JESUS *et al.*, 2005; DE CARVALHO & MOREIRA, 2010).

A participação dos FMA na absorção de P e a respectiva transferência para a planta é destaque em pesquisas agrônomicas (ANTUNES *et al.*, 2009; ORDOÑEZ *et al.*, 2016). Isso porque o P é um elemento de baixa mobilidade, de pouca concentração no solo e de fácil esgotamento na área rizosférica (já que a planta necessita de fósforo para a realização de muitos processos vitais). Assim, a ramificação das hifas e seu crescimento para fora da área rizosférica funcionam como extensões das raízes promovendo às plantas maior exploração dos nutrientes do solo (DENISON & KIERS, 2011; RODRIGUEZ & SANDERS, 2015).

Em plantas de importância agrícola, o incremento de P pelos FMA pode ser muito significativo. Trindade *et al.* (2000) constataram, por exemplo, que os teores de P na parte aérea de mamoeiros foram maiores nas plantas colonizadas do que nas não colonizadas; verificaram ainda que o efeito dos FMA foi mais pronunciado quando os teores de P no substrato eram baixos. Costa *et al.* (2002) também observaram aumento pronunciado de P em plantas de milho inoculadas com FMA (quando a fonte de P era solúvel). Incremento expressivo de P em vegetais inoculados com *Glomus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) também foi referido por Antunes *et al.* (2009). Machineski *et al.* (2011) observaram aumento de 22 e de 33% no teor de P em mamoneiras após a inoculação com mix de FMA e com *G. margarita*, respectivamente.

Os FMA também podem contribuir com quantidades significativas de N (KÖHL *et al.*, 2016); no entanto, essa contribuição é frequentemente negligenciada e menos expressiva que a do teor de P fornecido pelo fungo (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 2015).

2.5 DUPLA INOCULAÇÃO EM CULTURAS DE IMPORTÂNCIA AGRÍCOLA

A maioria dos inoculantes consiste de apenas um isolado, o que pode parcialmente explicar as inconsistências dos resultados registrados em campo. Uma forma de contornar essa situação é incluir diferentes isolados de micro-organismos benéficos na mesma formulação microbiana (TRABELSI & MHAMDI, 2013). Desse modo, é esperado que a combinação de organismos potencialmente diferentes atue de forma positiva e eficiente na melhoria das condições da planta e do solo.

Embora possa haver antagonismo entre FMA e os rizóbios quando uma das simbioses se estabelece antecipadamente, as duas simbioses podem promover efeitos sinérgicos quando ocorrerem simultaneamente (DE CARVALHO & MOREIRA, 2010; ORDOÑEZ *et al.*, 2016). Os efeitos da aplicação conjunta de BFN e FMA em leguminosas têm sido amplamente investigados no Brasil; no entanto, a maioria desses trabalhos cita um número baixo de representantes desses organismos, considerando a quantidade que é conhecida de FMA (cerca de 300 espécies www.mycobank.com) e de milhares de estirpes de BFN (DE CARVALHO & MOREIRA, 2010). Ainda de acordo com esses autores, *C. etunicatum* é o FMA mais usado em trabalhos de simbiose tripartite, provavelmente devido à ampla distribuição no território brasileiro.

Em ambientes explorados pela mineração, a dupla inoculação tem contribuído no estabelecimento e no acúmulo de matéria seca de várias leguminosas usadas na reabilitação de solos degradados (RANGEL, 2011). Ainda de acordo com o autor, o sistema tripartite mostra-se uma ferramenta relevante em projetos de recuperação ambiental. Nos sistemas de produção de mudas florestais as práticas de inoculação são mais viáveis, uma vez que nesses sistemas são utilizados substratos esterilizados, os quais apresentam melhores condições para atuação dos inoculantes microbianos, com resultados, na maioria das vezes, expressivos e positivos.

Os trabalhos de co-inoculação em leguminosas argumentam a favor de um efeito sinérgico dos micro-organismos no desenvolvimento das plantas. No caso de plantas de feijão-caupi, a dupla inoculação tem demonstrado efeitos diversos. Por exemplo, Siqueira *et al.* (2003) não verificaram influência nos parâmetros biométricos do feijão-

caupi em resposta à dupla inoculação, mesmo testando em solo esterilizado. Por outro lado, Haro *et al.* (2018) constataram que a coinoculação foi mais eficiente em melhorar o desempenho do feijão-caupi do que a inoculação isolada.

Selecionando combinações de FMA e BFN para *Vigna radiata* (L.), Yasmeen *et al.* (2012) observaram que o inoculante formado pela combinação de *Glomus intraradices* com uma das duas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* bv. *Glycinearum* (MN-S e TAL-102) testadas era mais eficiente na promoção do crescimento da planta do que a inoculação com apenas *G. intraradices* ou com apenas inoculantes bacterianos.

Avaliando os efeitos da coinoculação em diferentes genótipos de feijão (*P. vulgaris*), Ballesteros-Almanza *et al.* (2010) constataram que, em geral, a inoculação isolada com rizóbio ou com FMA promove à planta maior tolerância à condição de seca e maiores valores biométricos do que a dupla inoculação. Esses autores também observaram que a colonização micorrízica da planta foi reduzida com a coinoculação, e atribuíram esse comportamento à existência de competição por fotossintatos entre os simbiosites. As respostas diferenciadas de genótipos de feijão à dupla inoculação, observadas pelos autores, indicam que para a associação tripartite ser funcional é importante saber qual a melhor combinação de isolados de fungos e estirpes bacterianas para as cultivares de interesse, visto que os rizóbios podem inibir ou estimular a germinação de esporos de FMA, o que por sua vez, reflete na ocorrência da simbiose micorrízica arbuscular e, conseqüentemente, na contribuição do fungo para a planta.

Soares *et al.* (2009) constataram que a taxa de germinação de glomerosporos de *G. albida* diferia em função da bactéria promotora de crescimento da planta aplicada, sendo alta quando esporos de *G. albida* eram combinados com o *Bacillus* RAB9, e baixa quando combinados com *Bacillus* ENF10. Para o isolado de *Scutellospora heterogama* [= *Dentiscutata heterogama* (T.H. Nicolson & Gerd.) Sieverd., F.A. Souza & Oehl], os mesmos autores não observaram mudança na taxa de germinação independentemente do isolado bacteriano. Por outro lado, a germinação do *C. etunicatum* foi beneficiada pela presença dos isolados bacterianos.

Em estudo posterior, Ordoñez *et al.* (2016) também observaram que o crescimento das hifas de FMA intra e extrarradicular pode ser estimulado ou inibido em função da estirpe bacteriana aplicada. Isolados cujos glomerosporos tenham a germinação dificultada ou reduzida não são adequados à aplicação na agricultura, visto que essas estruturas são fundamentais para a ocorrência da simbiose micorrízica.

Ampliar o conhecimento sobre a introdução de espécies de FMA e de BFN contribui na busca de bioinsumos microbianos promissores para o sucesso no estabelecimento e crescimento de culturas de interesse econômico. No entanto, a combinação de inoculantes nem sempre produzirá um efeito aditivo ou sinérgico, e sim, um processo competitivo que refletirá em efeitos negativos ou neutros na cultura de interesse (TRABELSI & MHAMDI, 2013). Isso porque a melhor combinação não é definida apenas pelos micro-organismos envolvidos, pois fatores como genótipo e idade da planta, compatibilidade funcional entre os simbiontes, propriedades químicas e físicas do solo, microbiota rizosférica, entre outros, devem ser levados em consideração (DE CARVALHO & MOREIRA, 2010).

De modo geral, a comprovação dos benefícios proporcionados pela dupla inoculação aos vegetais é mais facilmente demonstrada em condições controladas, com solo esterilizado, do que em condições naturais (KÖHL *et al.*, 2016). A esterilização altera as propriedades do solo gerando um ambiente artificial e com condições favoráveis para certos FMA e BFN, os quais, por sua vez, podem ser pouco adaptados às interações existentes na rizosfera ou até mesmo pouco competitivos em comparação aos nativos (DE CARVALHO & MOREIRA, 2010).

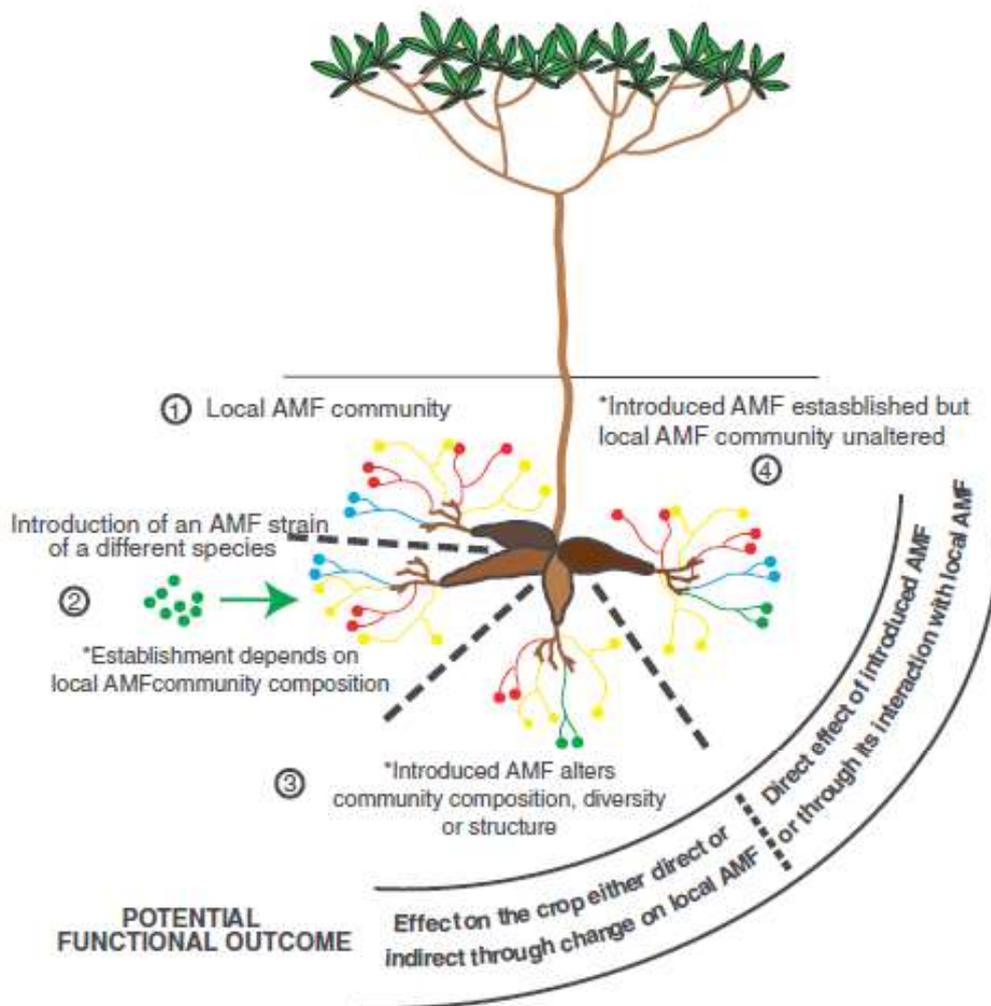
2.6 EFEITO DA INOCULAÇÃO MICORRÍZICA NA DIVERSIDADE DE FMA NATIVOS DO SOLO

No caso dos FMA introduzidos no solo, as informações sobre o estabelecimento, persistência e disseminação são poucas, assim como os seus efeitos na estrutura, no funcionamento e na diversidade da microbiota autóctone (PELLEGRINO *et al.*, 2012; BERRUTI *et al.* 2017). A comunidade vegetal não responde de forma padronizada a diferentes isolados de FMA, e pode ser fortemente influenciada pela comunidade micorrízica do solo (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1998); assim, não há clareza se a resposta da planta é resultado de um efeito direto do FMA aplicado ou se é de um efeito indireto, por meio da mudança na comunidade nativa (Fig. 3) (TRABELSI & MHAMDI, 2013; RODRIGUES & SANDERS, 2015).

O rastreamento dos FMA introduzidos no ambiente é difícil, assim como da sua persistência e de sua capacidade de invasão; conseqüentemente, não há muitos dados disponíveis na literatura sobre esse assunto (PELLEGRINO *et al.*, 2012). Outro problema é que o mesmo fungo já pode existir no local, o que requer um número maior

de marcadores moleculares (KOCH *et al.*, 2011; PELLEGRINO *et al.*, 2012; RODRIGUES & SANDER, 2015).

Figura 3. Potenciais efeitos da inoculação com um FMA. Efeitos e resultados funcionais que são potencialmente mediados pela presença de uma comunidade nativa. Em asterisco, encontram-se hipóteses que devem ser analisadas por investigação experimental.



Fonte: Rodriguez & Sanders, 2015

Métodos tradicionais de taxonomia morfológica, os quais são mais demorados e exigem a presença de profissionais experientes, podem auxiliar na identificação da comunidade nativa antes e depois da introdução de um isolado. Nesse caso, observar as populações que aumentaram e/ou diminuíram com o tempo na presença do(s) FMA introduzido(s) é uma ferramenta importante para a interpretação dos dados. A correta interpretação ecológica dos resultados é um grande desafio para o pesquisador, pois nos casos em que algumas populações nativas são reduzidas (considerado impacto negativo), não se sabe se essas condições são mais ou menos favoráveis ao crescimento

da cultura de interesse (KOCH *et al.*, 2011; RODRIGUES & SANDERS, 2015). Dessa forma, avaliação dos dados biométricos e fisiológicos das plantas deve ser somada a essas observações para melhor entendimento dos efeitos da inoculação.

O desafio ecológico a ser enfrentado pelas espécies de fungo introduzidas é, sem dúvida, um fator a ser considerado em estudos de inoculação. Isso porque naturalmente os solos contêm comunidades de FMA que podem mascarar ou atenuar os efeitos dos FMA exóticos (ANTUNES *et al.*, 2009; KÖHL *et al.*, 2016; BERRUTI *et al.* 2017). De acordo com Rodrigues & Sanders (2015), maior atenção deve ser dada à comunidade nativa devido à influência que ela pode ocasionar no estabelecimento e na atuação das espécies exóticas. O resultado dessa interação pode ser, por exemplo, a persistência de micro-organismos menos benéficos, condição que pode comprometer o objetivo desejável (KOCH *et al.*, 2011).

Melhor compreensão da ecologia e da biologia dos FMA como também de como o FMA introduzido interage com as populações existentes é fundamental para a indicação de inóculos (TRABELSI & MHAMDI, 2013; RODRIGUES & SANDERS, 2015) pois, considerar apenas o incremento que a inoculação pode proporcionar à produtividade da cultura é um parâmetro muito restrito. Ainda, segundo esses autores, os mecanismos que o FMA introduzido utiliza para se adaptar às novas condições ambientais também devem ser considerados. Obviamente, a ampliação desse conhecimento requer a adoção de novos métodos e ferramentas de estudo viabilizadas pelas técnicas moleculares (PELLEGRINO *et al.*, 2012; RODRIGUES & SANDERS, 2015).

Há um interesse crescente por métodos e técnicas moleculares em estudos de inoculação; no entanto, apesar de serem muito informativas, não estão economicamente acessíveis à maioria dos centros de pesquisas (TRABELSI & MHAMDI, 2013) e também não garantem detectar precisamente os efeitos da inoculação na comunidade nativa de FMA (BERRUTI *et al.* 2017).

De modo geral, pesquisas apontam declínio na diversidade e abundância dos FMA em agrossistemas submetidos a práticas agrícolas intensas (OEHL *et al.*, 2004; OEHL *et al.*, 2017) e nesse contexto, o restabelecimento natural da riqueza de FMA em solos empobrecidos e impactados pode ser alcançado pela introdução direta de FMA no solo alvo (BERRUTI *et al.* 2017).

Uma questão a ser considerada é: a introdução de um FMA não-nativo modifica significativamente a composição e a diversidade da comunidade existente? Balota e

Lopes (1996), por exemplo, observaram mudanças na diversidade da comunidade de FMA após a introdução de *G. margarita* em culturas de café. Os autores observaram que nos locais em que houve inoculação a maioria das populações de FMA foi favorecida. Inclusive, a esporulação de *A. dilatata* aumentou 38% com a presença de *G. margarita*. Os autores observaram também que os consideráveis aumentos no número de esporos das espécies nativas de *Acaulospora* não influenciaram a esporulação da espécie introduzida, que foi 12x maior nas parcelas inoculadas em relação às não inoculadas. A persistência do inoculante no campo também foi constatada por Balota & Lopes (1996). Isolado de *G. margarita*, introduzido por meio de mudas de cafeeiro, persistiu mesmo após cinco anos da aplicação.

Verificando os efeitos da adição de dois isolados exóticos de *G. intraradices* na comunidade nativa de FMA, Koch *et al.* (2011) observaram impacto negativo da introdução na diversidade da comunidade, resultando do estabelecimento bem-sucedido dos isolados introduzidos e sua dominância em relação aos nativos.

Avaliando o estabelecimento, a eficiência e a persistência de fungos exóticos como simbiossiontes radiculares em leguminosa, Pellegrino *et al.* (2012) observaram que os isolados foram eficientes competidores em comparação aos membros da comunidade natural de FMA, e que persistiram no solo mesmo após dois anos da aplicação. Concluíram também que a cultura teve o crescimento e a absorção de nutrientes minerais estimulados, mesmo após dois anos da inoculação.

Inoculando *R. irregulare* em uma ampla variedade de solo, Köhl *et al.* (2016) concluíram que o isolado conseguiu se estabelecer com sucesso e competir efetivamente com outros FMA na colonização de leguminosa (*Trifolium pratense* L.) e de gramínea (*Lolium multiflorum* Lam.). Ainda de acordo com os autores, a compatibilidade com o ambiente (condições do solo e planta hospedeira) é um fator crucial e determinante no estabelecimento do FMA inoculado.

Efeito nulo na estrutura da comunidade de FMA nativo após a introdução de inoculante micorrízico também tem sido documentado (ANTUNES *et al.*, 2009). Os autores alertam para uma interpretação cautelosa desse resultado, uma vez que, os efeitos na comunidade podem ocorrer em um tempo maior que o considerado no experimento. Com relação à fraca persistência de isolado exótico no solo, Berruti *et al.* (2017) atribuem à baixa capacidade de competição dos FMA exóticos na presença dos nativos. Também apontam para o tipo de propágulos de FMA introduzidos que pode ter sido inadequado para o solo alvo. Nesse caso, os autores usaram inoculante composto

com oito isolados de FMA + três fungos sapróbios + uma bactéria promotora de crescimento de plantas (BPCP).

Embora o uso de inoculantes seja um manejo atraente capaz de reduzir substancialmente a aplicação de fertilizantes químicos em sistemas agrícolas e promover benefícios significativos ao vegetal, deve ser considerado que se trata de um organismo vivo e, por tanto, sua aplicação pode ocasionar efeitos inesperados e irreversíveis tais como a perda de espécies importantes (KOCH *et al.*, 2011; TRABELSI & MHAMDI, 2013). Compreender de que forma a comunidade micorrízica nativa responde à introdução de um isolado exótico é fundamental para que o objetivo do manejo seja alcançado e a diversidade local seja mantida ou melhorada.

2.6.1 Índices ecológicos

A riqueza e estrutura da comunidade nativa de FMA podem ser conhecidas por meio da identificação morfológica dos glomerosporos extraídos do solo (OEHL *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2012b; PONTES *et al.*, 2017). Os principais caracteres considerados na identificação são: tamanho, coloração, formato, ornamentação, tipo e quantidade de paredes, placas germinativas, tipo de hifa esporífera, entre outros (Fig. 4). Estudos ecológicos baseados na morfologia dos esporos de FMA têm sido questionados por não acessarem as espécies não esporulantes, no entanto, fornecem subsídios importantes para o entendimento das comunidades de FMA em diferentes ecossistemas (SILVA *et al.*, 2012b; PONTES *et al.*, 2017). Em vários estudos, a identificação morfológica dos esporos tem ampliado o registro de ocorrência de espécies em solos agrícolas, superando, inclusive, a detecção por métodos moleculares (WETZEL *et al.*, 2014; OEHL *et al.*, 2017).

O uso de índices ecológicos em estudos da comunidade de FMA tem ajudado a compreender se mudanças na riqueza e abundância das espécies são significativas ou não, após diferentes manejos (OEHL *et al.*, 2004; PONTES *et al.*, 2017) e entre os mais usados estão os de Shannon e Margalef, o de dominância de Simpson e o de equitabilidade de Pielou. Em geral esses índices abrangem dois componentes: a riqueza de espécies (o número de espécies encontradas no local) e sua equitabilidade (padrão de distribuição).

O índice de Shannon é calculado de acordo com a equação: $-\sum (P_i \ln [P_i])$; onde $P_i = n_i/N$, n_i = número de indivíduos (esporos) da espécie i , e N = número total de

indivíduos (esporos) de todas as espécies. O índice de Margalef é medido pela equação $d = S-1/\text{Log}(N)$, onde S é o número de espécies e N é o número total de esporos na amostra. O índice de dominância de Simpson (C) é calculado pela equação $C = \sum (n_i(n_i - 1)/N(N - 1))$. A equitabilidade de Pielou é obtida pela equação $J' = H'/\text{Log}(S)$ em que H' é o valor obtido pelo índice de Shannon e S é o número total de espécies.

Figura 4. Identificação morfológica dos FMA baseada na morfologia dos esporos. Esporos com tamanhos entre 50 a 500 μm .



Fonte: <https://invam.wvu.edu/methods/spores>

2.7 EFEITO DA INOCULAÇÃO COM FMA NA BIOMASSA E ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO

Muitas informações sobre as mudanças na atividade microbiana do solo ocasionadas pela inoculação micorrízica ainda precisam ser conhecidas, evidenciando a importância da integração de estudos com abordagens que vão além dos efeitos dos FMA na planta. Os FMA podem influenciar os ciclos do C e do P (SANDERS *et al.*, 1996; RILLIG *et al.*, 2004) e a sua participação na atividade biológica geral do solo

resulta de ações direta e/ou indiretamente executadas pelos fungos no ecossistema. Diretamente, quando servem de fonte e depósito de carbono para a microbiota do solo e atuam na agregação e estruturação do mesmo (RILLIG *et al.*, 2004; RILLIG & MUMMEY, 2006) e indiretamente, quando contribuem para captação de nutrientes transferindo-os às plantas que, por sua vez, desenvolvem-se melhor e alocam compostos secundários para a raiz, os quais servem de estímulo e influenciam a atividade dos micro-organismos do solo (FOLLI-PEREIRA *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2013). As mudanças na atividade biológica edáfica podem ser conhecidas por meio de atributos microbiológicos e bioquímicos sensíveis a mudanças na qualidade e funcionamento do solo. Os atributos biológicos do solo são úteis em determinar os efeitos positivos e negativos sobre a qualidade edáfica e a sustentabilidade das práticas agrícolas (GUCWA-PRZEPIÓRA *et al.*, 2016; ADETUNJI *et al.*, 2017). Entre os atributos, destacam-se o carbono da biomassa microbiana (C-BM), a atividade respiratória, o coeficiente metabólico (qCO_2) e atividade enzimática (fosfatase ácida e β -glucosidase).

A biomassa microbiana corresponde à maior parte da fração ativa da matéria orgânica, participando efetivamente de importantes processos no sistema solo-planta tais como reciclagem e estoque de nutrientes (CUNHA *et al.*, 2011). Os métodos mais usados para determinar a biomassa microbiana são fumigação-incubação (JENKINSON & POWLSON, 1976), fumigação-extração (VANCE *et al.*, 1987) e irradiação-extração (ISLAM & WEIL, 1998). Várias pesquisas avaliando a biomassa microbiana mostraram sua sensibilidade a diversos manejos agrícolas. Cunha *et al.* (2011), por exemplo, investigando a influência de plantas de cobertura nos teores de C-BM em solo cultivado com feijoeiro (*P. vulgaris*) em sistema de preparo convencional registraram média de 217,5 (mg C Kg⁻¹ de solo seco) na profundidade entre 0,0 - 0,10 m, valor muito abaixo do registrado em solo de área de mata 414,6 (mg C Kg⁻¹ de solo seco).

Analisando a influência da salinidade sobre o C-BM em áreas submetidas à rotação de cultura (feijão-caupi e milho), Bezerra *et al.* (2010) também observaram alterações significativas nesse atributo, concluindo que os maiores níveis de salinidade promoveram redução do carbono microbiano no solo. Com relação à influência da inoculação com FMA no C-BM, Sales (2017) observou efeito positivo da inoculação (400 g de solo-inóculo mix de FMA) em solo não esterilizado, identificando aumento de C-BM no solo desde a primeira safra de cana-de-açúcar. Em cultivo de feijão-fava (*Vicia faba* L.), Almethyeb *et al.* (2013) também observaram aumento do C microbiano

no solo após aplicação de inoculante micorrízico, mostrando a eficiência do inoculante em incrementar a biomassa microbiana do solo.

A atividade respiratória, também conhecida como respiração basal, corresponde à liberação de C-CO₂ resultante da oxidação de substâncias orgânicas. A respiração basal reflete a capacidade metabólica da microbiota edáfica em degradar compostos orgânicos em condições aeróbicas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). A taxa respiratória pode ser avaliada pela liberação de dióxido de carbono (CO₂) ou pelo consumo de oxigênio (O₂). No caso da liberação de CO₂, o carbono pode ser adsorvido por uma solução básica (KOH ou NaOH) e então titulado com solução ácida - HCl (GRISI, 1978). Diversos fatores ambientais como temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes promovem mudanças na emissão de CO₂ por influenciarem a atividade da microbiota, que é responsável pela produção deste gás (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

A respiração basal é um atributo positivo para a qualidade do solo, sendo sua interpretação realizada com cuidado, pois elevada emissão de CO₂ pode tanto refletir alta oxidação da matéria orgânica associada à alta atividade biológica como perda de carbono do solo e redução desse elemento no sistema (CUNHA *et al.*, 2011). Avaliando os efeitos de plantas de cobertura como fonte de matéria orgânica na respiração do solo, esses autores observaram diferenças significativas entre os tratamentos na profundidade de 0,0–0,10 m do solo sob cultivo de feijoeiro (*P. vulgaris*) em sistema de semeadura direta, mostrando sua sensibilidade aos diferentes manejos adotados.

A relação entre a respiração basal e o C-BM corresponde ao coeficiente metabólico (qCO_2). Manejos que propiciem baixos qCO_2 nos sistemas agrícolas são os mais desejados, visto que a perda de C é menor pela respiração, resultando assim, em maior incorporação do C à biomassa microbiana (CUNHA *et al.*, 2011).

A atividade enzimática como parâmetro de qualidade do solo vem sendo amplamente difundida na pesquisa agrônoma (GUCWA-PRZEPIÓRA *et al.*, 2016; ADETUNJI *et al.*, 2017). As enzimas catalisam todas as reações bioquímicas, sendo comum sua presença no solo avaliada por sua atividade. Os procedimentos para a determinação da atividade enzimática são simples. Em geral, aplica-se na amostra de solo uma solução tamponada contendo o substrato enzimático; posteriormente, a mistura é incubada sob condições padronizadas e o produto formado é quantificado colorimetricamente. Entre as diversas enzimas que participam nas transformações da

matéria orgânica e liberação de nutrientes como o carbono e o fosforo, destacam-se a β -glucosidase e fosfatase ácida, respectivamente.

A β -glucosidase atua na liberação de açúcares de baixo peso molecular, participando na hidrólise e biodegradação de diversos glicosídeos presentes em detritos vegetais. A enzima possui papel relevante no ciclo do carbono e tem como produto final de sua atuação a glicose, que é importante fonte de energia para os micro-organismos.

A fosfatase ácida atua na mineralização e ciclagem do fósforo, catalisando a hidrólise de ésteres e anidridos de ácido fosfórico (MAKOI & NDAKIDEMI, 2008). A atividade da fosfatase resulta na liberação de grupos de fosfatos que são absorvidos pelos vegetais, sendo boa indicadora de fertilidade do solo (MAKOI & NDAKIDEMI, 2008; ADETUNJI *et al.*, 2017). Alta atividade da fosfatase pode estar associada à deficiência de P no ecossistema (GATIBONI *et al.*, 2008), nesse caso, as plantas, por exemplo, podem aumentar a secreção das fosfatases ácidas para melhorar a solubilização e remobilização do fosfato promovendo maiores concentrações deste catalisador no solo.

Recentemente foi documentado que as atividades de ambas enzimas (β -glucosidase fosfatase ácida) foram favorecidas pela inoculação com FMA (400 g de solo-inóculo, mix de FMA) em cultivo de cana-de-açúcar (SALES, 2017), no entanto, não foi abordado de que forma os FMA contribuíram.

Investigar os efeitos dos inoculantes na performance da planta, na diversidade de FMA e na atividade biológica edáfica de forma integrada não foi e nem será uma tarefa fácil, sendo a participação e a contribuição de alguns pesquisadores imprescindíveis na construção da presente Tese. Considerando que ainda há muito a ser esclarecido e que o uso inadequado do solo pode comprometer a produção agrícola nas gerações futuras, os estudos de inoculação microbiana no ambiente não podem mais ser negligenciados.

3 MÉTODO

3.1 MÉTODOS GERAIS

3.1.1 Inoculantes micorrízicos: Inóculos de três isolados de FMA foram utilizados: *A. longula* (URM-FMA 07), *C. etunicatum* (URM-FMA 03) e *G. albida* (URM-FMA 01), fornecidos pelo Laboratório de Micorrizas/Departamento de Micologia-UFPE. Os inóculos (200 g) foram multiplicados quatro meses antes da montagem dos experimentos, em vasos com capacidade para 2 kg, tendo como substrato: areia e solo esterilizados (1:1 v/v) e o milho (*Zea mays* L.) como planta hospedeira. O número de propágulos infectivos de cada FMA foi estimado em bioensaio de acordo com Feldmann e Idczak (1994), visando equalizar os inóculos. A inoculação consistiu de solo-inóculo com cerca de 2.000 e 3.000 propágulos infectivos/vaso aplicado diretamente no solo abaixo das sementes nos experimentos da primeira e segunda etapa da Tese, respectivamente. Os isolados de FMA utilizados no presente estudo têm promovido benefícios significativos em plantas de milho (NOVAIS *et al.*, 2014) e de cana-de-açúcar (PEREIRA *et al.*, 2016).

3.1.2 Análises de crescimento e nutricionais das plantas: Para avaliação da biomassa seca aérea, amostras do material vegetal foram secas em estufa de ventilação forçada a 70 °C por 72h. Para determinação dos teores de P e de N, as amostras do material vegetal após a secagem, foram moídas e digeridas em mistura de ácido sulfúrico com peróxido de oxigênio. O P foi determinado por colorimetria (EMBRAPA, 1999) e o N total por destilação (BREMNER & MULVANEY, 1982).

3.1.3 Colonização micorrízica: Para avaliação da colonização micorrízica, amostras de 0,5 g de raízes de cada tratamento foram lavadas com água, diafanizadas com KOH (10%), coradas com azul de tripano (0,05%) em lactoglicerol (PHILLIPS & HAYMAN, 1970) e analisadas pelo método de interseção dos quadrantes (GIOVANETTI & MOSSE, 1980).

3.1.4 Extração e contagem de Glomerosporos: Os glomerosporos foram extraídos de 50g de solo via peneiramento úmido (GERDEMANN & NICOLSON, 1963), seguido de centrifugação em água e sacarose (50%) (JENKINS, 1964) e contados em placa

canaletada em estereomicroscópio (40x). Posteriormente, os glomerosporos extraídos foram montados em lâminas com PVLG (álcool-polivinílico em lactoglicerol) e/ou com Reagente de Melzer+PVLG, para observação ao microscópio.

3.1.5 Identificação morfológica dos glomerosporos e contagem por espécies: Para identificação foram consultados manuais de identificação (SCHENCK & PÉREZ, 1990, BLASZKOWSKI, 2012), a home page <http://invam.caf.wvu.edu> e publicações com a descrição de espécies.

3.2 ARTIGO 1 - ESTRUTURA DE ASSEMBLEIAS MICORRIZICAS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA RIZOSFERA DE FEIJÃO-CAUPI E CRESCIMENTO DESTA LEGUMINOSA APÓS INOCULAÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES NO SOLO.

3.2.1 Condições experimentais e coleta do solo: O experimento foi realizado em casa de vegetação no *Campus* de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Pernambuco, Nordeste do Brasil. O solo não esterilizado, do tipo Neossolo Fluvico, foi coletado na Universidade do Estado da Bahia (UNEB) e apresentava as seguintes características: 21 mg/dm³ de P; 4,4; 1,7; 0,1; 0,0 cmol/dm³ de Ca, Mg, Na e Al, respectivamente, e pH 6,7. Após a coleta, o solo foi destorroado, peneirado, uniformizado e distribuído em sacos plásticos pretos com capacidade para 2 Kg.

3.2.2 Inoculante bacteriano: Os inoculantes bacterianos (*Bradyrhizobium* BR 3267 e BR 3296) foram fornecidos pela Embrapa Agrobiologia, em veículo turfoso com concentração de 10⁹ células g⁻¹. A inoculação, nas sementes de feijão-caupi (BRS Pujante) consistiu de 10 g de inoculante bacteriano para cada 1 kg de sementes umedecidas.

3.2.3 Delineamento experimental: O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 17 tratamentos em cinco repetições (Tabela 1).

Tabela 1. Tratamentos de inoculação e de fertilização.

T1.	Inoculação com <i>A. longula</i>
T2.	Inoculação com <i>C. etunicatum</i>
T3.	Inoculação com <i>G. albida</i>
T4.	Mix FMA (<i>A. longula</i> + <i>C. etunicatum</i> + <i>G. albida</i>)
T5.	Inoculação com BR 3267
T6.	Inoculação com BR 3296
T7.	Mix de BFN (BR 3267+3296)
T8.	<i>A. longula</i> + BR3267
T9.	<i>A. longula</i> + BR3296
T10.	<i>C. etunicatum</i> + BR3267
T11.	<i>C. etunicatum</i> + BR3296
T12.	<i>G. albida</i> + BR3267
T13.	<i>G. albida</i> + BR3296
T14.	Fertilização com 50% da quantidade recomendada de P (superfosfato simples)
T15.	Fertilização com 100% da quantidade recomendada de N (uréia)
T16.	Sem inoculação e sem fertilização
T17.	Fertilização com 100% da quantidade recomendada de P

3.2.4 Análises complementares de crescimento vegetal: Aos 45 dias da semeadura (fase de floração), foram determinados a altura e o diâmetro do caule, com o auxílio de uma fita métrica e um paquímetro, respectivamente; e os teores de clorofila “a”, “b”, e “total” (determinados “*in vivo*” em medidor eletrônico “ClorofiLOG”). Só então, os vasos foram desmontados e as plantas colhidas, separando-se a parte radicular e a parte aérea, nessa foi avaliada a área foliar (as folhas foram fotografadas e analisadas no programa Quant 2002-2).

3.2.5 Contagem dos nódulos bacterianos: Os nódulos bacterianos, coletados aos 45 dias, foram quantificados manualmente por planta.

3.2.6 Índices ecológicos: Para analisar a estrutura da comunidade de FMA foram estimados os seguintes índices ecológicos: diversidade de Shannon (H'), equitabilidade de Pielou (J'), e a dominância (λ) por amostra. O índice de diversidade de Shannon (H') foi calculado de acordo com a equação: $-\sum (P_i \ln [P_i])$; onde $P_i = n_i/N$, n_i = número de indivíduos da espécie i , e N = número total de indivíduos de todas as espécies (SHANNON & WEAVER, 1949); o índice de equitabilidade de Pielou (J') foi obtido

pela equação $J' = H'/\log n$ (S) em que H' é o valor obtido pelo índice de Shannon e S é o número total de espécies (PIELOU, 1975). O índice de dominância de Simpson (C) foi calculado pela equação $C = \sum (n_i (n_i - 1) / N(N - 1))$.

3.2.7 Análise dos Dados: Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, e quando não atendiam à distribuição normal foram transformados antes da realização da análise de variância. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knot ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com auxílio do programa Assistat versão 7.7 beta (SILVA & AZEVEDO, 2016). Os índices ecológicos foram calculados com auxílio do programa Primer 6.0 (CLARKE E GORLEY, 2006). Os dados de abundância da comunidade foram relativizados, e as mudanças na comunidade foram analisadas por escalonamento multidimensional (MDS), utilizando a distância de Sorensen, com auxílio do programa Primer 6.0.

3.3 ARTIGO 2 - PERFORMANCE DE *Vigna unguiculata* [L] Walp EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ALÓCTONES EM CICLOS CONSECUTIVOS

3.3.1 Condições experimentais: O experimento foi realizado em casa de vegetação em condições naturais de temperatura (23,5 - 32,6 °C) e umidade relativa do ar (80%) no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco - Nordeste do Brasil. O solo utilizado, não esterilizado, foi coletado em área experimental de cultivo de feijão-caupi, localizada na estação experimental de Itapirema (Goiana-PE) do Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA. O solo é do tipo Argiloso Vermelho Amarelo distrófico (EMBRAPA, 2006) e apresentava as seguintes características: P (1 mg/dm³), pH 6,0 e 1,0; 0,75; 0,08 e 0,0 cmolc/dm³ de Ca, Mg, K e Al, respectivamente. Após a coleta, o solo foi destorroado, peneirado e colocado em vasos com capacidade para 3 kg. Foi utilizada a cultivar Miranda IPA-207, como planta hospedeira. Nenhum trabalho referente à associação micorrização dessa cultivar havia sido registrado. O experimento foi composto por dois ciclos com duração de 70 dias, cada. Ao final de cada ciclo, os vasos foram desmontados e as plantas colhidas, separando-se a parte radicular e a parte aérea. Considerando que o segundo ciclo da cultura poderia ser comprometido em virtude do teor quase nulo de P no solo, ao término da colheita do primeiro ciclo foi aplicado por vaso, apenas 1/3 da dosagem de P₂O₅ (60 kg/ha)

recomendada pelo IPA, visto que a alta disponibilidade de P no solo pode influenciar a dinâmica dos FMA (CRUZ *et al.*, 2017).

3.3.2 Delineamento experimental

No primeiro ciclo, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos: (a) plantas controle (não inoculadas), (b) inoculação com *A. longula*, (c) inoculação com *C. etunicatum* e (d) inoculação com *G. albida*, em 10 repetições, com exceção do tratamento controle, que consistiu de cinco repetições.

No segundo ciclo, o delineamento foi fatorial duplo (tipos de inoculação x isolados de FMA) + 1 tratamento adicional (controle não inoculado). Metade dos tratamentos que foram inoculados no primeiro ciclo foi reinoculada com o respectivo FMA (inoculação consecutiva) e a outra metade não foi inoculada (sem inoculação consecutiva). Desta forma, os seguintes tratamentos foram testados (Tabela 2), em cinco repetições.

Tabela 2. Tratamentos de inoculação testados no segundo ciclo de crescimento da cultura

T1.	Controle (não inoculado)		
T2.	reinoculado com <i>A. longula</i>	T2'.	não-reinoculado com <i>A. longula</i>
T3.	reinoculado com <i>C. etunicatum</i>	T3'.	não-reinoculado com <i>A. longula</i>
T4.	reinoculado com <i>G. albida</i>	T4'.	não-reinoculado com <i>A. longula</i>

O solo utilizado no experimento não foi esterilizado; portanto, todos os tratamentos continham FMA nativos. Foi mantida apenas uma planta por vaso durante o experimento.

3.3.3 Análises complementares da planta: aos 45 (no primeiro e no segundo ciclo) e aos 52 dias (apenas no segundo ciclo) foi registrado o número de plantas na fase de floração., enquanto que a contagem do número de folhas foi realizada no final do experimento (70 dias).

3.3.4 Análise dos dados: Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas utilizando as funções marginal e cld do pacote emmeans (LENTH, 2018) e as funções stats do R shapiro.test,

bartlett.test e anova; os dados do segundo ciclo foram analisados como fatorial duplo (com e sem inoculação consecutiva x isolados de FMA) com um tratamento adicional (controle/testemunha) utilizando a função fat2.ad.dic do pacote Expdes.pt (FERREIRA *et al.*, 2018). Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa R (R CoreTeam, 2018) e os resultados dos dois ciclos foram analisados de forma independente.

3.4 ARTIGO 3 - POTENCIAL IMPACTO DA INOCULAÇÃO COM GIGASPORA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DIVERSIDADE E PROPÁGULOS INFECTIVOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM CICLOS CONSECUTIVOS DE FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS

3.4.1 Condições experimentais: o experimento foi realizado em casa de vegetação em condições naturais de temperatura (23,5 - 32,6 °C) e umidade relativa do ar (80%) no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco - Nordeste do Brasil. O solo utilizado, não esterilizado, foi o mesmo do Artigo 2.

O experimento foi composto por três ciclos com duração de 70 dias, cada. No final do primeiro e segundo ciclo foi aplicado, por vaso, 1/3 da dosagem de P₂O₅ (60 kg ha⁻¹) recomendada pelo IPA (considerando o baixo teor de P no solo e a quantidade de ciclos requeridos para o estabelecimento da cultura: três). Ao final de cada um dos ciclos, os vasos foram desmontados e 200 g de solo foram retirados para avaliação da atividade biológica do solo e diversidade de FMA. Visando restabelecer os 3 Kg de solo experimental, 200 g de solo-esterilizado eram depositados no vaso após a retirada da amostra.

3.4.2 Delineamento experimental: o delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 4 x 3, com cinco repetições, sendo quatro tratamentos de inoculação: (I) controle- não inoculado, (II) inoculação com *G. albida* apenas no primeiro ciclo-GAP, (III) inoculação com *G. albida* em ciclos alternados, ou seja, no primeiro e terceiro ciclo-GAL e (IV) inoculação com *G. albida* em todos os ciclos-GAT versus três tratamentos tempo: (I) primeiro ciclo, (II) segundo ciclo e (III) terceiro ciclo. O solo utilizado no experimento também não foi esterilizado e portanto, continham FMA nativos. Foi mantida apenas uma planta por vaso durante o experimento.

3.4.3 Análises microbiológicas:

3.4.3.1 Número de propágulos infectivos de FMA: ao fim do terceiro ciclo, preparou-se uma amostra composta de solo para cada tratamento, sendo realizadas diluições sucessivas do “solo amostra” em areia autoclavada, nas proporções 0, 1:10, 1:100, 1:1000 (solo inóculo - areia autoclavada) com cinco repetições (FELDMANN; IDZACK, 1994). Os potes foram mantidos em casa-de-vegetação, tendo como hospedeiro o milho (*Zea mays* L.). Após 30 dias, raízes finas foram extraídas das amostras de solo, diafanizadas com KOH (10%) e coradas com azul de tripano (0,05%) (PHILLIPS; HAYMAN, 1970).

3.4.3.2 Carbono da biomassa microbiana (C-BM): o carbono da biomassa microbiana foi estimado ao final de cada ciclo da cultura pela fumigação com clorofórmio livre de etanol em 10 g solo, seguido da extração do carbono com 25 mL de sulfato de potássio (0,5 M) e oxidação com 1 mL de dicromato de potássio (0,66 mM) em meio com 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 0,5 mL de ácido fosfórico concentrado. A quantificação do carbono foi realizada pela titulação com sulfato ferroso amoniacal (0,033 N), usando difenilamina 1 % como indicador. Os valores foram calculados a partir das amostras de solo fumigadas e não fumigadas, empregando o fator de correção $KC = 0,33$ e os valores expressos em $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo seco (DE-POLLI; GUERRA, 1997).

3.4.3.3 Respiração edáfica basal (C-CO₂): para estimar a respiração edáfica ao final de cada ciclo da cultura, alíquotas de 100 g de solo foram incubadas em frasco rosqueável com 10 mL de KOH (0,5 N) por sete dias. O CO₂ foi quantificado por titulação com HCl 0,1 N, utilizando fenolftaleína (0,1 % em etanol) e alaranjado de metila (1 %) como indicadores de pH. O CO₂ emitido pela respiração dos micro-organismos foi expresso em $\mu\text{g C-CO}_2/\text{g}$ de solo seco (GRISI, 1978).

3.4.3.4 Coeficiente metabólico: o coeficiente metabólico foi obtido pela razão entre a emissão de C-CO₂ por C-BM.

3.4.3.5 Atividade da fosfatase ácida: a atividade da fosfatase ácida foi determinada ao final de cada ciclo da cultura em amostras de 0,5 g de solo, que foram incubadas por 1 h a 37 °C com 0,1 mL de tolueno, 2 mL tampão MUB (pH 6,5) e 0,5 mL de solução de p-

NPP (p-Nitrofenilfosfato) (0,115 M). Após esta reação foram adicionados 0,5 mL de CaCl_2 (0,5 M) e 2 mL de NaOH (0,5 M). As amostras foram filtradas e as leituras realizadas em espectrofotômetro (400 nm). Para a curva padrão foram utilizadas concentrações crescentes de p-nitrofenol e a atividade enzimática expressa em mg p-NPP g^{-1} solo seco h^{-1} (TABATABAI; BREMMER, 1969).

3.4.3.6 Atividade da β -glicosidase: na avaliação da atividade da β -glicosidase, amostras de 0,5 g de solo foram incubadas por 1 h a 37°C com 0,1 mL de tolueno, 2 mL tampão MUB (pH 6,5) e 0,5 mL de solução de (p-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo) (25 mM). Após esta reação foram adicionados 0,5 mL de CaCl_2 (0,5 M) e 2 mL de tampão Tris (pH 12). As amostras foram filtradas e as leituras realizadas em espectrofotômetro (400 nm). Para a curva padrão foram utilizadas concentrações crescentes de p-nitrofenol e a atividade enzimática expressa em mg p-NPP g^{-1} solo seco h^{-1} (EIVAZI; TABATABAI, 1988).

3.4.3.7 Análise dos dados: Os dados foram analisados em arranjo fatorial duplo 4x3: sendo quatro tratamentos de inoculação vs. três ciclos de cultivo. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 - ESTRUTURA DE ASSEMBLÉIAS MICORRÍZICAS DE FUNGOS ARBUSCULARES NA RIZOSFERA DE FEIJÃO-CAUPI E CRESCIMENTO DESTA LEGUMINOSA APÓS INOCULAÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES NO SOLO

O uso de inoculantes promoveu efeito significativo no crescimento foliar, nos teores de P e N das plantas, na colonização micorrízica, no número de glomerosporos do solo e na estrutura da comunidade nativa de FMA ($p < 0,05$). As plantas inoculadas apenas com FMA e as adubadas com ureia e superfosfato simples apresentaram área foliar maior que às plantas controle (Tabela 3), indicando que a inoculação micorrízica promoveu aumento nesse parâmetro de forma similar ao obtido com a aplicação de fertilizantes. Os isolados bacterianos diferiram quanto aos efeitos no feijão-caupi (BRS Pujante), sendo mais pronunciados na presença de inoculantes com FMA. A inoculação com o rizóbio BR3296, em combinação com os isolados de FMA, não resultou em aumento na área foliar, ao contrário da associação dos isolados de FMA com o rizóbio BR3267 que, de modo geral, promoveu aumento nesta variável em relação às plantas controle (Tabela 3).

O diâmetro do caule (4,14 cm), a altura (37,5 cm), a biomassa seca da parte aérea (3,16 g), os teores de clorofila a (37,1 ICF), b (17,8 ICF) e totais (59,9 ICF) e a quantidade de nódulos nas raízes (75,4 nódulos planta⁻¹) das plantas inoculadas não diferiram estatisticamente das plantas não inoculadas ($p > 0,05$). As inoculações e as fertilizações não promoveram aumento nos teores de P e de N das plantas, exceto o tratamento com maior quantidade de P (Tabela 3), que aumentou a concentração desse elemento na biomassa. Por outro lado, contribuíram para maiores taxas de colonização micorrízica (Figura 5).

Tabela 3. Área foliar, teores de P e de N da parte aérea de plantas de feijão-caupi (BRS Pujante) inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN), após 45 dias da semeadura em casa de vegetação.

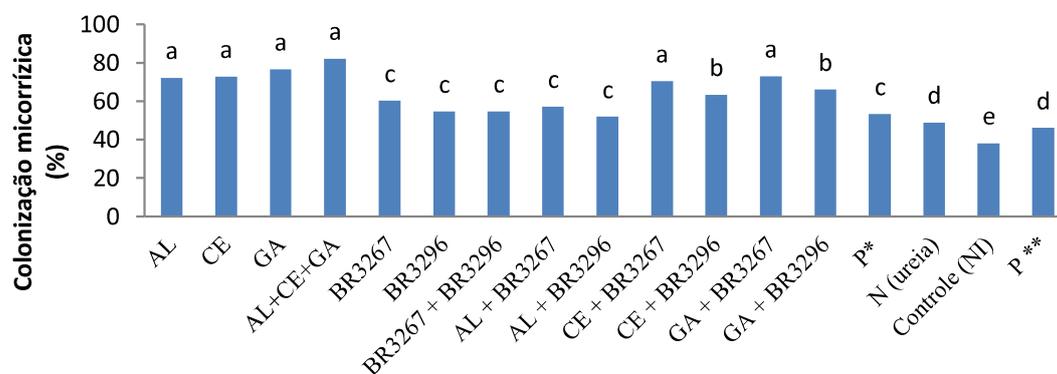
Tratamentos de inoculação	Área foliar (cm ²)	P (g k ⁻¹)	N (g k ⁻¹)
<i>A. longula</i> (AL)	814,63 a	1,73 c	41,24b
<i>C. etunicatum</i> (CE)	794,65 a	1,97 b	45,76a
<i>G. albida</i> (GA)	771,29 a	1,70 c	47,24a
Mix FMA (AL+CE+GA)	765,39 a	1,57 c	41,80b
BR3267	834,07 a	1,90 b	43,64a
BR3296	731,01 b	1,79 c	41,50b
Mix BFN (BR3267 + BR3296)	805,98 a	1,76 c	41,78b
AL + BR3267	707,09 b	1,72 c	39,84b
AL + BR3296	668,74 b	2,02 b	43,20a
CE + BR3267	786,12 a	2,02 b	41,42b
CE + BR3296	721,06 b	1,93 b	44,08a
GA + BR3267	776,77 a	1,94 b	43,78a
GA + BR3296	743,66 b	1,84 c	43,48a
P*	701,07 b	1,92 b	41,42b
N (ureia)	788,40 a	1,96 b	41,84b
Controle (NI)	684,85 b	2,03 b	44,54a
P**	868,32 a	2,42 a	44,10a
CV(%)	11,29	10,81	6,77

NI: Não inoculado; Fonte de P*: 50% da dosagem; Fonte de P**100% da dosagem recomendada para o feijão-caupi; CV: coeficiente de variação; Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As maiores taxas de colonização foram observadas nas plantas inoculadas com FMA, e nas duplamente inoculadas com *C. etunicatum* + BR3267 e com *G. albida* + BR3267 (Figura 5). Embora as taxas de colonização micorrízica tenham sido menores (em geral) nas plantas co-inoculadas e nas tratadas apenas com rizóbios, elas foram significativamente maiores que as das plantas controle (não inoculadas). O número de glomerosporos no solo foi significativamente reduzido após a introdução dos rizóbios (Figura 6) em comparação ao tratamento controle (sem inoculação), no entanto, esse resultado não foi observado quando houve a inoculação com rizóbios e FMA.

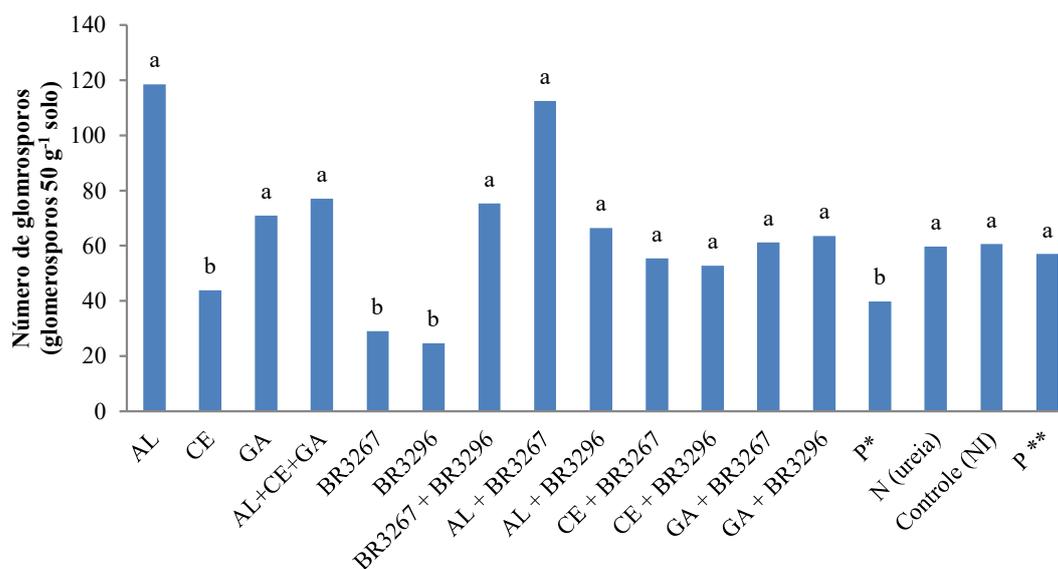
Entre as correlações observadas (Tabela 4), destacam-se: 1) a correlação negativa entre a colonização micorrízica e o teor de P do solo, demonstrando que na medida em que a disponibilidade desse nutriente aumenta no solo a colonização micorrízica fica comprometida; 2) a correlação positiva entre a colonização micorrízica e a relação da BSA/BSR, refletindo que as maiores taxas de colonização resultaram em maior benefício no crescimento das plantas; 3) a correlação positiva entre os teores de P e de N, indicando que o aumento do teor de P na planta também favorece o aumento do teor de N.

Figura 5: Percentual da colonização micorrízica em plantas de feijão-caupi (BRS Pujante) inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (AL: *A. longula*; CE: *C. etunicatum*; GA: *G. albida*) e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio (BR3267 e BR3296), após 45 dias da semeadura em casa de vegetação; Fonte de P*: 0,0825g; NI: Não inoculado; Fonte de P**: 0,165g; Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: A autora

Figura 6: Número de glomerosporos em solo com plantas de feijão-caupi (BRS Pujante) inoculadas ou não com fungos micorrízicos arbusculares (AL: *A. longula*; CE: *C. etunicatum*; GA: *G. albida*) e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio (BR3267 e BR3296), após 45 dias da semeadura em casa de vegetação; Fonte de P*: 0,0825g; NI: Não inoculado; Fonte de P**: 0,165g; Médias seguidas pelas mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



Fonte: A autora

Tabela 4. Coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis.

	AF	DM	AL	CL a	CL b	CL total	BSA	BSR	BSA/BSR	P	N	CM	GLOM	NÓD
AF														
DM	0,11 ^{ns}													
AL	0,20 ^{ns}	-0,05 ^{ns}												
CL a	0,00 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,16 ^{ns}											
CL b	-0,08 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	0,90 ^{**}										
CL total	-0,03 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	0,84 ^{**}	0,92 ^{**}									
BSA	0,24 *	0,20 ^{ns}	0,24 *	0,12 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,13 ^{ns}								
BSR	0,07 ^{ns}	0,10 ^{ns}	-0,42 ^{**}	0,25 *	0,35 ^{**}	0,32 ^{**}	0,06 ^{ns}							
BSA/BSR	0,01 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	0,46 ^{**}	-0,15 ^{ns}	-0,25 *	-0,23 *	0,26 *	-0,91 ^{**}						
P	0,14 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	0,07 ^{ns}					
N	0,08 ^{ns}	0,16 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	-0,21 *	-0,16 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,33 ^{**}				
CM	0,16 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	0,00 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,24 *	-0,36 ^{**}	0,01 ^{ns}			
GLOM	0,01 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,19 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,06 ^{ns}		
NÓD	0,10 ^{ns}	0,14 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,17 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	0,10 ^{ns}	

** significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0,01); * significativo ao nível de 5% de probabilidade (p < 0,05); ns não significativo (p > 0,05) AF: área foliar; DM: diâmetro do caule; AL: altura da planta; CL a: clorofila a; CL b: clorofila b; CL total: clorofila total; BSA: biomassa seca aérea; BSR: biomassa seca radicular; CM: colonização micorrizica; GLOM: glomerosporos; NÓD: nódulos bacterianos.

No final do experimento foram identificados 29 táxons de FMA pertencentes a 11 gêneros (Tabela 5). *Acaulospora* foi o gênero mais representativo com 13 espécies; *Gigaspora*, *Glomus* e *Ambispora* foram representados por quatro, três e duas espécies, respectivamente. *Cetraspora*, *Claroideoglomus*, *Corymbiglomus*, *Dentiscutata*, *Entrophospora*, *Racocetra* e *Septoglomus* foram representados por uma espécie cada (Tabela 5). A maior riqueza de táxons de FMA (14 táxons distribuídos em sete gêneros) foi registrada no solo inoculado com o mix de FMA. Por outro lado, a menor riqueza (6 táxons distribuídos em cinco gêneros) foi observada no solo co-inoculado com GA+BR3296 (Tabela 5).

Considerando as co-inoculações, observou-se que a riqueza de FMA foi maior após a inoculação com os isolados de FMA + BR3267 do que com os isolados de FMA + BR3296. Vale ressaltar que a menor riqueza de FMA, menores teores de P, colonização micorrízica e crescimento foliar foram registrados nos tratamentos inoculados com BR 3296, sugerindo um potencial efeito negativo do rizóbio BR3296 sobre esses parâmetros. Foi constatado também que com a aplicação da menor dose de P a riqueza de FMA foi favorecida (13 espécies distribuídas em 8 gêneros), ao contrário do observado para a dosagem maior de P em que foi observado baixo valor para a riqueza (8) (Tabela 5).

Acaulospora longula foi a espécie mais abundante entre as registradas e foi responsável pela produção de mais da metade dos glomerosporos extraídos, confirmando assim seu estabelecimento bem sucedido na presença dos FMA nativos (Tabela 5). Foi observada diferença na estrutura da comunidade de FMA entre os tratamentos inoculados com *G. albidia*+BR 3267 e *A. longula* ($p < 0,05$). Maior diversidade de Shannon e equitabilidade de Pielou foram observados no tratamento inoculado com *G. albidia*+ BR 3267, enquanto que maior dominância foi encontrada no tratamento inoculado só com *A. longula* (Tabela 6).

A análise de escalonamento multidimensional mostrou que os tratamentos inoculados com *A. longula* apresentaram maior similaridade entre si e separaram dos demais tratamentos (Figura 7).

Tabela 5. Espécies e abundância de FMA isolados do solo inicial e do solo inoculado com FMA e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio, após 45 dias da semeadura em casa de vegetação.

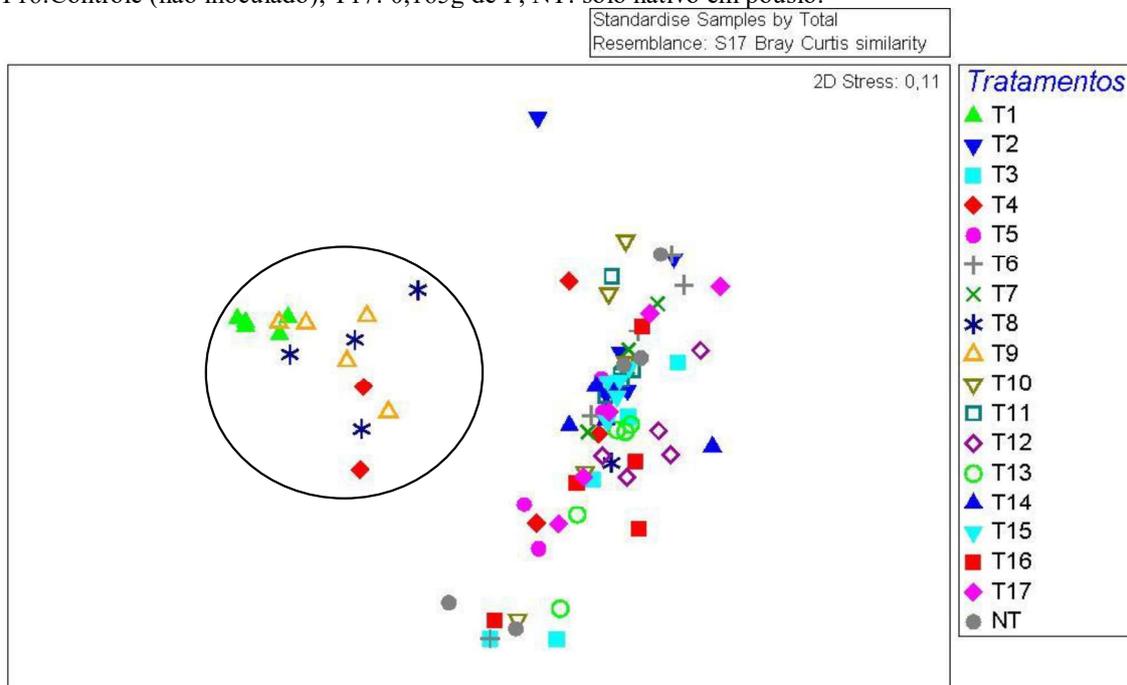
Táxons de FMA	AL	CE	GA	Mix FMA	Mix BR3267	Mix BR3296	Mix BFN	AL + BR3267	AL + BR3296	CE + BR3267	CE + BR3296	GA + BR3267	GA + BR3296	P*	N	NI (controle)	P**
<i>Acaulospora elegans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>Acaulospora longula</i>	241	-	-	31	1	-	-	137	142	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>Acaulospora mellea</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
<i>Acaulospora morrowiae</i>	-	-	-	-	-	-	1	8	-	-	-	-	-	5	-	-	-
<i>Acaulospora reducta</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
<i>Acaulospora scrobiculata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	1	2
<i>Acaulospora</i> sp1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acaulospora</i> sp2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Acaulospora</i> sp3	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>Acaulospora</i> sp4	-	-	-	2	-	-	-	2	1	-	-	1,25	-	-	-	2	-
<i>Acaulospora</i> sp5	-	1	-	-	1	-	-	2	-	1	-	-	-	1	-	-	-
<i>Acaulospora</i> sp6	-	-	-	1	-	2	-	1	-	1	1	-	-	-	3	-	1
<i>Acaulospora</i> sp7	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ambispora appendicula</i>	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ambispora</i> , sp.	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cetranspora pellucida</i>	4	-	2	1	2	1	1	5	1	1	-	2,5	-	1	1	2	3
<i>Claroideoglonus etunicatum</i>	1	9	-	1	-	-	-	-	-	10	11	-	-	-	-	-	-
<i>Corymbiglonus tortuosum</i>	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Denticutata cerradensis</i>	1	-	-	-	-	1	2	-	-	4	3	2,5	1	2	2	1	1

Tabela 6. Índice de diversidade de Shannon, dominância e equitabilidade de Pielou referentes a comunidade de FMA do solo em pousio e do solo inoculado com FMA e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio, após 45 dias da semeadura em casa de vegetação.

Tratamentos de inoculação	Shannon	Dominância	Pielou
<i>A. longula</i> (AL)	0,50 b	0,76 a	0,37 b
<i>C. etunicatum</i> (CE)	0,97 ab	0,43 ab	0,72ab
<i>G. Albida</i> (GA)	0,86 ab	0,47 ab	0,82 ab
Mix FMA (AL+CE+GA)	1,14 ab	0,37 ab	0,78 ab
BR3267	1,03 ab	0,35 ab	0,81 ab
BR3296	0,61 ab	0,63 ab	0,78 ab
Mix BFN (BR3267 + BR3296)	0,95 ab	0,48 ab	0,63 ab
AL + BR3267	1,02 ab	0,44 ab	0,66 ab
AL + BR3296	0,81 ab	0,56 ab	0,59 ab
CE + BR3267	1,09 ab	0,39 ab	0,76 ab
CE + BR3296	1,15 ab	0,36 ab	0,76 ab
GA + BR3267	1,36 a	0,26 b	0,84 a
GA + BR3296	1,07 ab	0,36 ab	0,82 ab
P*	1,21 ab	0,30 b	0,81 ab
N (ureia)	0,96 ab	0,43 ab	0,78 ab
Controle (NI)	1,10 ab	0,39 ab	0,74 ab
P**	0,86 ab	0,45 ab	0,75 ab
NT	0,81 ab	0,50 ab	0,70 ab

Fonte de P*: 50% da dosagem; NI: Não inoculado e não fertilizado; Fonte de P**:100% da dosagem recomendada para a cultura.

Figura 7. Análise de escalonamento multidimensional (MDS) baseado na comunidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) na rizosfera de feijão-caupi provenientes de solo inoculado com FMA e/ou bactérias fixadoras de nitrogênio após 45 dias da semeadura em casa de vegetação. T1: *A. longula* (AL); T2: *C. etunicatum* (CE); T3: *G. Albida* (GA); T4: Mix FMA (AL+CE+GA); T5: rizóbio BR3267; T6: rizóbio BR3296; T7: Mix rizóbio (BR3267 + BR3296); T8: AL + BR3267; T9: AL + BR3296; T10: CE + BR3267; T11: CE + BR3296; T12: GA + BR3267; T13: GA + BR3296; T14: 0,0825g de P; T15: N (ureia); T16: Controle (não inoculado); T17: 0,165g de P; NT: solo nativo em pousio.



Fonte: A autora

4.2 ARTIGO 2 – PERFORMANCE DE VIGNA UNGUICULATA [L] WALP EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ALÓCTONES EM CICLOS CONSECUTIVOS.

No primeiro ciclo não houve diferença entre o tratamento controle e os tratamentos de inoculação para altura, diâmetro do caule e número de folhas ($p > 0,05$) (Tabela 7). A biomassa seca da parte aérea foi maior no tratamento controle e no tratamento com *A. longula* quando comparada à registrada no tratamento com *G. albida* ($p < 0,05$) (Tabela 7). Diferenças nos teores de N e K foram observadas apenas entre as plantas inoculadas com FMA, sendo os maiores valores observados nas plantas inoculadas com *A. longula* e com *C. etunicatum* em relação às inoculadas com *G. albida* (Tabela 7). O teor de P diferiu apenas entre as plantas inoculadas com *C. etunicatum* e com *G. albida*, com maiores valores observados no primeiro tratamento (Tabela 7).

No segundo ciclo foi observada interação significativa para o número de folhas entre os fatores (tipos de inoculação x isolados de FMA) ($p < 0,05$) (Tabela 8). As

plantas que foram reinoculadas com *C. etunicatum* desenvolveram mais folhas do que as plantas não-reinoculadas com o mesmo isolado (Tabela 8). Todas as plantas inoculadas (fatorial), independente do fungo e da inoculação, apresentaram mais folhas do que às plantas controle (adicional).

A plantas reinoculadas apresentaram maior biomassa vegetal em relação às plantas não-reinoculadas, independente do fungo aplicado ($p < 0,05$) (Tabela 8). Observou-se também que a biomassa foi maior nas plantas inoculadas com *A. longula* em relação às inoculadas com *C. etunicatum*. A altura e o diâmetro do caule das plantas também foram maiores nas plantas inoculadas com *A. longula* em relação às inoculadas com *C. etunicatum* (Tabela 8). Não houve diferença nos teores de NPK entre as plantas inoculadas (fatorial) e as controle (adicional), nem efeito dos fatores (tipos de inoculação x isolados de FMA) (Tabela 9).

Tabela 7. Crescimento, concentrações de nutrientes e colonização micorrízica de feijão-caupi em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares alóctones, em solo não esterilizado, após o primeiro ciclo da cultura.

Tratamentos	Massa seca aérea (g)	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Nº de folhas	Teor de nitrogênio (%)	Teor de fósforo (%)	Teor de potássio (%)	Colonização micorrízica (%)
Controle	1,71 a	26,00 a	4,02 a	3,40 a	0,61 ab	0,07 ab	0,43 ab	82,40 a
<i>A. longula</i>	1,70 a	27,62 a	4,16 a	3,80 a	0,71 a	0,06 ab	0,55 a	75,70 b
<i>C. etunicatum</i>	1,45 ab	25,26 a	3,96 a	3,00 a	0,74 a	0,08 a	0,51 a	68,30 c
<i>G. albida</i>	1,23 b	25,00 a	3,71 a	3,20 a	0,45 b	0,05 b	0,32 b	74,00 b

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8. Crescimento do feijão-caupi em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares alóctones, em solo não esterilizado, após o segundo ciclo da cultura

Biomassa seca (g)				
Tratamentos	<i>A. longula</i>	<i>C. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	Média
CIC	2,30	1,76	2,07	2,04 A
SIC	2,09	1,23	1,39	1,61 B
Média	2,19 a	1,55 b	1,73 ab	
Fatorial vs Adicional				
Adicional	2,24			
Fatorial	1,82			
Altura (cm)				
Tratamentos	<i>A. longula</i>	<i>C. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	Média
CIC	26,20	21,00	22,80	23,33 B
SIC	27,10	23,50	25,00	25,31 A
Média	26,65 a	22,41 b	23,90 b	
Fatorial vs Adicional				
Adicional	24,60			
Fatorial	24,32			
Diâmetro do caule (mm)				
Tratamentos	<i>A. longula</i>	<i>C. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	Média
CIC	4,68	3,90	4,33	4,31
SIC	4,34	4,12	4,30	4,25
Média	4,51 a	4,04 b	4,30 ab	
Fatorial vs Adicional				
Adicional	4,30			
Fatorial	4,28			
Número de folhas				
Tratamentos	<i>A. longula</i>	<i>C. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	Média
CIC	4,60 Aa	4,40 Aa	2,40 Ab	3,80
SIC	4,20 Aa	2,42 Ba	3,80 Aa	3,42
Média	4,4	2,22	3,10	
Fatorial vs Adicional				
Adicional	2,00 B			
Fatorial	3,64 A			

CIC= com inoculação consecutiva, SIC= sem inoculação consecutiva. Médias seguidas da mesma letra, minúscula na linha e maiúsculas na coluna, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias sem letras não diferem estatisticamente.

Tabela 9. Porcentagens de nutrientes da biomassa seca aérea e taxas de colonização micorrízica de plantas de feijão-caupi em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares alóctones, em solo não esterilizado, após o segundo ciclo da cultura.

Teor de Nitrogênio (%)				
Tratamentos	<i>A. longula</i>	<i>C. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	Média
CIC	2,92	2,43	2,13	2,49
SIC	3,00	3,36	2,21	2,86
Média	2,96	2,89	2,17	
Fatorial vs Adicional				
Adicional	3,08			
Fatorial	2,67			
Teor de Fósforo (%)				
Tratamentos	<i>A. longula</i>	<i>C. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	Média
CIC	0,23	0,16	0,16	0,12
SIC	0,19	0,24	0,13	0,12
Média	0,13	0,13	0,10	
Fatorial vs Adicional				
Adicional	0,12			
Fatorial	0,12			
Teor de Potássio (%)				
Tratamentos	<i>A. longula</i>	<i>C. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	Média
CIC	0,30	0,47	0,19	0,32
SIC	0,32	0,48	0,33	0,38
Média	0,31 ab	0,47 a	0,26 b	
Fatorial vs Adicional				
Adicional	0,28			
Fatorial	0,35			
Colonização micorrízica (%)				
Tratamentos	<i>A. longula</i>	<i>C. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	Média
CIC	72,20	73,80	66,20	70,70 A
SIC	70,60	59,20	59,20	63,00 B
Média	71,4 a	66,5 ab	62,7 b	
Fatorial vs Adicional				
Adicional	55,20 B			
Fatorial	66,87 A			

CIC= com inoculação consecutiva, SIC= sem inoculação consecutiva. Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúsculas na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias sem letras não diferem estatisticamente.

No primeiro ciclo, 60% das plantas não-inoculadas (controle) apresentavam inflorescência aos 45 dias, diferentemente das inoculadas, que não apresentavam floração (com exceção de 10% das plantas inoculadas com *G. albida*).

No segundo ciclo, 26,6% de todas as plantas com inoculação consecutiva, apresentavam-se na fase de floração aos 45 dias, enquanto as plantas dos demais tratamentos (não-reinoculadas e controle) não apresentaram inflorescência, no mesmo período. Uma semana depois (52 dias), 86,6% das plantas com inoculação consecutiva estavam em floração enquanto 60 e 80% das plantas não-reinoculadas e controle, respectivamente, apresentavam inflorescência.

No primeiro ciclo, a colonização micorrízica diferiu significativamente entre os tratamentos, sendo as maiores taxas registradas nas plantas controle em relação às inoculadas (Tabela 2) ($p < 0,05$).

No segundo ciclo, foi observada interação significativa para a taxa de colonização entre os fatores (tipos de inoculação x isolados de FMA) (Tabela 9) ($p < 0,05$). As maiores taxas de colonização radicular foram registradas nas plantas do solo com inoculação consecutiva em relação às plantas não-reinoculadas (Tabela 9). Maiores porcentagens de colonização foram observadas nas plantas do solo inoculado com *A. longula* em relação às plantas do solo inoculado com *G. albida* (Tabela 9). Maior colonização radicular foi observada nas plantas inoculadas (fatorial) em comparação às plantas com FMA nativos (adicional) (Tabela 9).

4.3 ARTIGO 3 - POTENCIAL IMPACTO DA INOCULAÇÃO COM GIGASPORA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DIVERSIDADE E PROPÁGULOS INFECTIVOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM CICLOS CONSECUTIVOS DE FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS

Quarenta e seis táxons de FMA, pertencentes a quinze gêneros, foram identificados durante todo o experimento. *Acaulospora* foi o gênero mais representativo, com doze espécies, seguido de *Glomus*, que apresentou sete (Tabela 10). *Racocetra* e *Gigaspora* foram representados por cinco e quatro espécies, respectivamente, enquanto que *Cetraspora* e *Dentiscutata* tiveram 3 espécies, cada. *Fuscutata*, *Rhizoglomus* e *Scutellospora* apresentaram duas espécies ao contrário de *Ambispora*, *Claroideoglomus*, *Funneliformis*, *Kuklospora*, *Orbispora*, *Paradentiscutata*, que apresentaram uma espécie, cada (Tabela 10).

Nenhuma espécie de *G. albida* foi registrada no tratamento controle nos dois primeiros ciclos do experimento, ao contrário dos solos inoculados, que apresentaram o registro da espécie desde o primeiro ciclo (Tabela 10). Em comparação ao controle, o solo inoculado consecutivamente apresentou maior abundância de *G. albida* e riqueza de FMA, sendo a diferença observada a partir do 2º ciclo do experimento (Tabela 11).

Analisando a diversidade (em que se considera a riqueza e sua equitabilidade) da comunidade de FMA, observou-se que houve efeito da inoculação com *G. albida* nesse parâmetro apenas no primeiro ciclo, onde ela foi maior em todas as parcelas inoculadas em relação ao solo controle (Tabela 12).

Analisando a dinâmica da população mais abundante no solo, que foi a de *G. macrocarpum* (Tabela 11), observou-se que a aplicação do inoculante impactou negativamente, sendo menor em todos os solos inoculados em comparação ao solo controle. No entanto, ao final do terceiro ciclo, não foi observada diferença significativa na abundância do *G. macrocarpum* entre o solo controle e os solos inoculados (GAP, GAL e GAT).

Ao fim do terceiro ciclo, não houve diferença no número de glomerosporos entre o solo controle e os solos inoculados. Analisando o primeiro ciclo, notou-se também que em dois dos três tratamentos de inoculação, houve uma redução no número de glomerosporos do solo após a inoculação com *G. albida* (Tabela 12). Maior número de propágulos infectivos de FMA foi registrado no solo GAT, seguido pelo GAL (Tabela 13).

Tabela 10. Identificação e abundância de táxons de FMA isolados do solo controle (sem inoculação) e do solo inoculado com *Gigaspora albida* no primeiro ciclo (GAP), em ciclos alternados (GAL) e em todos os ciclos (GAT) do feijão-caupi.

Táxons de FMA	Controle			GAP			GAL			GAT		
	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo
<i>Acaulospora elegans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. foveata</i>	1	1	-	-	2	2	2	1	2	1	-	3
<i>A. laevis</i>	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-
<i>A. longula</i>	-	9	8	3	3	22	-	-	5	-	-	18
<i>A. mellea</i>	5	5	4	1	3	3	3	7	1	1	4	3
<i>A. morrowiae</i>	17	7	7	10	2	4	5	5	12	11	15	12
<i>A. scrobiculata</i>	1	5	-	2	5	4	5	-	7	3	5	2
<i>A. rehmsii</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
<i>A. papillosa</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
<i>A. reducta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3
<i>A. spinosa</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	1	-
<i>Acaulospora</i> sp 1 ornamentada	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ambispora apendicula</i>	8	3	1	3	2	2	2	7	5	4	8	9
<i>Cetraspora gilmorei</i>	-	-	2	-	4	-	-	3	3	1	8	3
<i>C. sp cremada</i>	1	-	-	-	1	-	-	1	-	-	3	-
<i>C. pellucida</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	2	1	-
<i>Claroideoglossus etunicatum</i>	2	12	5	58	14	5	14	4	3	5	1	9
<i>Dentiscutata cerradensis</i>	-	1	-	-	-	-	1	2	1	1	5	1
<i>D. scutata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-
<i>D. reticulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	11	9	-	11	4
<i>Funneliformis halonatum</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fuscutata aurea</i>	7	2	1	7	5	1	13	16	7	10	18	14
<i>F. heterogama</i>	-	1	-	4	-	1	12	6	3	6	5	9
<i>Gigaspora albida</i>	-	-	4	95	33	36	30	169	178	44	325	208

Tabela 11. Abundância de *Gigaspora albida* e de *Glomus macrocarpum* e riqueza de FMA dos solos controle (sem inoculação) e inoculados com *G. albida* no primeiro ciclo (GAP), no primeiro e terceiro ciclo (GAL) e em todos os ciclos (GAT) do feijão-caupi.

	Abundância de <i>G. albida</i>			Abundância de <i>G. macrocarpum</i>			Riqueza de FMA		
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo
Controle	0,00 aA	0,0 aB	0,80 aB	191,4 aA	103,2 bA	73,40 bA	8,00 aB	11,8 aB	10,4 a B
GAP	19,0 aA	6,6 aB	7,20 aAB	66,00 aB	35,60 aB	59,20 aA	14,0 aA	13,2 aAB	12,8 aAB
GAL	6,00 aA	33,8 aAB	35,6 aAB	108,0 aB	47,00 bAB	77,60 abA	12,4 aA	15,4 aAB	14,4 aAB
GAT	8,80 bA	65,0aA	41,6 abA	71,80 aB	69,80 aAB	112,2 aA	11,6 bAB	16,6 aA	16,0 aA

Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na linha e maiúscula na coluna) não diferem pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 12. Número de glomerosporos (GLO) e índice de diversidade de Shannon do solo controle (sem inoculação) e dos solos inoculados com *G. albida* no primeiro ciclo (GAP), no primeiro e terceiro ciclo (GAL) e em todos os ciclos (GAT) do feijão-caupi.

	GLO (50 g ⁻¹ solo)			Diversidade de Shannon		
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo
Controle	279,4 aA	195,4 bAB	176,0 bAB	0,63 bC	1,48 aA	1,46 aA
GAP	199,8 aAB	93,40 bC	154,2 abB	1,84 aA	1,87 aA	1,69 aA
GAL	172,0 aB	156,4 aBC	218,0 aAB	1,19 bB	1,91 aA	1,66 aA
GAT	158,0 bB	256,0 aA	256,6 aA	1,40 bAB	1,91 aA	1,66 abA

Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na linha e maiúscula na coluna) não diferem pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 13. Número mais provável de propágulos infectivos de FMA no final do terceiro ciclo, em solo controle e em solo inoculado com *G. albida* uma vez (GAP), duas vezes (GAL) e três vezes (GAT) em rizosfera de feijão-caupi.

Tratamentos	NMP de propágulos g ⁻¹ de solo			
	Controle	GAP	GAL	GAT
	2,8	2,8	5,4	9,2

Houve efeito positivo da inoculação com FMA nos teores de carbono microbiano (C-BM) do solo ao fim do terceiro ciclo ($p < 0,05$) (Tabela 14). Maiores teores de C-BM foram registrados nos solos sob inoculação alternada (GAL) e contínua (GAT) em comparação aos tratamentos controle e inoculação única (GAP).

Não houve diferença na respiração basal do solo e no coeficiente metabólico (qCO_2) entre os tratamentos ao final do terceiro ciclo ($p > 0,05$) (Tabela 14)

Ao fim do terceiro ciclo, observou-se que não houve diferença ($p > 0,05$) na atividade das enzimas (fosfatase ácida e β -glucosidase) entre o solo controle e os solos inoculados (GAP, GAL e GAT) com exceção da atividade da β -glucosidase, que foi maior em no solo GAP em comparação ao controle (Tabela 15).

Tabela 14. Carbono (C-BM) e respiração (C-CO₂) da biomassa microbiana e o coeficiente metabólico (ρ CO₂) correspondentes aos solos controle e inoculados com *G. albidia* no primeiro ciclo (GAP), no primeiro e terceiro ciclo (GAL) e em todos os ciclos (GAT).

	C-BM ($\mu\text{g C g}^{-1}$ de solo seco)			C-CO ₂ ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco)			ρ CO ₂		
	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo
Controle	203,8 aA	185,1 aA	198,1 aB	144,7 aA	32,2 bA	105,1 bA	0,07 aB	0,01 bA	0,05 abA
GAP	115,8 aA	167,2 aA	161,4 aB	123,6 aA	56,7 bA	50,9 bA	0,12 aA	0,03 bA	0,03 bA
GAL	156,6 bA	258,0 bA	410,4 aA	119,5 aA	63,8 bA	87,4 bA	0,08 aAB	0,02 bA	0,01 bA
GAT	176,5 bA	214,8 bA	367,8 aA	107,0 aA	87,4 bA	63,6 bA	0,06 aB	0,04 aA	0,01 aA

Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na linha e maiúscula na coluna) não diferem pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 15. Atividade da Fosfatase ácida e da β -glucosidase em solo controle (sem inoculação) e em solos inoculados com *G. albida*, no primeiro ciclo (GAP), no primeiro e terceiro ciclo (GAL) e em todos os ciclos (GAT) do feijão-caupi.

	Fosfatase (mg <i>p</i> -NPP g ⁻¹ solo seco h ⁻¹)			β -glucosidase (mg <i>p</i> -NPP g ⁻¹ solo seco h ⁻¹)		
	1° Ciclo	2° Ciclo	3° Ciclo	1° Ciclo	2° Ciclo	3° Ciclo
Controle	247,8 aA	240,1 aA	72,8 bA	28,9 aA	2,28 bB	4,5 bB
GAP	237,8 aA	129,5 bC	53,1 cA	13,4 aB	8,2 bA	16,4 aA
GAL	226,6 aA	187,3 bB	37,8 cA	11,6 aB	1,4 bB	2,9 bB
GAT	226,6 aA	170,5 bB	53,6 cA	9,5 aB	3,1 bB	6,2 abB

Médias seguidas pela mesma letra (minúscula na linha e maiúscula na coluna) não diferem pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

5 DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO 1 - ESTRUTURA DE ASSEMBLEIAS MICORRIZICAS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA RIZOSFERA DE FEIJÃO-CAUPI E CRESCIMENTO DESTA LEGUMINOSA APÓS INOCULAÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES NO SOLO

Os benefícios no crescimento vegetal resultante da aplicação de FMA observados nesse e em outros estudos (CRUZ *et al.*, 2017; HARO *et al.*, 2016) contribuem para estimular o uso racional de inoculantes micorrízicos em culturas importantes. O uso de FMA na cultura do feijão-caupi também tem sido realizada em outros estudos: Siqueira *et al.* (2003), por exemplo, constataram que a inoculação com *Claroideoglomus etunicatum* (= *Glomus etunicatum*) proporcionou aumento significativo na área foliar e na biomassa seca da parte aérea de plantas de feijão-caupi; enquanto que, Silva *et al.* (2009) verificaram aumento de 33 a 148% no crescimento vegetal, em comparação com as plantas não inoculadas, testando 51 isolados de FMA. Esses autores constataram também que 95% dos fungos testados favoreceram a absorção de P e que os tratamentos com máxima eficiência continham espécies de *Acaulospora* e *Glomus*.

Dentre os inoculantes testados, os de FMA com o rizóbio BR3267 propiciaram incremento no crescimento foliar de feijão-caupi, indicando potencial para serem aplicados em campo. Os efeitos menos evidentes da inoculação com o rizóbio BR3296 aplicado isoladamente ou em conjunto com os FMA no feijão-caupi demonstram a importância de se conhecer combinações eficientes para as plantas de interesse, uma vez que combinações inadequadas podem não promover os efeitos esperados.

No presente estudo não foram observados benefícios diferenciados em função da espécie e/ou isolado de FMA no crescimento das plantas; no entanto, Andrade *et al.* (2009) verificaram maior incremento na biomassa seca aérea do feijão-caupi (cultivar IPA 206) em função da associação com *C. etunicatum* do que com *Gigaspora albida*, em condições não esterilizadas.

Em geral, a inoculação com FMA contribui para taxas mais altas de colonização micorrízica (COZZOLINO *et al.*, 2013; PELEGRINO *et al.*, 2012). As taxas mais baixas de colonização micorrízica registradas na maioria das plantas co-inoculadas em comparação com plantas inoculadas com AMF indicam que o estabelecimento de uma

simbiose afeta o resultado da outra (CATFORD *et al.*, 2003; OMIROU *et al.*, 2016). A redução na colonização micorrízica de plantas de feijão (*Phaseolus*) também foi observada por Ballesteros-Almanza *et al.* (2010) após co-inoculação com rhizobia e *Glomus intraradices*. Ordoñez *et al.* (2016) também alertaram sobre a influência de bactérias (*Pseudomonas*) na colonização intra e extra-radicular por FMA, demonstrando que a ocorrência de simbiose micorrízica pode ser diretamente impactada pelas bactérias adicionadas. A colonização radicular é um dos primeiros benefícios que a planta recebe quando associada aos simbioss, pois a disponibilidade para sítios de infecção por patógenos diminui significativamente; no entanto, esse benefício primário tem sido negligenciado (DENISON & KIERS, 2011).

Verificou-se que plantas inoculadas com rizóbios apresentaram percentuais de colonização micorrízica maiores que às plantas controle, nesse caso, entende-se que uma perturbação na comunidade nativa de FMA pode ter sido gerada após a introdução dos organismos exóticos, estimulando os simbioss micorrízicos nativos a colonizarem as raízes, justificando assim, o aumento da colonização micorrízica nas plantas desses tratamentos. A redução na quantidade de glomerosporos autóctones no solo após a introdução isolada dos rizóbios pode apoiar essa observação, evidenciando que os FMA passaram da condição assimbótica para condição simbiótica.

Pouco se sabe sobre os fatores que moldam as interações entre esses dois importantes grupos de micro-organismos e como eles influenciam o crescimento e o estabelecimento uns dos outros (CATFORD *et al.*, 2003; YASMEEN *et al.*, 2012; OMIROU *et al.*, 2016). Em geral, essas interações são menos estudadas em comparação com o crescimento e a produtividade das plantas (COZZOLINO *et al.*, 2013; HARO *et al.*, 2018). No entanto, sabe-se que a comunidade de FMA é influenciada por diferentes fatores do ambiente abiótico e biótico, os quais, por sua vez, interferem na sobrevivência e germinação de propágulos infecciosos, alterando o processo de colonização fúngica e seus efeitos no sistema radicular de plantas (MOHAMMAD *et al.*, 2003; CARRENHO *et al.*, 2010; RODRIGUEZ & SANDERS, 2015; ORDOÑEZ *et al.*, 2016; XU *et al.*, 2017).

A maior riqueza de FMA registrada em função da aplicação do Mix de FMA evidencia a importância da inoculação com a mistura de espécies para ampliar a comunidade de FMA em solo agrícola. As espécies de FMA são ecologicamente distintas, o que contribui para a manutenção da diversidade de FMA, com potencial de proporcionar maior resiliência à planta associada (BEVER *et al.*, 2001). Além disto, o

aumento da riqueza de espécies é importante porque tem efeito na estrutura da comunidade vegetal, modificando seu desempenho (VAN DER HEIJDEN *et al.*, 1998; BEVER *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2012b).

Diferenças na estrutura das comunidades de FMA entre os tratamentos (inoculação com *G. albida* + BR 3267) e (*A. longula*) podem estar relacionadas à estratégia de vida adotada pelas espécies fúngicas aplicadas. Espécies de Gigasporales são consideradas estrategistas-K, ou seja, produzem um pequeno número de esporos grandes (> 200 µm) e são adaptados para viver em ambientes estáveis e previsíveis. Tais estrategistas K geralmente investem na formação de biomassa fúngica (micélio) fora do sistema radicular (DENISON E KIERS, 2011; MAHERALI & KLIRONOMOS, 2007). Considerando que *G. albida* produz poucos esporos e que não houve aumento na abundância do isolado inoculado e / ou da comunidade nativa, isso pode ter contribuído para a maior diversidade no tratamento inoculado com *G. albida* + BR 3267 quando comparado ao tratamento inoculado com *A. longula*. Por outro lado, a dominância de *A. longula* pode estar relacionada a uma característica intrínseca do grupo, que é a produção de grandes quantidades de pequenos esporos (BALOTA & LOPES, 1996; DENISON & KIERS, 2011). Esse comportamento dos estrategistas-R, em que o ciclo de vida é curto e resulta na formação de muitos esporos, aumenta as chances de que os glomerosporos sejam extraídos do solo e, conseqüentemente, identificados, explicando a razão para o maior número de espécies pertencentes ao gênero *Acaulospora*.

A predominância de esporos do tipo glomóide nos solos sem a introdução do *A. longula* e a predominância de esporos do tipo acaulosporoide após a introdução desse isolado confirmam a dominância de *A. longula* na comunidade nativa. Esse resultado serve de alerta para a realização de estudos de longo prazo com o intuito de verificar se o estabelecimento bem sucedido dessa espécie entre os membros nativos persiste ao longo do tempo e se seu comportamento dominante não é deletério para as espécies nativas.

Ao contrário da estrutura da comunidade de FMA, a qual foi modificada após a introdução de inóculos de *A. longula*, a composição das assembleias micorrízicas não mudou estatisticamente. No entanto, a ausência de impactos na composição da comunidade micorrízica nativa relacionados à introdução de isolados exóticos deve ser interpretada com cautela, pois há um tempo a ser considerado para a ocorrência do possível dano (SAKAI *et al.*, 2001; ANTUNES *et al.*, 2009) e especialmente, quando

uma espécie que não ocorre na comunidade nativa é introduzida, como foi o caso de *G. albida*.

5.2 ARTIGO 2 – PERFORMANCE DE *Vigna unguiculata* [L] Walp EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ALÓCTONES EM CICLOS CONSECUTIVOS

Diversas cultivares de feijão-caupi têm apresentado aumento na produção de biomassa e/ou nos teores nutricionais (ANDRADE *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; HARO *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2017) em resposta à inoculação micorrízica, ao contrário do observado no presente trabalho. Tal fato refuta nossa hipótese de que FMA alóctones poderiam trazer mais benefícios no crescimento em solo não desinfestado. Provavelmente, fatores como: a fraca capacidade dos isolados exóticos em competir com os FMA indígenas do solo, o tipo e a dosagem de propágulos introduzidos, a fertilidade edáfica, entre outros fatores devem ser considerados (JANOUSKOVÁ *et al.*, 2013; REGO *et al.*, 2015; BERRUTI *et al.*, 2017). Embora a microbiota nativa possa afetar o desenvolvimento da planta, poucos estudos abordam mudanças na microbiota do solo que resultam em alterações no desempenho vegetal (PELLEGRINO *et al.*, 2012; JANOUSKOVÁ *et al.*, 2013) e nem sempre há clareza se a resposta da planta é resultado de um efeito direto do FMA aplicado ou de um efeito indireto, por meio da mudança na comunidade nativa (RODRIGUES & SANDERS, 2015; BERRUTI *et al.*, 2017).

Por outro lado, observa-se que todas as plantas podem sofrer alterações positivas, negativas ou nulas no crescimento em resposta à inoculação micorrízica (PELLEGRINO *et al.*, 2012; REGO *et al.*, 2015; BERRUTI *et al.*, 2017). Pesquisa recente demonstra que os serviços ecossistêmicos prestados pelos FMA dependem tanto dos fatores abióticos quanto da microbiota nativa do solo, a qual pode inibir o crescimento e a ação dos FMA exóticos (SVENNINGSEN *et al.*, 2018), justificando assim diferentes respostas das plantas à inoculação micorrízica.

Diferenças observadas no estágio de desenvolvimento do feijão-caupi no primeiro ciclo indicam que a introdução dos isolados alóctones pode ter causado uma perturbação no solo, explicando assim o atraso no desenvolvimento das plantas inoculadas com FMA (pois apenas 10% das plantas inoculadas com *G. albida* e nenhuma das inoculadas com os outros dois isolados apresentaram inflorescência em

comparação às plantas controle). Além disso, a colonização micorrízica diminuiu significativamente com a introdução dos isolados exóticos, assim como o crescimento do feijão-caupi, que foi menor no tratamento inoculado com *G. albida*. A adição de propágulos micorrízicos promove mudanças no equilíbrio e na abundância dos FMA no solo, reduzindo assim a abundância dos fungos nas raízes e, em alguns casos, reprimindo o crescimento das plantas (JANOUSKOVÁ *et al.* 2013).

No segundo ciclo, a maior produção de biomassa em plantas do solo reinoculado (em comparação a de solos não-reinoculados) indica que as adições de inóculos podem beneficiar o desenvolvimento das plantas após um período de adaptação dos isolados no solo. Possivelmente, alguns isolados exóticos precisem de um período de tempo para se estabelecer no ambiente e começar a expressar todo o seu potencial, visto serem organismos vivos que influenciam e são influenciados pela microbiota nativa (JANOUSKOVÁ *et al.* 2013; SVENNINGSEN *et al.*, 2018). De modo geral, esse importante aspecto ecológico tem sido negligenciado, tornando comum a não indicação de inoculantes micorrízicos quando não se observam os efeitos desejados na planta após a primeira aplicação.

Apoiando essas observações, verifica-se que no segundo ciclo, todas as plantas inoculadas (fatorial) apresentaram maior quantidade de folhas e maiores taxas de colonização em relação às plantas controle (adicional). Além disso, aos 45 dias do segundo ciclo, 26,6% das plantas do solo reinoculado estavam na fase de floração, ao contrário das plantas controle e das plantas do solo não-reinoculado, que não estavam. Esse resultado indica que a inoculação repetitiva pode ter contribuído no desenvolvimento do feijão-caupi.

Corroborando essa observação, verificou-se que o número de plantas em fase de floração no solo reinoculado (aos 52 dias) era maior que o de plantas não-reinoculadas e do tratamento controle, sendo indicativo de que a perturbação no solo pode ter sido atenuada com o tempo. Nenhuma informação sobre os efeitos da inoculação com FMA na floração de plantas de feijão-caupi foi encontrada na literatura. Nossos resultados mostram que o período de floração desse vegetal pode ser modificado em resposta à inoculação micorrízica, a qual pode contribuir para o estabelecimento do feijão-caupi em solo com baixo teor de P (CRUZ *et al.*, 2017).

As maiores taxas de colonização micorrízica em plantas reinoculadas demonstram que as taxas tendem a ser maiores após as inoculações com FMA constituindo um dos primeiros benefícios promovidos pela introdução dos fungos, pois

colonização micorrízica reduz os locais potenciais para infecção por patógenos (VIERHEILIG *et al.*, 2008; ODEYEMI *et al.*, 2010; DENILSON & KIERS 2011).

O isolado de *G. albida* foi o que menos contribuiu para o crescimento e nutrição da cultivar em comparação ao *A. longula* e *C. etunicatum*, ao menos, inicialmente. Demonstrando a importância de se conhecer os efeitos dos isolados na planta antes da aplicação em campo. A hipótese de que a reinoculação com FMA favorece o crescimento de feijão-caupi foi confirmada, sugerindo que os benefícios advindos da micorrização são evidenciados após o segundo ciclo de cultivo.

As diferentes respostas das plantas nos dois ciclos podem estar relacionadas às interações complexas que envolvem as características do isolado fúngico e da cultivar. Por isso, é pertinente estudar previamente a performance das plantas em resposta à inoculação micorrízica, a fim de projetar manejos eficientes para os sistemas agrícolas.

5.3 ARTIGO 3 - POTENCIAL IMPACTO DA INOCULAÇÃO COM GIGASPORA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DIVERSIDADE E PROPÁGULOS INFECTIVOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM CICLOS CONSECUTIVOS DE FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS

A forte contribuição de áreas agrícolas para o registro de ocorrência de novas espécies tem sido discutida recentemente (PONTES *et al.*, 2017; OEHL *et al.*, 2017), evidenciando a importância de estudos de diversidade de FMA nesses locais. A riqueza de espécies de FMA (46 táxons pertencentes a 15 gêneros) encontrada no presente estudo foi claramente maior que a encontrada em outras pesquisas usando solos com feijão-caupi. Sousa *et al.* (2012), por exemplo, registraram a ocorrência de 15 táxons pertencentes a 3 gêneros (*Acaulospora*, *Glomus* e *Kuklospora*) em condições de campo do nordeste brasileiro, enquanto que Haro *et al.* (2018) registraram táxons pertencentes a apenas quatro gêneros: *Scutellospora*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Entrophospora* (isolando FMA de seis áreas de cultivo de feijão-caupi em Burkina Faso). A maior riqueza registrada no presente estudo pode estar relacionado às condições experimentais adotadas, tais como: maior duração do experimento (pois foram considerados três ciclos de crescimento da planta, contribuindo para a recuperação de espécies de esporulação tardia) e estabelecimento de vasos em casa de vegetação (local de pouca variação ambiental). Apoiando essas observações, verifica-se que Pontes *et al.* (2017), investigando a resposta da comunidade de FMA a diferentes doses e tipos de

fertilizantes usados na cultura do feijão-caupi, recuperaram 30 espécies de FMA (por meio de cultura armadilha) em casa de vegetação, onde quatro (*Fuscutata heterogama*, *Glomus ambisporum*, *Fuscutata geosporus* e *Sclerocystis rubiformis*) apenas foram recuperadas nessas condições.

A predominância de *Acaulospora* e *Glomus* observada no presente estudo também foi verificada por Sousa *et al.* (2012) e Pontes *et al.* (2017) em cultivos de feijão-caupi. Os autores atribuíram a melhor adaptação desses grupos, quando comparados a outros gêneros, ao pH do solo (média de 6,0) e às condições estressantes presentes nos sistemas agrícolas. Não descartando que a maior ocorrência de espécies de *Acaulospora* e *Glomus* pode estar relacionada à técnica aplicada para obtenção de dados de riqueza, visto que as análises morfológicas dependem exclusivamente das espécies esporuladas. Nesse caso, as espécies que investem mais na produção de esporos são mais facilmente extraídas e identificadas, comportamento característico de *Acaulospora* e *Glomus* (BALOTA & LOPES, 1996; DENISON & KIERS, 2011), permitindo sua identificação no solo.

Espécies de *Gigaspora* têm sido encontradas em solos sob cultivos de feijão-caupi, mas sua representatividade (em termos de número de espécies) tem sido baixa em relação a *Acaulospora* e *Glomus* (SOUSA *et al.*, 2012; PONTES *et al.*, 2017), possivelmente por apresentar espécies mais sensíveis às práticas agrícolas (PICONE, 2000). A inoculação consecutiva com *G. albida*, no presente trabalho, mostrou-se eficiente em aumentar a abundância da espécie (*G. albida*) e a riqueza de FMA no solo em comparação a outras formas de inoculação (GAP e GAL), revelando que para aumentos significativos na riqueza de FMA no solo, a introdução do isolado deve ser realizada de forma contínua.

O aumento da riqueza de FMA nos solos inoculados consecutivamente em relação ao solo controle pode estar relacionada não só à introdução direta e repetitiva da espécie no sistema como à diminuição significativa da população mais abundante do solo (*G. macrocarpum*), observada no primeiro ciclo de crescimento da cultura. Ainda nesse ciclo, notou-se que em dois (GAL e GAT) dos três solos inoculados inicialmente, houve uma redução no número de glomerosporos em comparação ao solo não inoculado (controle), indicando uma possível relação com a diminuição da abundância de *G. macrocarpum*. A diminuição da abundância de *G. macrocarpum* também parece ter influenciado a diversidade da comunidade de FMA (possivelmente devido à

equitabilidade das espécies), avaliada pelo índice de Shannon, que foi maior em todos os solos inoculados, em comparação ao controle.

Por outro lado, as espécies (*G. macrocarpum*) apresentaram padrões pronunciados de esporulação nos ciclos subsequentes que resultaram em valores de abundância similares, estatisticamente, entre o solo controle e os inoculados (GAP, GAL e GAT) ao final do terceiro ciclo. Com a recuperação do *G. macrocarpum*, o índice de diversidade não mais diferiu entre os quatro tratamentos assim como, o número de glomerosporos que foi estatisticamente igual entre o solo controle e inoculados (GAP, GAL e GAT), apoiando a observação de que essa população tem expressiva participação na diversidade da comunidade esporulante e que mudanças na sua dinâmica influenciam diretamente a estrutura e diversidade de FMA no solo.

A recuperação da população de *G. macrocarpum* pode estar ligada ao fato de essa espécie pertencer a um grupo filogeneticamente (*Glomeraceae*) diferente do isolado aplicado (*Gigasporaceae*), pois essa condição permite uma complementariedade das ações executadas pelos FMA no sistema (solo-planta) de forma a propiciar a coexistência de grupos que ocupam nichos espaciais diferentes, visto que a maior parte de biomassa fúngica de representantes de *Gigasporaceae* é encontrada nas hifas localizadas fora da raiz enquanto que a maior parte de biomassa fúngica de representantes da *Glomeraceae* é encontrada dentro da raiz (MAHERALI & KLIRONOMOS, 2007; 2012).

Embora não tenha sido observada diferença no número de glomerosporos entre os solos inoculados (GAP, GAL e GAT) em relação ao controle ao final do terceiro ciclo, verificou-se que o número de propágulos infectivos de FMA foi maior no solo sob inoculação contínua, seguido pelo solo com inoculação alternada, do que nos demais solos, o que demonstra a eficiência da inoculação na manutenção e no aumento da capacidade infectiva do solo.

A maior quantidade de propágulos infectivos de FMA observada em GAL e GAT, possivelmente, contribuiu para o aumento da biomassa microbiana do solo, justificando assim os maiores teores de carbono microbiano (C-BM) observados nesses tratamentos. Manejos que condicionam melhorias nos atributos biológicos associados à biomassa microbiana propiciam aumento na ciclagem de nutrientes e fluxo de energia no solo (CUNHA *et al.*, 2011), uma vez que a biomassa microbiana participa diretamente desses processos. Aumento na biomassa microbiana do solo em função da inoculação micorrízica, como observada no presente trabalho, também foi relatado por

Almethyeb *et al.* (2013) em cultura de feijão-fava (*Vicia faba* L.), sendo que os autores observaram aumento desde a primeira aplicação do inoculante micorrízico (ciclo de 51 dias), ao contrário do presente estudo, em que incrementos só foram detectados a partir do terceiro ciclo de crescimento da cultura. É possível que essas diferenças estejam relacionadas às plantas usadas, solos, condições experimentais entre outros fatores.

Resultados similares de respiração basal (C-CO₂) no solo de todos os tratamentos ao fim do terceiro ciclo representam um saldo positivo de C para os solos de GAL e GAT visto que a perda de C, via respiração basal, não acompanhou o aumento de biomassa registrada nesses tratamentos, sugerindo assim imobilização do C à biomassa microbiana. Apoiando essas observações, verifica-se que o coeficiente metabólico também não diferiu entre os tratamentos ao fim do terceiro ciclo, quando era esperado que ele aumentasse nos solos GAL e GAT em virtude do aumento da biomassa. De acordo com Cunha *et al.* (2011) à medida que a microbiota se torna mais eficiente no uso de recursos do ecossistema, a perda de CO₂ pela respiração é menor, o que proporciona maior incorporação de C ao tecido microbiano.

Contrariando estudo em que as atividades de β -glucosidase e fosfatase ácida foram sensíveis em identificar alterações no solo (MATSUOKA, MENDES & LOUREIRO, 2003), as atividades enzimáticas (com exceção da atividade da β -glucosidase no solo GAP) não foram os indicadores biológicos mais eficientes em mostrar as mudanças no solo ocasionadas pela inoculação com *G. albida*.

6 CONCLUSÕES

6.1 ARTIGO 1 - ESTRUTURA DE ASSEMBLEIAS MICORRIZICAS DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES NA RIZOSFERA DE FEIJÃO-CAUPI E CRESCIMENTO DESTA LEGUMINOSA APÓS INOCULAÇÃO MICROBIANA E APLICAÇÃO DE FERTILIZANTES NO SOLO.

Confirma-se que os isolados microbianos diferem em seus efeitos no crescimento foliar e na micorrização do feijão-caupi, os quais foram mais expressivos positivamente após inoculação micorrízica isolada ou combinada com BR 3267. É possível observar diferenças na estrutura da comunidade esporulante de FMA mesmo em um curto período de tempo. No entanto, estudos a longo prazo são necessários para verificar se o estabelecimento bem sucedido de *A. longula* entre as espécies nativas persiste com o tempo e se esse comportamento dominante não é deletério para as espécies nativas. Conclui-se também que a introdução de um isolado exótico no ambiente deve ser avaliada com cautela especialmente quando uma espécie introduzida (como foi o caso de *G. albida*) não ocorre na comunidade local, justificando a importância de estudos conduzidos em casa de vegetação.

6.2 ARTIGO 2 - PERFORMANCE DE *Vigna unguiculata* [L] Walp EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES ALÓCTONES EM CICLOS CONSECUTIVOS

O feijão-caupi apresenta respostas diferentes de crescimento e desenvolvimento à inoculação com isolados de FMA alóctones, sendo o de *G. albida*, inicialmente, o menos efetivo para a cultivar Miranda IPA 207. O desenvolvimento das plantas de feijão-caupi é maior em solos submetidos à inoculações consecutivas do que em solos sem reinoculação. Nossos resultados também mostram que a inoculação com FMA pode influenciar o período de floração do feijão-caupi e que estudos de inoculação micorrízica, realizada em ciclos consecutivos, ajudam a entender os efeitos dos FMA no desempenho do feijão-caupi.

6.3 ARTIGO 3 - POTENCIAL IMPACTO DA INOCULAÇÃO COM GIGASPORA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO, DIVERSIDADE E PROPÁGULOS INFECTIVOS DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM CICLOS CONSECUTIVOS DE FEIJÃO-CAUPI EM CONDIÇÕES DE MICROCOSMOS

A inoculação com *G. albida* é eficiente em aumentar a abundância da espécie no solo, a riqueza e o número de propágulos infectivos de FMA, quando realizada em ciclos consecutivos de feijão-caupi, sendo indicada para testes em campo.

A introdução do *G. albida* promove mudanças indireta e diretamente na comunidade de FMA, as quais podem ser observadas ao longo do ciclo reprodutivo. A curto prazo: promove alterações na população abundante (*G. macrocarum*), a qual, possivelmente, tem expressiva participação na comunidade micorrízica sendo, portanto um efeito indireto da inoculação. A médio prazo: aumenta a abundância da espécie no solo e o número de propágulos infectivos de FMA, resultados pelo efeito direto da inoculação. Conclui-se também que os aspectos ecológicos de FMA são sensíveis a mudanças no solo causados pela introdução do FMA, sendo sugeridos indicadores de qualidade do solo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso da aplicação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em aumentar o crescimento da biomassa vegetal do feijão-caupi é bem documentado na literatura, principalmente em solo esterilizado, diferindo da condição adotada na presente Tese, possibilitando avançar no entendimento sobre potenciais benefícios às plantas e modificações na atividade microbiana e comunidade nativa de FMA.

Ao final da Tese, conclui-se que o feijão-caupi apresenta respostas diferentes à inoculação com isolados de FMA alóctones (combinados ou não com BFN) sendo sua expansão foliar e colonização micorrízica facilmente favorecidas pela inoculação com FMA. As assembleias micorrízicas são influenciadas direta e indiretamente pela introdução de bioinsumos (BFN e FMA), modificando a estrutura e composição da comunidade nativa, com estabelecimento significativo dos isolados de FMA introduzidos, especialmente *A. longula* e *G. albida*. Este estabelecimento na comunidade nativa, observado com a inoculação com *G. albida* após ciclos consecutivos, pode contribuir com o aumento da riqueza de espécies de FMA e aporte de carbono da biomassa microbiana.

A realização da segunda etapa da pesquisa permitiu a obtenção de dados que servirão para compor os seguintes trabalhos:

- a) Potencial impacto da inoculação com *Claroideoglossum etunicatum* e *Acaulospora longula* no carbono da biomassa microbiana e na atividade biológica do solo em ciclos consecutivos de feijão-caupi em microcosmos.
- b) Riqueza e diversidade da comunidade autóctone de fungos micorrízicos arbusculares após a introdução de isolados exóticos de *Claroideoglossum etunicatum* e *Acaulospora longula* em rizosfera de feijão-caupi

Com relação às hipóteses testadas, nota-se que:

ARTIGO 1

H1) A introdução de isolados exóticos de FMA, combinados ou não com rizóbios, afeta a estrutura e a composição das assembleias da comunidade nativa de FMA.

Foi aceita parcialmente. Embora a estrutura da comunidade de FMA tenha sido modificada em função da introdução do isolado de *A. longula*, observou-se que a composição das assembleias ficou inalterada.

H2) Os isolados microbianos diferem quanto aos efeitos no crescimento do feijão-caupi (cultivar BRS Pujante), os quais são maximizados quando a inoculação é com ambos os inoculantes (FMA e rizóbio).

Foi aceita parcialmente. Os isolados diferem quanto aos efeitos no crescimento do feijão-caupi, porém, apenas o crescimento foliar e colonização micorrízica são maximizados quando a inoculação com FMA é isolada ou combinada com o BFN (BR3267).

ARTIGO 2

H1) A aplicação de inóculos de FMA alóctones é eficiente em promover o crescimento de feijão-caupi em solo não desinfestado.

Foi rejeitada

H2) A reinoculação com FMA favorece o crescimento de feijão-caupi.

Foi aceita

ARTIGO 3

H1) Estudos de inoculação micorrízica realizados por mais de um ciclo em feijão-caupi (Miranda IPA 207) ajudam a esclarecer os potenciais efeitos da inoculação no solo.

Foi aceita.

H2) A inoculação micorrízica favorece os atributos biológicos e bioquímicos do solo com o tempo.

Foi aceita.

H3) Aplicações repetitivas de inoculante promovem mudanças mais significativas na estrutura das assembleias de FMA do que aplicações alternadas ou realizadas apenas uma vez.

Foi aceita

A presente tese contou com a participação de profissionais das seguintes áreas: fisiologia vegetal, taxonomia morfológica de glomerosporos, ecologia microbiana, estatística e microbiologia ambiental (ênfase em rizóbios e simbioses micorrízicas), os quais permitiram a elaboração de todos os dados apresentados.

Ações agrícolas que incrementem a produtividade vegetal são importantes, principalmente quando a população mundial cresce em ritmo acelerado juntamente com o consumo alimentar. No entanto, os impactos que essas ações promovem no funcionamento do solo não devem ser negligenciados e sua avaliação, em conjunto com a resposta da planta, é importante para a indicação de manejos que promovam a sustentabilidade dos solos agrícolas.

Por fim, a riqueza e a diversidade da comunidade de FMA são importantes recursos biológicos que devem ser mantidos ou otimizados em programas de inoculação microbiana apresentando potencial para incrementar a produtividade vegetal por meio de melhorias nos atributos biológicos do solo. Estudos sobre FMA em sistemas agrícolas devem ser desenvolvidos usando outras cultivares, tipos de solos, isolados, condições ambientais, etc., buscando o conhecimento mais amplo sobre sua diversidade, efeitos, causas e funcionalidade nessas áreas, uma vez que o nosso conhecimento ainda é, reconhecidamente, limitado sobre esses aspectos.

REFERÊNCIAS

- ADETUNJI, A.T.; LEWU, F.B.; MULIDZI, R.; NCUBE, B. The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n.3, p.794-807, 2017.
- ALMETHYEB, M.; RUPPEL, S.; PAULSEN, H.M.; VASSILEV, N.; EICHLER-LÖBERMANN, B. Single and combined applications of arbuscular mycorrhizal fungi and *Enterobacter radicincitans* affect nutrient uptake of faba bean and soil biological characteristics **Applied Agricultural and Forestry Research** v.3, n.63, p.229-234, 2013.
- ANDRADE JÚNIOR, A.S.; SANTOS, A.A.; SOBRINHO, C.A.; BASTOS, E.A.; MELO, F.B.; VIANA, F.M.P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J.S.; ROCHA, M.M.; CARDOSO, M.J.; SILVA, P.H.S.; RIBEIRO, V.Q. Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). **Circular Técnico Sistema de cultivo**, Embrapa Meio-Norte, Teresina-PI. 108 p. 21^o edição. 2002.
- ANDRADE, M.M.M.; STAMFORD, N.P.; SOUSA, C.A.; SILVEIRA, A.C.G.A.; FREITAS, A.D.S.; SANTOS, C.E.R.S. Fertilização mineral e biofertilizante de rochas com *Bradyrhizobium* e fungos micorrízicos arbusculares em caupi. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias** v.4, n.3, p.289-292, 2009.
- ANGELINI, G.A.R.; LOSS, A.; PEREIRA, M.G.; TORRES, J.L.R.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J. 2012. Mycorrhizal colonization, spore density and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Cerrado soil under no-till and conventional tillage systems. **Ciências Agrárias** v.33, n.1, p. 115-130, 2012.
- ANTUNES, PM.; KOCH, A.M.; DUNFIELD, K.E.; HART, M.M.; DOWNING, A.; RILLIG, M.C.; KLIRONOMOS, J.N. Influence of commercial inoculation with *Glomus intraradices* on the structure and functioning of an AM fungal community from an agricultural site. **Plant Soil** v. 317, p.257–266. 2009.
- ARAÚJO, F.F.; CARMONA, F.G.; TIRITAN, C.S.; CRESTE, J.E. Fixação biológica de N₂ no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. **Maringá** v. 29, n.4, p. 535-540, 2007.
- BALLESTEROS-ALMANZA, L., ALTAMIRANO-HERNANDEZ, J., PENA-CABRIALES, J.J., SANTOYO, G., SANCHEZ-YAÑEZ, J.M., VALENCIA-CANTERO, E., MACIAS-RODRIGUEZ, L., LOPEZ-BUCIO, J., CARDENAS-NAVARRO, R.; FARIAS-RODRIGUEZ, R. Effect of co-noculation with mycorrhiza and rhizobia on the nodule trehalose content of different deca Genotypes. **The Open Microbiology Journal** v. 4, p. 83-92, 2010.
- BALOTA, E.L.; LOPES, E.S. Introdução de fungo micorrízico arbuscular no cafeeiro em condições de campo: I. Persistência e interação com espécies nativas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 20, p.217-223, 1996.
- BERRUTI, A.; LUMINI, E.; BIANCIOTTO, V. AMF components from a microbial inoculum fail to colonize roots and lack soil persistence in an arable maize field. **Symbiosis** v. 72, p. 73-80, 2017.
- BEVER, J.D.; SCHULTZ, P.A.; PRINGLE, A.; MORTON, J.B. Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. **Bioscience** v. 51, p. 923-931, 2001.

BEZERRA, A.A.C.; TÁVORA, F.J.A.F.; FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q. Morfologia e produção de grãos em linhagens modernas de feijão-caupi submetidas a diferentes densidades populacionais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra** v. 8, n.1, p. 85-93, 2008.

BEZERRA, M.E.J.; LACERDA, C.F.; SOUSA, G.G.; GOMES, V.F.F.; MENDES-FILHO, P.F. Biomassa, atividade microbiana e FMA em rotação cultural milho/feijão-de-corda utilizando-se águas salinas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 4, p. 562-570, 2010.

BLASZKOWSKI, J. Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Krakow. 2012.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant – fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature Communications** v. 1, p. 48, 2010.

BRAGHIROLI, F.L.; SGROTT, A.F.; PESCADOR, R.; UHLMANN, A.; STÜRMER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares na recuperação de florestas ciliares e fixação de carbono no Solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v.36, p. 733-743, 2012.

BREMNER, J.M.; MULVANEY, C.S.; Nitrogen-total. In: PAGE, A.L., MILLER, R.H., KEENEY, D.R. (Eds) Methods of soil analysis. Part. 2. Chemical and microbiological properties (Agronomy Monograph 9), ASA-SSSA, Madison, pp. 595-624. 1982.

BRITO, M.M.P.; MURAOKA, T.; SILVA, E.C. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, v. 70, n.1, p. 206-215, 2011.

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

CATFORD, J.G.; STAEHELIN, C.; LERAT, S.; PICHE, Y.; VIERHEILIG, H. Suppression of arbuscular mycorrhizal colonization and nodulation in split-root systems of alfalfa after pre-inoculation and treatment with Nod factors. **Journal of Experimental Botany**. v. 386, n. 54, p. 1481-1487, 2003.

CHAGAS JUNIOR, A.F.; RAHMEIER, W.; FIDELIS, R.R.; SANTOS, G.R.; CHAGAS, L.F.B. Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio inoculadas em feijão caupi no Cerrado, Gurupi-TO. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n.4, p. 709-714, 2010.

CLARKE, K.R.; GORLEY, R.N. 2006. Primer V6: User Manual/tutorial. PRIMER-E, Plymouth.

COELHO, I.R.; PEDONE-BONFIM, M.V.L.; SILVA, F.S.B.; MAIA, L.C. Optimization of the production of mycorrhizal inoculum on substrate with organic fertilizer. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 45, n.4, p. 1173-1178, 2014.

COSTA, A.F.; SOUZA, M.C.M.; CANUTO, V.T.B. COITINHO, R.L.B.C.; TAVARES, J.A.; FONSECA, M.A.C. Miranda IPA 207, Nova Cultivar de Feijão-Caupi para o Nordeste Brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana** v.18, n.1, p. 39-43, 2013.

COSTA, E.M.; NÓBREGA, R.S.A.; MARTINS, L.V.; AMARAL, F.H.C.; MOREIRA, F.M.S. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Por cepas de rizóbio em Bom Jesus, PI. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n.1, p. 1-7. 2011.

- COSTA, T.A.; PINTRO, J.C.; SILVA, E.S.; COSTA, S.M.G. Influência da inoculação de fungos micorrízicos arbusculares, da acidez do solo e de fontes de fósforo no crescimento do milho. **Acta Scientiarum Maringá** v. 24, n. 5, p. 1583-1590, 2002.
- COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; PICCOLO, A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. **Journal of Geochemical Exploration** v. 129, p. 40-44, 2013.
- CRUZ, E.C.; SOBREIRA, A.C.; BARROS, D.L.; GOMIDE, P.H.O. Doses de fósforo e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento e produção do feijão-caupi em Roraima. **O Boletim do Museu Integrado de Roraima** v.11, n.1, p. 21- 28, 2017.
- CUNHA, E.Q.; STONE, L.F.; FERREIRA, E.P.B; DIDONET, A.D.; MOREIRA, J.A.A.; LEANDRO, W.M. Sistemas de preparo do solo e culturas de cobertura na produção orgânica de feijão e milho. II- Atributos biológicos do solo **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 35, p. 603-611, 2011.
- DE CARVALHO, T.S. & MOREIRA, F.M.S. Simbioses tripartites: leguminosas, fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas. *In*: SIQUEIRA, J.O., de SOUZA, F.A., CARDOSO, E. J.B.N. & TSAI, S.M., (Eds.). **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras: UFLA, 2010. p. 383-414.
- DENISON, R.F.; KIERS E.T. Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi. **Current Biology** v. 21, n. 18, p.775-785, 2011.
- DE-POLLI, H.; GUERRA, J.G.M. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo: Método da fumigação-extração. Seropédica: Embrapa-CNPAB, p.10 (**Série Documentos**, 37). 1997.
- DEUNER, S.; NASCIMENTO, R.; FERREIRA, LS.; BADINELLI, PG.; KERBER, R.S. Adubação foliar e via solo de nitrogênio em plantas de milho em fase inicial de desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia** v. 32, n. 5, p. 1359-1365, 2008.
- EIVAZI, F.; TABATABAI, M.A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology & Biochemistry** v. 20, p. 601-606, 1988.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de análise química dos solos, plantas e fertilizantes. Embrapa Solos, Rio de Janeiro-RJ, 370p. 1999.
- EMBRAPA arroz e feijão. **Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2016): área, produção e rendimento**. Embrapa Arroz e Feijão, 2017. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>> Acesso em: 30/07/2018.
- EMBRAPA. A cultura do feijão-caupi no Brasil. Informações elaboradas pela Embrapa Meio-Norte a pedido da DARP/CGPP/DSV sobre a cultura de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Brasil. Embrapa Meio-Norte. Teresina-PI, 71p. 2016.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional e Pesquisa em Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa-Solos, 306 p, 2006.
- FAO. FAOSTAT. **Crops. Cow peas, dry**. Disponível em:<<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em 30 de julho de 2018.

FELDMANN, F.; IDCZAK, E. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. In: NORRIS, J.R., READ, D.J., VARMA, A.K. (Eds), Techniques for mycorrhizal research, Academic Press, San Diego, pp. 799-817. 1994.

FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). R package version 1.2.0. <<https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>> 2018.

FOLLI-PEREIRA, M.S.; MEIRA-HADDAD, L.S.; BAZZOLLI, D.M.S.; KASUYA, M.C.M. Micorriza arbuscular e a tolerância das plantas ao estresse. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 36, p. 1663-1679, 2012.

FROSI, G.; BARROS, V.A.; OLIVEIRA, M.T.; SANTOS, M.; RAMOS, D.G.; MAIA, L.C.; SANTOS, M.G. Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi increase biomass in woody species of a semiarid environment **Tree Physiology** v. 38, p. 25-36, 2017.

GATIBONI, L.C.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D.S.; BRUNETTO, G. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 43, n.8, p. 1085-1091, 2008.

GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society** v. 46, p. 235-244, 1963.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist** v. 84, p. 489-500, 1980.

GOTO, B.T.; MAIA, L.C. Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. **Mycotaxon** v. 96, p. 129 - 132, 2006.

GRISI, B. M. Método químico de medição da respiração edáfica: alguns aspectos técnicos. **Ciência e Cultura**. v.30, p. 82-88, 1978.

GROSS, E.; CORDEIRO, I.; CAETANO, F.H. Nodulação e micorrização em *anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 28, p.95-101, 2004.

GUALTER, R.M.R.; LEITE, L.F.C.; ARAÚJO, A.S.F.; ALCÂNTARA, R.M.C.M.; COSTA, D.B. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 28, p. 95-101, 2008.

GUCWA-PRZEPIÓRA, E.; NADGÓRSKA-SOCHA, A.; FOJCIK, B.; CHMURA, D. Enzymatic activities and arbuscular mycorrhizal colonization of *Plantago lanceolata* and *Plantago major* in a soil root zone under heavy metal stress. **Environmental Science and Pollution Research** v.23, p. 4742-4755, 2016.

GUO, W.; ZHAO, R.; FU, R.; BI, N.; WANG, L.; ZHAO, W.; GUO, J.; ZHANG, J. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the development of maize (*Zea mays* L.) grown in three types of coal mine spoils. **Environment Science Pollution Research**. v. 21, n.5, p. 3592-3603, 2014.

HARO, H.; KADIDIA S.B.; FANTA, B.; BARKISSA, F. Effect of native arbuscular mycorrhiza fungi inocula on the growth of Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in three

- differeents agro ecological zones in Burkina Faso. **Journal of Applied Biosciences** v. 108, p. 10553-10560, 2016.
- HARO, H.; SANON, K.B.; LE ROUX, C.; DUPONNOIS, R.; TRAORÉ, A.S. Improvement of cowpea productivity by rhizobial and mycorrhizal inoculation in Burkina Faso. **Symbiosis** v. 74, n.2, p. 107-120, 2018.
- HART, M.M. ANTUNES, P.M. CHAUDHARY, V.B., ABBOTT, L.K. Fungal inoculants in the field: Is the reward greater than the risk? **Functional Ecology** v. 32, p. 126-135, 2018.
- IGIEHON, N.O.; BABALOLA, O.O. Biofertilizers and sustainable agriculture: exploring arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 101, p. 4871-4881, 2017.
- ISLAM, K.R.; WEIL, R.R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**. v. 27, p. 408-416, 1998.
- JANOUSHKOVÁ, M.; KRAK, K.; WAGG, C.; ŠTORCHOVÁ, H.; ČAKLOVÁ, P.; VOSÁTKAA, M. Effects of Inoculum Additions in the Presence of a Preestablished Arbuscular Mycorrhizal Fungal Community. **Applied and Environmental Microbiology** v. 79, n.20, p. 6507-6515, 2013.
- JANSA, J.; SMITH, F.A.; SMITH, S.E. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? **New Phytologist** v.177, p. 779-789, 2008.
- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Reporter** v. 48, p. 692, 1964.
- JENKINSON, D.S.; POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology & Biochemistry**, v.8, p. 167-177, 1976.
- JESUS, E.C.; SCHIAVO, J.A.; FARIA, S.M. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Árvore** v.29, n. 4, p. 545-552, 2005.
- KOCH, A. M.; ANTUNES, P. M.; BARTO, E. K.; CIPOLLINI, D.; MUMMEY, D. L.; KLIRONOMOS, J. N. The effects of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal and garlic mustard introductions on native AM fungal diversity. **Biological Invasions** v. 13, p.1627-1639, 2011.
- KÖHL, L.; LUKASIEWICZ, C.E.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. **Plant, Cell and Environment** v. 39, p. 136–146, 2016.
- KÖHL, L.; LUKASIEWICZ, C.E.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Establishment and effectiveness of inoculated arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. **Plant, Cell and Environment** v. 39, p. 136-146, 2016.
- KÖHL, L.; OEHL, F.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Agricultural practices indirectly influence plant productivity and ecosystem services through effects on soil biota **Ecological Applications** v. 24, n.7, p. 1842-1853, 2014.
- KOIDE, R. T.; MOSSE, B. A history of research on arbuscular mycorrhiza. **Mycorrhiza** v.14, p.145-163, 2004.
- LENTH, R. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.2.1. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>. 2018.

LIMA, A.S.T.; XAVIER, T.F.; LIMA, C.E.P.; OLIVEIRA, J.P.; MERGULHÃO, A.C.E.S.; FIGUEIREDO, M.V.B. Triple inoculation with *bradyrhizobium*, *glomus* and *paenibacillus* on cowpea (*vigna unguiculata* [L.] WALP.) development. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 42, p. 919-926. 2011.

LINO, I.A.N. **Produtividade do milho e atividade biológica do solo sob influência de fungos micorrízicos arbusculares e de adubação orgânica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife. 2014.

LÚCIO, W.S.; FEITOSA, L.C.; MENDES FILHO, P.F.; HERNANDEZ, F.F.F.; NEVES, A.L.R.; GOMES-FILHO, E. Crescimento e respostas fisiológicas do meloeiro inoculado com fungos micorrízicos arbusculares sob estresse salino. **Ciências Agrárias** v. 34, n.4, p. 1587-1602, 2013.

MACHINESKI, O.; BALOTA, E.L.; SOUZA, J.R.P. Resposta da mamoneira a fungos micorrízicos arbusculares e a níveis de fósforo. **Ciências Agrárias** v. 32, n. 1, p. 1855-1862, 2011.

MAHERALI, H.; KLIRONOMOS, J.N. Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning. **Science** v. 316, p. 1746, 2007.

MAKOI, J.H.J.R.; NDAKIDEMI, P.A. Selected soil enzymes: Examples of their potential roles in the ecosystem. **African Journal of Biotechnology** v. 7, n. 3, p. 181-191, 2008.

MARINHO, R.C.N.; FERREIRA, L.V.M.; SILVA, A.F.; MARTINS, L.M.V.; NÓBREGA, R.S.A.; FERNANDES-JÚNIOR, P.I. Symbiotic and agronomic efficiency of new cowpea rhizobia from Brazilian Semi-Arid. **Bragantia**, v. 76, n. 2, p. 273- 281, 2017.

MARTINEZ, T.N.; JOHNSON, N.C. Agricultural management influences propagule densities and functioning of arbuscular mycorrhizas in low-and high-input agroecosystems in arid environments. **Applied Soil Ecology** v. 46, p. 300-306, 2010.

MATSUOKA, M.; MENDES, I.C.; LOUREIRO, M.F. Biomassa microbiana e atividade enzimática em solos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 27, p. 425-433, 2003.

MOHAMMAD, M.J.; HAMAD, S.R.; MALKAWI, H.I. Population of arbuscular mycorrhizal fungi in semi-arid environment of Jordan as influenced by biotic and abiotic factors. **Journal of Arid Environments** v. 53, p. 409-417, 2003.

MONTE JÚNIOR I.P.; MAIA L.C.; SILVA F.S.B.; CAVALCANTE, U.M.T. Use of plant residues on growth of mycorrhizal seedlings of neem (*Azadirachta indica* A.Juss.) **Journal of the Science of Food and Agriculture** v. 92, p. 654-659, 2011.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. Ecologia do solo In: MOREIRA, F. M.S & SIQUEIRA, J. O. (Eds.). **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: UFLA, p 81- 152, 2002.

MOURA, J.B.; GUARESCHI, R.F.; CORREIA, A.R.; GAZOLLA, R.P.; CABRAL, J.S.R. Produtividade do feijoeiro submetido à adubação nitrogenada e inoculação com *Rhizobium tropici*. **Global Science and Technology** v. 2, n. 3, p. 66-71, 2009.

NASCIMENTO, S.P.; BASTOS, E.A.; ARAÚJO, E.C.E.; FREIRE FILHO, F.R.; SILVA, E.M. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** v. 15, n. 8, p. 853-860, 2011.

NOVAIS, C.B.; BORGES, W.L.; JESUS, E.C.; SAGGIN JÚNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O. Inter- and intraspecific functional variability of tropical arbuscular mycorrhizal fungi isolates colonizing corn plants. **Applied Soil Ecology** v. 76, p. 78-86, 2014.

ODEYEMI, I.S., AFOLAMI, S.O. & SOSANYA, O.S. 2010. Effect of *Glomus mosseae* (arbuscular mycorrhizal fungus) n host parasite relationship of *Meloidogyne incognita* (Southern root nematode) on four improved cowpea varieties. **Journal of Plant Protection Research** v. 50, p. 320-325.

OEHL, F.; LACZKO, E.; OBERHOLZER, H.R.; JANSKA, J.; EGLI, S. Diversity and biogeography of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils. **Biology and Fertility of Soils** v. 53, n. 7, p. 777–797, 2017.

OEHL, F.; SIEVERDING, E.; MÄDER, P.; DUBOIS, D.; INEICHEN, K.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. **Oecologia** v. 138, p. 574-583, 2004.

OMIROU, M.; FASOULA, D.A.; IOANNIDES, I.M. *Bradyrhizobium* inoculation alters indigenous AMF community assemblages and interacts positively with AMF inoculum to improve cowpea performance. **Applied Soil Ecology** v. 108, p. 381–389, 2016.

ORDOÑEZ, Y.M.; FERNANDEZ, B.R.; LARA, L.S.; RODRIGUEZ, A.; URIBE-VÉLEZ, D.; SANDERS, I.R. 2016. Bacteria with phosphate solubilizing capacity alter mycorrhizal fungal growth both inside and outside the root and in the presence of native microbial communities. **PLoS ONE** 11(6): e0154438. 2016.

PELLEGRINO, E.; TURRINI, A.; GAMPER, H.A.; CAFÀ, G.; BONARI, E.; YOUNG, J.P.W.; GIOVANNETTI, M. Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. **New Phytologist** v. 194, p. 810-822, 2012.

PEREIRA, C.C.M.S.; PEDROSA E.M.R.; ROLIM, M.M.; CAVALCANTE, U.M.T.; PEREIRA FILHO J.V. Estresse hídrica e seus efeitos no desenvolvimento inicial e atividade bioquímica em cana-de-açúcar com a dupla inoculação de *Meloidogyne incognita* e fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada** v. 10, n. 4, p. 726-738. 2016.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society** v. 55, n. 1, p. 158-161, 1970.

PIELOU, E.C. Ecological Diversity. Wiley, New York. 1975

PONTES, J.S.; OEHL, F.; MARINHO, F.; COYNE, D.; SILVA, D.K.A.; YANO-MELO, A.M.; MAIA, L.C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in Brazil's Caatinga and experimental agroecosystems. **Biotropica** v. 49, n. 3, p. 413–427, 2017.

RANGEL, W. M. **Simbioses de fungos micorrízicos arbusculares e de rizóbio com leguminosas em solo contaminado com arsênio**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais, 2011.

REGO, F.A.; DIOP, I.; SADIO, O.; SYLVA, M.C.; AGBANGBA, C.E.; TOURÉ, O.; KANE, A.; NEYRA, M.; NDOYE, I.; WADE, T.K. Response of Cowpea to Symbiotic Microorganisms Inoculation (Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Rhizobium) in Cultivated Soils in Senegal. **Universal Journal of Plant Science** v. 3, n. 2, p. 32-42, 2015.

- RICH, M.K.; NOURI, E.; COURTY, P.E.; REINHARDT, D. Diet of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Bread and Butter? **Trends in Plant Science** v. 22, n. 8, p. 652-660, 2017.
- RILLIG M.C.; MUMMEY D.L. Mycorrhizas and soil structure. **New Phytologist** v. 171, p.41-53, 2006.
- RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizal, glomalin and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science** v. 84, p. 355-363, 2004.
- RODRIGUEZ, A.; SANDERS, I. The role of community and population ecology in applying mycorrhizal fungi for improved food security. **International Society for Microbial Ecology** v. 9, p. 1053–1061, 2015.
- RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B. Feijão-caupi tem uma Nova Estirpe de Rizóbio, BR 3267, Recomendada como Inoculante. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento** 15. Seropédica – RJ. 2006.
- SAKAI, A.K; ALLENDORF, F.W.; HOLT, J.S.; LODGE, D.M.; MOLOFSKY, J.; WITH, K.A.; BAUGHMAN, S.; CABIN, R.J.; COHEN, J.E.; ELLSTRAND, N.C.; MCCAULEY, D.E.; O'NEIL, P.; PARKER, I.M.; THOMPSON, J.N.; WELLER, S.G. The population biology of invasive species. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics** v. 32, p.305-332, 2001.
- SALES, F.R. **Inoculação com fungos micorrízicos arbusculares favorece atributos bioquímicos do solo em diferentes cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2017.
- SANDERS, I.R.; CLAPP, J.P.; WIEMKEN, A. The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystems – a key to understand the ecology and functioning of the mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist** v. 133, p. 123-134, 1996.
- SANTANA, A.S.S.; CAVALCANTE, U.M.T.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MAIA, L.C. Production, storage and costs of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). **Brazilian Journal of Botany** v. 37, n. 2, p. 159-165, 2014.
- SCHENCK, N.C.; PÉREZ, Y. Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3rd edition. Gainesville, Synergistic Publications. 1990.
- SCHLOTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J.C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems And Environment** v. 98, p. 255-262, 2003.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. The Mathematical Theory of Communication. University of Illinois Press, Urbana, Illinois. 1949.
- SILVA, D.K.A.; PEREIRA, C.M.R.; SOUZA, R.G.; SILVA, G.A.; OEHL, F.; MAIA, L.C. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in restinga and dunes areas in Brazilian Northeast. **Biodiversity and Conservation** v. 21, p. 2361-2373, 2012
- SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research** v. 11, p. 3733-3740, 2016.
- SILVA, G.A.; SIQUEIRA, J.O.; STÜRMER, S.L. Eficiência de fungos micorrízicos arbusculares isolados de solos sob diferentes sistemas de uso na região do Alto Solimões na Amazônia. **Acta Amazonica** v. 39, n. 3, p. 477-488, 2009.

- SILVA, M.F.; SANTOS, C.E.R.S.; SOUSA, C.A.; ARAÚJO, R.S.L.; STAMFORD, N. P.; FIGUEIREDO, M.V.B. Nodulação e eficiência da fixação do N₂ em feijão-caupi por efeito da taxa do inóculo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v. 36, p. 1418-1425, 2012.
- SINGH, P.K.; SINGH, M.; TRIPATHI, B.N. Glomalin: an arbuscular mycorrhizal fungal soil protein. **Protoplasma** v. 250, p. 663-669, 2013.
- SIQUEIRA, K.M.S.; TORRES, G.R.C.; PEDROSA, E.M.R.; MOURA, R.M.; CAVALCANTE, U.M.T.; STANFORD, N.P. Interações entre *Meloidogyne incognita* Raça 2, *Glomus etunicatum* e Estirpes de rizóbio em caupi (*Vigna Unguiculata*) e feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). **Nematologia Brasileira** v. 27, n. 2, p. 159-166, 2003.
- SOARES, S.A.G.; MARIANO, R.L.R.; CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C. Efeito de bactérias na germinação de fungos micorrízicos arbusculares e co-inoculação em mudas de abacaxizeiro. **Revista Caatinga** v. 22, n. 2, p. 31-38, 2009.
- SOUSA, C.S.; MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; OEHL, F.; MAIA, L.C.; GARRIDO, M. S.; LIMA, F.S. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi after organic fertilization in maize, cowpea and cotton intercropping systems. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 34, p. 149–156, 2012.
- SOUZA, R.G.; SILVA, D.K.A.; OLIVEIRA, J.R.G.; GOTO, B.T.; SILVA, F.S.B.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MAIA, L.C. Use of mycorrhizal seedlings on recovery of mined dunes in northeastern Brazil. **Pedobiologia** v. 55, n. 6, p. 303–309, 2012.
- SVENNINGSSEN, N.B.; WATTS-WILLIAMS, S.J.; JONER, E.J.; BATTINI, F.; EFTHYMIU, A.; CRUZ-PAREDES, C.; NYBROE, O.; JAKOBSEN, I. Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. **The ISME Journal** v. 12, p. 1296-1307, 2018.
- TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. **Soil Biology & Biochemistry** v. 1, p. 301-307, 1969.
- TEDERSON, L.; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, S.; KÖLJALG, U.; BAHRAM, M.; DORING, M.; SCHIGEL, D.; MAY, T.; RYBERG, M.; ABARENKOV, K. High-level classification of the Fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. **Fungal Diversity** v. 90, p.135-159, 2018.
- THIRKELL, T.J., CHARTERS, M.D., ELLIOTT, A.J., SAIT, S.M., FIELD, K.J. Are mycorrhizal fungi our sustainable saviours? Considerations for achieving food security. **Journal of Ecology** v. 105, p. 921-929, 2017.
- TIAN, H.; DRIJBERG, R.A.; ZHANGA, J.L.; LI, X.L. Impact of long-term nitrogen fertilization and rotation with soybean on the diversity and phosphorus metabolism of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi within the roots of maize (*Zea mays* L.). **Agriculture, Ecosystems and Environment** v. 164, p. 53-61, 2013.
- TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. **BioMed Research International**. ID 863240. 11p. 2013.
- TRINDADE, A.V.; FARIA, N.G.; ALMEIDA, F.P. Uso de esterco no desenvolvimento de mudas de mamoeiro colonizadas com fungos micorrízicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 35, n. 7, p. 1389-1394, 2000.

- TURRINI, A.; BEDINI, A.; LOOR, M.B.; SANTINI, G.; SBRANA, C.; GIOVANNETTI, C.; AVIO, L. Local diversity of native arbuscular mycorrhizal symbionts differentially affects growth and nutrition of three crop plant species. **Biology and Fertility of Soils** v. 54, n. 2, p. 203-217, 2018.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF-ENGEL, R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature** v. 396, p. 69-72, 1998.
- VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; MARTIN, F.M.; SELOSSE, M.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. **New Phytologist** v. 205, p. 1406-1423. 2015.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**. v.19, p. 703-707, 1987.
- VANDRESEN, J.; NISHIDATE, F.R.; TOREZAN, J.M.D.; ZANGARO, W. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação na formação e pós-transplante de mudas de cinco espécies arbóreas nativas do sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v. 21, n. 4, p. 753-765, 2007.
- VIERHEILIG, H., STEINKELLNER, S., KHAOSAAD, T., GARCIA-GARRIDO, J.M. The biocontrol effect of mycorrhization on soilborne fungal pathogens and the autoregulation of the AM Symbiosis: One Mechanism, Two Effects?. In: VARMA A. (eds) Mycorrhiza. Springer, Berlin, Heidelberg. 2008.
- WETZEL, K.; SILVA, G.A.; MATCZINSKI, U.; OEHL, F.; FESTER, T. Superior differentiation of arbuscular mycorrhizal fungal communities from till and no-till plots by morphological spore identification when compared to T-RFLP. **Soil Biology and Biochemistry** v. 72, p. 88–96, 2014.
- WILLIS, A.; RODRIGUES, B.F.; HARRIS, P.J.C. The ecology of arbuscular mycorrhizal fungi. **Critical Reviews in Plant Sciences** v. 32, p. 1-20, 2013.
- XU, X.; CHEN, C.; ZHANG, Z.; SUN, Z.; CHEN, Y.; JIANG, J.; SHEN, Z. The influence of environmental factors on communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Chenopodium ambrosioides* revealed by MiSeq sequencing investigation. **Scientific Reports** v. 7, p. 45134, 2017.
- YASMEEN, T.; HAMEED, S.; TARIQ, M.; ALI, S. Significance of arbuscular mycorrhizal and bacterial symbionts in a tripartite association with *Vigna radiata*. **Acta Physiologiae Plantarum** v. 34, p.1519-1528, 2012.