

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

ANGELO SOUTO DE SANTANA

PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

RECIFE

2017

ANGELO SOUTO DE SANTANA

PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Orientadora:

Dra. Leonor Costa Maia

Co-orientadora:

Dra. Uided Maaze Tibúrcio Cavalcante

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santana, Angelo Souto de
Produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares / Angelo Souto de
Santana. – Recife: O Autor, 2017.

67 f.: il.

Orientadores: Leonor Costa Maia, Uided Maaze Tibúrcio Cavalcante
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2014.
Inclui referências

1. Fungos I. Maia, Leonor Costa (orient.) II. Cavalcante, Uided Maaze
Tibúrcio (coorient.) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-130

ANGELO SOUTO DE SANTANA

PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biologia de Fungos.

Aprovado em 28/02/2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Leonor Costa Maia – (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Aldo Vilar Trindade – Examinador Externo
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo – Examinador Externo
Instituto Agrônômico de Pernambuco – Laboratório de Biologia de Solo

Dr. Romero Francisco Vieira Carneiro – Examinador Externo
Instituto de Ciência e Tecnologia – Universidade Federal de Alfnas

Dr. Gladstone Alves da Silva – Examinador Interno

Dedico aos meus pais, Amaro Colaço de Santana e Edilene Souto de Santana, ao meu irmão, Adriano Souto de Santana, aos meus avós Marina Silva Souto e Severino Silva Souto (*In memoriam*), por todo apoio e incentivo. A minha esposa e companheira de sempre Renata Tiné e a minha princesinha Maria Eduarda que veio para esse mundo nos trazer ainda mais alegria.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção sempre dada, proporcionando força para enfrentar todos os obstáculos encontrados e por permitir que eu seja a pessoa que sou hoje.

A toda minha família, a minha esposa Renata Tiné e a minha filha Maria Eduarda que veio me proporcionar mais força para vencer todas as minhas dificuldades.

Aos meus amigos, que me apoiaram durante a execução desse trabalho, mesmo estando distante sempre incentivando.

À minha orientadora, Prof^a Leonor Costa Maia, pelos ensinamentos passados desde a época da graduação e mestrado e pela atenção, paciência e por ter acreditado no meu potencial.

À minha co-orientadora, Prof^a Uided Maaze Tiburcio Cavalcante, que sempre me passou conselhos, ensinamentos, algumas vezes carões, mas sempre com intuito de me ajudar e desejar o melhor para meu caminho no desenvolver da Tese.

À Prof^a Adriana Mayumi Yano de Melo, pelos ensinamentos passados durante toda a realização da minha pesquisa, por ter contribuído bastante na execução dos experimentos e pela confiança depositada.

À Prof^a Elaine Malosso e ao Prof^o Gladstone Silva pelo convívio no laboratório e pela contribuição dada nos momentos de conversas em relação aos meus trabalhos que estavam sendo executados.

Ao Prof^o Everardo Valadares de Sa Barreto Sampaio, pela enorme contribuição no desenvolvimento dos artigos, pelas ajudas nas análises estatísticas e por todo incentivo passado durante nossas conversas nos momentos das dúvidas. Meu eterno agradecimento.

A todos os professores que fazem parte do Programa de Pós Graduação em Biologia, pela imensa contribuição da minha formação e também por todos os momentos de descontrações passados nos corredores do Departamento de Micologia.

A Renata Souza, pela enorme contribuição nas leituras dos trabalhos, pela ajuda nos experimentos e pelas palavras de incentivo que foram sempre importantes nos momentos de fraqueza.

À Araeska Carena, Anuska Cannuêla e Inácio Pascoal, pela grande amizade formada e também por toda a ajuda no desenvolver dos experimentos.

A João Ricardo, Vilma Santos, Indra Escobar, Cláudia Elizabete e Daniele Karla pela amizade, companheirismo e por todos os momentos maravilhosos vividos nesses anos de laboratório.

Aos colegas de Laboratório de Micorrizas: Bruno, Camilla, Catarina, Dani Magna, Débora, Fred, Ingrid, Iolanda, Joana, Josiane, João Jorge, Juliana, Larissa, Lyssandra, Mayra, Moacir, Natália, Neto, Rejane pela ajuda e alegria durante a minha estada no laboratório.

Aos amigos dos outros laboratórios do Departamento de Micologia.

À Aline Passos e Eliene Matos pela ajuda no desenvolvimento do experimento em Petrolina.

Aos que tenham contribuído de alguma forma na realização do meu trabalho e na minha formação profissional.

RESUMO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) promovem vários benefícios para as plantas, desde o incremento no crescimento vegetal à tolerância ao ataque de patógenos radiculares. Nesse contexto, faz-se necessário produzir inoculantes do fungo que venham a ser comercializados no mercado ou mesmo produzidos e utilizados diretamente por agricultores na própria área de cultivo. O objetivo geral desta tese foi definir tecnologia economicamente viável para produção de inoculante micorrízico arbuscular, com capacidade infectiva e efetiva adequadas. No primeiro experimento, inóculos de FMA (*Claroideoglomus etunicatum* e *Glomus clarum*) foram produzidos em aeroponia e a infectividade testada após armazenamento por três, seis e 10 meses, em temperatura ambiente (28 °C) ou a 4 °C, em três substratos: a) areia; b) areia + vermiculita; c) areia + argila expandida. No segundo experimento os inoculantes (*C. etunicatum* e *Acaulospora longula*) foram produzidos em canteiros de alvenaria, construídos em locais com clima tropical úmido (Recife) e semiárido (Petrolina), distantes 756 km entre si. Os canteiros foram divididos em parcelas com 50 cm × 48,5 cm × 28 cm e preenchidos com os substratos: T1) areia + argila; T2) areia + argila + bagaço de cana; T3) areia + argila + leucena triturada; T4) areia + argila + leucena triturada + bagaço de cana. Em todas as parcelas foram plantadas mudas de sorgo (36 plântulas pré-colonizadas); as avaliações foram realizadas ao final de dois ciclos de cultivo (três meses cada). O sistema aeropônico para a produção de inoculante de FMA é adequado, com elevada proliferação de propágulos de *Claroideoglomus etunicatum* e *Glomus clarum* e, relativamente, de menor custo, especialmente para *C. etunicatum*. Os inóculos produzidos em sistema aeropônico e armazenados a 4 °C permanecem viáveis, por pelo menos 10 meses, em substrato composto de areia adicionado de argila ou vermiculita, sendo recomendado para uso como bioinoculantes. A tecnologia para produção de inoculante em canteiro de alvenaria utilizando como substrato areia + argila expandida adicionado de leucena triturada é promissora como alternativa de biofertilizante tanto para áreas tropicais úmidas quanto semiáridas.

Palavras-chave: FMA, sistema aeropônico, resíduo orgânico, agricultura sustentável.

ABSTRACT

The arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) promote several benefits to plants, since the increase in plant growth to tolerance to attack by root pathogens. In this context, it is necessary to produce inoculants fungus that may be marketed or produced and used directly by farmers in their own growing area. The overall objective of this thesis was to define economically viable technology for producing arbuscular mycorrhizal inoculant with high infectivity and efficiency. In the first experiment, inoculum of AMF (*Claroideoglomus etunicatum* and *Glomus clarum*) were produced in aeroponic , and thereafter the inoculum infectivity was tested after storage for three, six and 10 months at room temperature (28 °C) or at 4 °C in three substrates: a) sand; b) sand, vermiculite; c) sand + expanded clay. In the second experiment the inoculants (*C. etunicatum* and *Acaulospora longula*) were produced in masonry beds, built in locations with humid tropical climate (Recife) and semiarid (Petrolina), 756 km distant from each other. The masonry beds were divided into plots with 50 cm × 48.5 cm × 28 cm and filled with the substrates: T1) sand + expanded clay; T2) sand + expanded clay + cane bagasse; T3) sand + expanded clay + chopped leucaena; T4) sand + expanded clay + cane bagasse + chopped leucaena. In each plot were planted sorghum (36 pre-colonized seedlings); the evaluations were carried out after two crop cycles (three months each). The aeroponic system for the production of AMF inoculum is adequate, with high proliferation of propagules of *Claroideoglomus etunicatum* and *Glomus clarum* and relatively low cost, especially for *C. etunicatum*. The inocula produced in the aeroponic system and stored at 4 8C remains viable for at least 10 months in substrates composed of sand added of clay or vermiculite, being recommended for use as bioinoculants. The technology for production of inoculum in horticultural beds using sand as substrate + expanded clay + chopped leucaena is a alternative of biofertilizers for both humid and semi-arid tropical areas.

Keywords: AMF, aeroponic system, organic fertilizer, sustainable agriculture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Porcentagem média infectiva (MIP) de *Claroideoglossum etunicatum* e *Glomus clarum*, produzidos em sistema aeropônico (inicial), e estocados por diferentes períodos em três substratos, à 4 e 28 °C ($\pm$ desvio padrão). 39

Figura 2 - Porcentagem média infectiva de inoculantes de *Claroideoglossum etunicatum* (CE) e *Acaulospora longula* (AL), em Recife (REC) e Petrolina (PET), em dois ciclos de produção, em canteiro de alvenaria, em quatro substratos: T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25). 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos, hospedeiros, FMA e produção de inoculante micorrízico arbuscular.	23
Tabela 2 - Análise química dos substratos utilizados para produção dos inoculantes.	37
Tabela 3 - Produção de glomerosporos e colonização micorrízica em plantas de batata doce crescidas, inicialmente em sistema solo + areia, por 90 dias, e depois em aeroponia por 45, 90 e 120 dias.	38
Tabela 4 - Biomassa seca (g) da parte aérea de plantas de sorgo inoculadas com <i>Claroideoglomus etunicatum</i> (CE) e <i>Acaulospora longula</i> (AL), em dois ciclos de produção, em canteiro de alvenaria, utilizando quatro substratos: T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25).	44
Tabela 5 – Número de glomerosporos (g^{-1} substrato) de <i>Claroideoglomus etunicatum</i> (CE) e de <i>Acaulospora longula</i> (AL), em dois ciclos de produção, em canteiro de alvenaria, utilizando quatro substratos: T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25).	46
Tabela 6 - Colonização micorrízica (%) produzida por <i>Claroideoglomus etunicatum</i> (CE) e por <i>Acaulospora longula</i> (AL), em dois ciclos de produção, em canteiro de alvenaria, utilizando quatro substratos: T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25).	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CV	- Coeficiente de variação
FMA	- Fungos Micorrízicos Arbusculares
INVAM	- International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi
L.	- Linaus
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
UNIVASF	- Universidade Federal do Vale do São Francisco
v/v	- volule/volume
var.	- Variedade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 PROBLEMATIZAÇÃO	14
1.2 OBJETIVOS	15
1.2.1 Objetivo geral	15
1.2.2 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO LITERÁRIA	16
2.1 MICORRIZA ARBUSCULAR	16
2.2 BENEFÍCIOS DA UTILIZAÇÃO DE FMA	18
2.2.1 Na produção de mudas	18
2.2.2 No estabelecimento de plantas micropropagadas	19
2.2.3 Na recuperação de áreas degradadas	20
2.2.4 Na tolerância a estresses salino e hídrico	21
2.2.5 No controle biológico	21
2.3 PRODUÇÃO DE INOCULANTE DE FMA	23
2.3.1 Produção de inoculante em solo e outros substratos	25
2.3.2 Produção de inoculante <i>In vitro</i>	29
2.3.3 Produção de inoculante livre de substrato	30
3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	32
3.1 PRODUÇÃO, ESTOCAGEM E CUSTOS DE INÓCULO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)	32
3.1.1 Coleta do solo e local de execução dos experimentos	32
3.1.2 Produção de inoculante em sistema aeropônico	33
3.1.3 Potencial infectivo do inoculante produzido em sistema aeropônico	34

3.1.4	Custos de produção do inoculante	35
3.2	PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA DE INÓCULO DE FMA EM CLIMAS TROPICAL ÚMIDO E SEMIÁRIDO	35
3.2.1	Montagem dos Experimentos.....	35
4	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	38
4.1	PRODUÇÃO, ESTOCAGEM E CUSTOS DE INÓCULO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA).....	38
4.1.1	Produção do inoculante em diferentes sistemas	38
4.1.2	Armazenamento e estocagem do inoculante	39
4.1.3	Custos de produção do inoculante	40
4.2	PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA DE INÓCULO DE FMA EM CLIMAS TROPICAL ÚMIDO E SEMIÁRIDO	44
4.2.1	Biomassa vegetal em função da inoculação micorrízica	44
4.2.2	Produção de esporos e taxa de colonização.....	45
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

A maioria das espécies vegetais é favorecida pela associação com fungos do solo, os quais colonizam as raízes formando uma simbiose mutualista, denominada micorriza (SMITH; READ, 2008). Dentre os tipos de micorizas, a arbuscular, formada por fungos micorrízicos arbusculares (FMA), pertencentes ao Filo Glomeromycota (SCHÜBLER et al. 2001), é a mais distribuída no planeta, estabelecendo associação com mais de 90% dos representantes de briófitas, pteridófitas, gimnospermas e angiospermas (MEHROTRA, 2005; SAGGIN-JÚNIOR; SILVA 2005).

Os FMA favorecem principalmente o crescimento e o estado nutricional da planta, pelo aumento da área de absorção, através da formação do micélio externo que se estende pelo solo, muito além das raízes, e auxilia na absorção de nutrientes de baixa disponibilidade, especialmente o fósforo (YAO et al., 2008). Os benefícios da associação micorrízica incluem produção de mudas de espécies de importância econômica como fruteiras (COSTA et al., 2001; SILVA et al., 2008), medicinais (HILLIS et al., 2008; CHO et al., 2009) e as utilizadas em programas de reflorestamento (CARNEIRO et al., 2004). Outros benefícios estão relacionados à proteção das plantas contra ataque de patógenos radiculares (BORGES et al., 2007; SINGH et al., 2012a) e à tolerância do vegetal a estresse salino (SHENG et al., 2008) e a solos contaminados por cádmio, zinco e chumbo (REDON et al., 2009). Os FMA atuam no processo de ciclagem de nutrientes (SILVEIRA, 1992), aumentando a atividade biológica no ambiente edáfico (MILLERET et al., 2009). Além disso, esses micro-organismos produzem uma glicoproteína, denominada glomalina, que favorece a agregação das partículas do solo, contribuindo para o desenvolvimento do vegetal (WU et al., 2008).

Devido à importância dos FMA para diversas culturas (COSTA et al., 2001; SILVA et al., 2008), aliados à atuação na estruturação dos solos (BEDINI et al., 2007) e na ciclagem de nutrientes (SILVEIRA, 1992), a produção de inoculante de FMA pode ser alternativa para o desenvolvimento da agricultura sustentável, evitando a aplicação de insumos químicos que degradem o solo e reduzindo os gastos na utilização de fosfatos.

A inoculação de FMA tem sido utilizada como um auxiliar vantajoso nos processos de produção de mudas de plantas de interesse econômico, como fruteiras (VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ et al. 2011; CASTELLANOS-MORALES et al. 2012), medicinais (MONTE-

JÚNIOR et al. 2012; ZUBEK et al. 2012) e usadas em programas de reflorestamento (SOUZA et al., 2010); contribuindo no estabelecimento de mudas micropropagadas (ANZANELLO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; SINGH et al., 2012a); no aumento na produção vegetal (SILVA, 2006); e aumento na tolerância a ambientes salinos (ABBASPOUR, 2010; KUMAR et al., 2010), solos contaminados (BABU; REDDY, 2011; WANG et al. 2011), estresse hídrico (CELEBI et al., 2010; ASRAR; ELHINDI, 2011) e ataque de patógenos (ODEYEMI et al., 2010; SINGH et al., 2012b).

A produção de inóculo de FMA livre de patógenos é importante e a aeroponia mostra-se bastante eficaz para tal finalidade, pois os vegetais são produzidos sem contato com o substrato, recebendo soluções nutritivas no sistema radicular (SYLVIA; HUBBELL, 1986). Entre os métodos de produção de inoculante (cultivo *in vitro*, cultivo em potes, hidroponia e “on-farm”), o sistema aeropônico é vantajoso por produzir maior quantidade de glomerosporos que o sistema de cultivo em potes contendo solo (JARSTFER et al., 1998; SYLVIA, 1994) e por apresentar-se livre de patógenos (MOHAMMAD et al., 2000). O método consiste na proliferação de propágulos do fungo na ausência de substrato (SYLVIA & HUBBELL, 1986; WU et al., 1995). As plantas micorrizadas são cultivadas em câmaras aeropônicas recebendo solução nutritiva diretamente no sistema radicular (Jarstfer & Sylvia 1992).

A produção em massa de inóculo micorrízico também vem sendo desenvolvida em campo. Esse sistema de produção de inoculante pode ser uma alternativa para aperfeiçoar o fornecimento de biofertilizantes para produtores agrícolas, diminuindo a utilização de fertilizantes químicos que possam degradar o solo.

1.1 PROBLEMATIZAÇÃO

Diante da importância dos FMA há uma necessidade de produção em larga escala de inoculante para ser utilizado na agricultura, trazendo vantagens não apenas econômicas, mas também ambientais. Entretanto, para garantir uma simbiose eficiente recomenda-se a inoculação com FMA selecionados para cada ambiente (ANTUNES et al. 2011), é necessário o desenvolvimento de técnicas adequadas de produção de inoculantes em larga escala, que tenham um elevado potencial de infectividade e efetividade (KAPOOR et al., 2008; IJDO et al. 2011).

A produção de inoculante de FMA é difícil devido à característica biotrófica obrigatória desses fungos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Diversos métodos para produção de inóculo de

FMA têm sido propostos e a geração de técnicas para obtenção de inoculante de FMA na propriedade agrícola pode ser a chave para o uso sustentável desses organismos (KAPOOR et al., 2008).

Trabalhos que visem à multiplicação de FMA em larga escala, utilizando técnicas mais fáceis para o agricultor, são de interesse não apenas pelo potencial desses micro-organismos em contribuir para a diminuição dos custos de produção e redução no uso de fertilizantes fosfatados, mas também pela manutenção da qualidade e biodiversidade do solo. Aliado a produção em larga escala, a manutenção da durabilidade dos inóculos também é uma busca importante no processo de produção de inoculantes. Assim, a produção de substratos eficientes que aumentem a durabilidade, a infectividade e a eficiência dos inóculos também deve ser uma prioridade nos estudos de produção de inóculos de FMA.

A produção de inoculantes de FMA, objetivando a comercialização, pressupõe também estudos do substrato onde serão produzidos e armazenados, levando-se em consideração o peso, a viabilidade e o custo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi testar duas tecnologias para produção de inoculante de FMA em sistema aeropônico e em canteiros de alvenaria. Também foram testados diferentes tipos de substratos na formulação do inoculante e a eficiência destes em conservar o inóculo quanto a sua capacidade infectiva e efetiva ao longo do tempo.

1.2.2 Objetivos específicos

- Produzir inoculante de FMA em aeroponia e selecionar a melhor condição de armazenamento e estocagem para a manutenção da viabilidade do inoculante.
- Determinar a viabilidade de produção de inoculante de FMA, em canteiro de alvenaria a céu aberto, em duas áreas: uma com clima tropical úmido, outra com clima semiárido, ambas na região Nordeste do Brasil.

2 REVISÃO LITERÁRIA

2.1 MICORRIZA ARBUSCULAR

A micorriza, simbiose mutualista entre fungos des solos e raízes ativas dos vegetais é estabelecida pela troca bidirecional de benefícios, com o fungo fornecendo nutrientes e água para a planta e esta translocando para o micobionte fotossintatos que servem como fonte de energia para o fungo completar seu ciclo de vida. Dentre os tipos de micorrizas, a arbuscular é a mais amplamente distribuída no planeta, sendo formada por fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que estabelecem associação com representantes de mais de 90% das famílias vegetais e têm distribuição cosmopolita (SMITH; READ 2008).

Os FMA estão incluídos no Filo Glomeromycota (SCHÜBLER et al., 2001), sendo a característica principal da associação a formação de arbúsculos, estrutura que se estabelece nas células do córtex radicular do hospedeiro, constituindo o sítio de troca de nutrientes entre os simbiontes. Os FMA favorecem, principalmente, o crescimento e o estado nutricional da planta, pelo aumento da área de absorção, através da formação do micélio externo que se estende pelo solo muito além das raízes e auxilia na absorção de nutrientes de baixa mobilidade, especialmente o fósforo (YAO et al., 2008). O fósforo é o nutriente inorgânico mais importante para a associação, pois afeta diretamente o desenvolvimento da micorríza arbuscular, estabelecendo relação direta com a taxa de crescimento fúngico intrarradicular (KIRIACHEK et al., 2009).

Entre outros benefícios da associação micorrízica para a planta estão: proteção contra patógenos radiculares (ODEYEMI et al., 2010); participação no processo de ciclagem de nutrientes (SILVEIRA, 1992), contribuindo para o aumento da atividade biológica no ambiente edáfico (MILLERET et al., 2009); agregação das partículas do solo e estoque de carbono pela produção de uma glicoproteína (glomalina), a qual também é utilizada como indicadora de qualidade do solo (MERGULHÃO et al., 2010), e possivelmente da fertilidade do solo em sistemas agrícolas (BEDINI et al., 2007).

O benefício da utilização de FMA na promoção do crescimento vegetal tem sido demonstrado em fruteiras de interesse econômico (ANJOS et al., 2005; NOGUEIRA; CARDOSO, 2006; SILVA et al., 2008), em espécies arbóreas (ZANGARO et al., 2003; CARNEIRO et al., 2004), em solos com baixa fertilidade (KAHILUOTO et al., 2001;

CAVALCANTE et al., 2001b; ILBAS; SAHIN, 2005) e em solos contaminados com metais pesados (SILVA et al., 2006; SANTOS et al., 2008; REDON et al., 2009). Efeitos benéficos da inoculação com FMA em solos com baixa quantidade de fósforo (1 mg dm^{-3}) foram registrados para seis espécies arbóreas [*Senna macranthera* (Calladon) Irwin; Barneby, *Guazuma ulmifolia* Lam., *Senna multijuga* (Rich.) Irwin; Barneby, *Solanum granuloso-leprosum* Dun., *Schinus terebenthifolius* Raddi e *Trema micrantha* (L.) Blume], mostrando eficiência do micobionte em absorver nutrientes importantes para o desenvolvimento do vegetal (FLORES-AYLAS et al., 2003). Entretanto, em solos muito pobres o efeito da inoculação nem sempre é evidenciado (CARAVACA et al., 2002), sendo necessário melhorar a fertilidade, principalmente em relação ao fósforo, para obtenção da melhor resposta à micorrização (BURITY et al., 2000). Contudo, a adição de níveis crescentes de fósforo não favoreceu o crescimento de mudas micorrizadas de algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) (AGUIAR et al., 2004), indicando que a espécie em estudo é dependente de FMA para seu desenvolvimento.

A prévia inoculação com FMA pré-selecionados para produção de mudas de espécies arbóreas pode ser importante no estabelecimento em campo, contribuindo para maior adaptação e sobrevivência das plantas às condições do novo ambiente (CARNEIRO et al., 2004).

Diante da importância dos FMA, a produção de inoculante em larga escala se faz necessária, podendo ser utilizada como alternativa de biofertilizante, diminuindo a necessidade de aplicação de produtos químicos (inseticidas, nematicidas, glifosato, organoclorados, dentre outros) que podem ficar retidos no solo, reduzindo a fertilidade e contaminando as culturas. Entretanto, a produção de inoculante tem sido dificultada em razão do biotrofismo obrigatório dos FMA, como tal, não completam o ciclo plenamente em meios de cultura, necessitando de uma planta hospedeira para que isso ocorra (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Métodos como cultura em solo e cultura aeropônica (PAIVA et al., 2003), substratos com mistura de composto e vermiculita (DOUDS JR. et al., 2006), combinações de turfa, vermiculita, solo e matéria orgânica (ZAMBOLIM et al., 1992), adição de quitina (GRYNDLER et al., 2003) e sacarose ao substrato de cultivo (VILARIÑO; SAINZ 1997), adição de solução nutritiva com tampão Tris-HCl ao substrato (SILVA et al., 2007) e cultivo *in vitro* (TIWARE; ADHOLEYA, 2002), dentre outras, tem sido utilizados para produção de inoculante de FMA. Douds Jr. et al.

(2010) vêm tentando a produção no campo, de modo a propiciar condições mais simples, que possam ser adotadas em larga escala pelos próprios agricultores.

2.2 BENEFÍCIOS DA UTILIZAÇÃO DE FMA

2.2.1 Na produção de mudas

É comprovado que em muitas situações a simbiose estabelecida com FMA pode favorecer a tolerância dos vegetais ao transplântio para o campo (CARNEIRO et al., 2004). A micorrização beneficiou 20 espécies arbóreas de sucessão primária e tardia, principalmente quando cultivadas em substratos com baixa fertilidade (ZANGARO et al., 2007).

Em plantas frutíferas, os FMA podem constituir ferramenta biotecnológica na fase de produção de mudas (COSTA et al., 2001; SILVA et al., 2008), diminuindo a necessidade de aplicação de fertilizantes fosfatados. A inoculação com *Diversispora versiforme* (Karsten) Berch favoreceu o crescimento de *Citrus tangerine* Yu. Tanaka, conferindo, ao hospedeiro, tolerância ao estresse hídrico (WU; XIA, 2006). Benefícios da micorrização em mudas de *Citrus limonia* L. Osbeck inoculadas com *Glomus intraradices* Schenk, Smith também foram relatados, com aumento da biomassa seca total da planta, maior concentração de P na parte aérea e absorção de P específico pelas raízes (NOGUEIRA; CARDOSO, 2006). Isso evidencia a importância dos FMA para o vegetal, uma vez que o fósforo é um nutriente de difícil absorção pela planta e está diretamente relacionado ao desenvolvimento do simbionte (KIRIACHEK et al., 2009).

Além do crescimento vegetal, outros benefícios da micorrização são mencionados em mudas de espécies com potencial medicinal, como a *Artemisia annua* L. inoculada com *Glomus macrocarpum* Tul., Tul., que apresentou aumento no conteúdo nutricional e na concentração de óleo essencial e de artemisina (CHAUDHARY et al., 2008). Em outro trabalho com a mesma espécie vegetal, mudas inoculadas com *Glomus macrocarpum* e *Glomus fasciculatum* (Thaxt.) Gerd.; Trappe emend. Walker; Koske apresentaram aumento no tricoma glandular foliar, local onde ocorre a síntese do composto secundário artemisina, comparado com o tratamento sem inoculação (KAPOOR et al., 2007).

Do mesmo modo, o desenvolvimento da planta e a produção de óleo no rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe foram incrementados pela inoculação com *Fuscutata heterogama* Oehl, F.A. Souza, L.C. Maia; Sieverd. (SILVA et al., 2008). Em mudas

de *Mentha arvensis* L. inoculadas com *Acaulospora scrobiculata* Trappe também houve maior teor de óleos essenciais, aumento de mentol nos óleos, além do maior crescimento, comparado às plantas não micorrizadas (FREITAS et al., 2006).

2.2.2 No estabelecimento de plantas micropropagadas

A micropropagação consiste no cultivo de plantas *in vitro*, em substrato livre de patógenos, sendo as plantas produzidas em recipientes contendo meio de cultura rico em nutrientes para o seu desenvolvimento e mantidas em condições ambientais controladas (KAPOOR et al., 2008). Em virtude do rigoroso controle que as plântulas estão submetidas em sistemas de micropropagação, a utilização de micro-organismos benéficos, como os FMA, pode ser uma opção para o estabelecimento dessas plantas após o transplântio no campo. Trabalhos vêm sendo realizados com a utilização de FMA para a aclimação dessas plantas em casa de vegetação antes do transplântio (SILVA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2010; RUIZ et al., 2011; YADAV et al., 2012).

Os efeitos benéficos da inoculação com FMA em plântulas micropropagadas estão diretamente relacionados ao melhor desenvolvimento do sistema radicular, aumento na eficiência fotossintética, na capacidade de absorção de água, no estoque de nutrientes, maior tolerância ao ataque de patógenos radiculares e a estresses ambientais (KAPOOR et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

Plantas de *Capsicum annum* L. cv. San Luis colonizadas com uma mistura de *Paraglomus albidum* (Walker; Rhodes), *Claroideoglossum claroideum* (Schenk; Smith) e *Glomus diaphanum* (Morton; Walker) apresentaram rápida adaptação à aclimação e incremento no crescimento (ESTRADA-LUNA; DAVIES JR., 2003). A inoculação micorrízica em plantas micropropagadas de *Scutellaria integrifolia* Pursh apresentou efeitos positivos sobre o crescimento, principalmente no desenvolvimento radicular, em comparação aos tratamentos sem a presença de FMA (JOSHEE et al., 2007). Plântulas de antúrio (*Anthurium andraeanum* Lindl.) obtidas por micropropagação apresentaram maior produção de matéria seca quando inoculadas com FMA (STANCATO; SILVEIRA, 2006).

A inoculação com *Funneliformis mosseae* (T.H. Nicolson; Gerd.) Gerd. ; Trappe em plântulas micropropagadas de romã (*Punica granatum* L.) contribuiu para o desenvolvimento,

proporcionando maior taxa de sobrevivência (90% e 88% aos 60 e 90 dias, respectivamente, após inoculação micorrízica) na fase de aclimação, em casa de vegetação (SINGH et al., 2012b).

Diante dos resultados com diversas culturas, os FMA apresentam-se como micro-organismos importantes na fase de aclimação de plantas micropropagadas, trazendo benefícios que podem ser importantes para seu estabelecimento em um novo ambiente.

2.2.3 Na recuperação de áreas degradadas

A constante degradação do meio ambiente tem impulsionado pesquisas em busca de recursos biológicos para a recuperação de áreas impactadas. A utilização de mudas micorrizadas pode constituir alternativa para o estabelecimento de espécies vegetais nessas áreas, melhorando também as condições edáficas do local (MILLERET et al., 2009). Mudas micorrizadas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Mart.) inoculadas com FMA representaram maior economia para o produtor, com alta taxa de sobrevivência (88%) após o transplante para o campo (CARNEIRO et al., 2004).

Vodnik et al. (2008) relataram que a glomalina, produzida exclusivamente por FMA, contribui para o sequestro de metais pesados em solos poluídos, se ligando a elementos como o Pb. Nesse aspecto, Cornejo et al. (2008) relataram que a glicoproteína atuou na imobilização do cobre em área contaminada, benefício que pode ser útil para o restabelecimento da vegetação em locais poluídos com metais pesados.

Os FMA presentes em solo contaminado por metais pesados também desempenham papel importante para a planta, pois são capazes de adsorver metais no micélio externo, evitando que estes passem para o vegetal (JANKONG; VISOOTTIVISETH, 2008; WANG et al., 2008). Estudando o efeito de FMA sobre o crescimento e o estoque de metais (Cd, Zn, Pb) em *Medicago truncatula* Gaertn., em solo agrícola contaminado, Redon et al. (2009) verificaram que nas plantas micorrizadas a concentração de metais na parte aérea foi reduzida em relação ao controle não inoculado. Da mesma forma, a inoculação com FMA favoreceu o acúmulo de metais pesados em raízes de *Brachiaria decumbens* Stapf., diminuindo a passagem de elementos tóxicos para a parte aérea da planta, em relação ao controle não inoculado (SILVA et al., 2006).

2.2.4 Na tolerância a estresses salino e hídrico

Os FMA também podem contribuir para o aumento da tolerância das plantas em áreas com baixa disponibilidade de água (WU; XIA, 2006; BOLANDNAZAR et al., 2007) e em ambientes salinos (KAYA et al., 2009; SORIANO et al., 2009) pela ação do micélio externo que auxilia na absorção de água pelos vegetais. Plantas de *Carthamus tinctorius* L. inoculadas com *Claroideoglomus etunicatum* foram mais tolerantes a estresse salino do que os tratamentos não inoculados, com maior incremento nos pesos da parte aérea e radicular, maior quantidade de folhas e aumento da área foliar, apresentando maior conteúdo de P nas folhas, o que pode ter favorecido o desenvolvimento nos níveis de salinidade estudados (ABBASPOUR, 2010). Da mesma forma, mudas de *Jatropha curcas* L. inoculadas com consórcio de espécies foram mais resistentes aos cinco níveis de salinidade estudados (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5% de NaCl), com comprimento da parte aérea e radicular e diâmetro do caule significativamente maiores do que o controle e maior taxa de sobrevivência nos níveis mais altos de salinidade (KUMAR et al., 2010).

Em mudas de *Tagetes erecta* L. inoculadas com *Septoglomus constrictum* Trappe e submetidas a estresse hídrico houve promoção de crescimento vegetal, maior conteúdo de P e de pigmentos, e melhoria na qualidade das flores, tornando as plantas mais resistentes ao regime escasso de disponibilidade de água (ASRAR; ELHIND, 2011).

Em experimento realizado em campo, plantas de milho (*Zea mays* L.) micorrizadas com *Glomus intraradices* e submetidas a diferentes níveis de irrigação (96, 63, 32, 15 e 4% de umidade do solo) tiveram o desenvolvimento favorecido, mesmo nos níveis mais elevados de déficit hídrico (4% de umidade do solo) em comparação aos tratamentos sem a presença do simbionte (CELEBI et al., 2010). Este e outros resultados mostram a importância da presença dos FMA no solo, incrementando o desenvolvimento e a tolerância dos vegetais a condições adversas.

2.2.5 No controle biológico

No solo existem micro-organismos como bactérias, fungos e nematóides que atuam como patógenos de diversas culturas, causando prejuízos na agricultura. Entre as formas de controle desses patógenos estão o uso de cultivares resistentes, a aplicação de resíduos tóxicos (inseticidas, nematicidas, bactericidas, dentre outros), a rotação de culturas e a fumigação do

solo. No entanto, novas formas de controle biológico devem ser usadas visando a sustentabilidade do ambiente, e o uso de micro-organismos simbiotróficos, como os FMA, podem ser uma importante ferramenta biotecnológica para essa finalidade (MAIA et al., 2005).

A produção de arbúsculos nas células do córtex radicular proporciona modificações na morfologia dessas células, conferindo à planta uma barreira física contra a penetração de possíveis patógenos. Com a simbiose estabelecida ocorrem efeitos diretos e indiretos para a planta, tais como: interações químicas e bioquímicas, alterações na fisiologia radicular, aumento da espessura da parede das células corticais, maior lignificação das raízes, estímulo à comunidade rizosférica antagônica e maior absorção de nutrientes (MAIA et al., 2005).

Pesquisas têm relatado o emprego de FMA para aumentar a resistência de plantas ao ataque de patógenos do solo (CAMPOS, 2009; HU et al., 2010; SINGH et al., 2012a). Os patógenos radiculares competem por sítios de colonização dos FMA, por isso muitas vezes a inoculação prévia com o simbiote pode reduzir os danos causados pela doença e o desenvolvimento do parasita (SMITH; READ, 2008). Em bananeira-maçã, a inoculação prévia com FMA reduziu os índices do mal-de-panamá (BORGES et al., 2007). Em quatro variedades de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. infectadas com *Meloidogyne incógnita* (Kofoid; White) Chitwood, as mudas micorrizadas apresentaram menor número de galhas e houve menor reprodução do parasita que no tratamento controle (ODEYEMI et al., 2010).

Redução na reprodução do patógeno e diminuição de sintomas também foram observados em mudas de maracujá doce (*Passiflora alata* Curtis) micorrizadas com *Fuscutata heterogama* e infestadas com *Meloidogyne incógnita* tiveram sintomas menos severos que as mudas não associadas a FMA; além disso também se registrou redução na reprodução do patógeno (Anjos et al., 2010). A incidência de *Fusarium chlamydosporum* Wollenw. Reinking também foi reduzido em mudas de pepino (*Cucumis sativus* L.) pela ação de FMA (HU et al., 2010).

Os fatores que atuam diretamente na proliferação da doença na planta estão relacionados à sua nutrição e à densidade relativa do inóculo do patógeno. Plantas micorrizadas tendem a ser mais bem nutridas e desenvolvidas, reduzindo dessa forma a atuação do organismo patogênico (MAIA et al., 2005).

2.3 PRODUÇÃO DE INOCULANTE DE FMA

Diante dos benefícios advindos da associação micorrízica, a produção de inoculante de FMA em larga escala é necessária, pois esses simbiossiontes constituem ferramenta biotecnológica que pode reduzir a utilização de insumos agrícolas que degradam o ambiente, bem como os adubos que não degradam, mas que podem ser caros.

O ponto chave para o uso de FMA como promotores de crescimento vegetal e demais interesses agrícolas é o desenvolvimento de técnicas adequadas para a produção em larga escala de inoculante livre de patógenos com grande potencial de infectividade e efetividade (KAPOOR et al., 2008). Diferentes métodos, substratos, hospedeiros e espécies de FMA vêm sendo testados para produção de inoculante micorrízico (Tabela 1).

Alguns inoculantes de FMA, tais como: Mycorise, Endorize, Endomycorrhizal inoculant, AgBio-Endos, Rhizanova, BuRize, Bioterra plus, Mycor, Mycogold, Myco V, AM 120, Terra Vita, dentre outros, vem sendo comercializados em outros países. Cozzolino et al. (2013) testaram, em campo, um inoculante comercial de FMA (AEGIS®), consistindo de uma mistura de argila calcinada contendo glomerosporos, hifas e fragmentos de raízes colonizadas por *Glomus intraradices*. Os autores observaram aumento no crescimento, produção e estoque de P para o milho em relação aos tratamentos sem e com adição de fertilizante fosfatado e mais do que os tratamentos com apenas FMA nativos. Entretanto, no Brasil ainda não é encontrado inoculante micorrízico arbuscular disponível no mercado, normalmente sendo este produzido para uso em trabalhos de pesquisa em universidades e empresas públicas.

Tabela 1. Métodos, hospedeiros, FMA e produção de inoculante micorrízico arbuscular.

Solo e/ou substratos	Hospedeiros	FMA	Produção	Referências
Solo + areia + Vermiculita + tampão Tris – HCl	<i>Panicum miliaceum</i>	<i>F. heterogama</i> <i>C. etunicatum</i>	3,7 esporos/g 152	Silva et al., (2005)
Areia + Vermiculita + tampão Tris – HCl	<i>Panicum miliaceum</i>	<i>A. longula</i> <i>G. albida</i> <i>C. etunicatum</i> <i>S. heterogama</i>	35 esporos/g 56 292 15	Silva et al., (2007)
Areia + solo + adição de quitina	<i>Allium ampeloprasum</i> <i>spp. porrum</i>	<i>C. clarioideum</i>	2011 esporos/planta	Gryndler et al., (2003)
Solo + areia	<i>Cymbopogon citratus</i>	<i>F. mosseae</i>	52 esporos/10g	Kaushish et al., (2011)
Solo + resto de folha			111	
Solo + esterco bovino			102	

Solo + vermiculita			73	
Solo + areia	<i>Allium cepa</i>		54	
Solo + resto de folha			103	
Solo + esterco bovino			103	
Solo + vermiculita			85	
Solo + areia	<i>Sesbania aculeata</i>		48	
Solo + resto de folha			96	
Solo + esterco bovino			95	
Solo + vermiculita			97	
Solo + folhas degradadas	<i>Zea mays</i>	Mix de <i>Glomus</i> , <i>Gigaspora</i> e <i>Scutellospora</i> spp.	75 esporos/g	Gaur; Adholeya (2002)
	<i>Medicago sativa</i>		77	
	<i>Trifolium alexandrinum</i>		58	
	<i>Avena sativa</i>		50	
	<i>Sorghum vulgare</i>		80	
Turfa + vermiculita + solo + esterco de galinha	<i>Sorghum bicolor</i>	<i>C. etunicatum</i>	70 esporos/cm ³	Zambolim et al., (1992)
Turfa + vermiculita			60	
Turfa + vermiculita + esterco de galinha			59	
Solo + solução nutritiva	<i>Paspalum notatum</i>	<i>A. longula</i>	>3000 esporos/cm ³	Douds; Schenck (1990)
		<i>G. margarita</i>	>70	
		<i>G. intraradices</i>	>40	
Solo + areia + vermiculita + argila + solução nutritiva	<i>Paspalum notatum</i>	<i>G. margarita</i>	>20 esporos/cm ³	Douds (1994)
“Inolite”+ fertilizante (VITAFEED-102)	<i>Pueraria javanica</i>	<i>A. delicata</i>	216 esporos/g	Setiadi (2002)
	<i>Paspalum notatum</i>	<i>A. delicata</i>	166	
Areia + fertilizante (VITAFEED-102)	<i>Sorghum</i> sp.	<i>G. manihotis</i>	81	
	<i>Pueraria javanica</i>	<i>A. tuberculata</i>	83	
Vermiculita + composto de folhas				
Vermiculita + composto de folhas	<i>Paspalum notatum</i>	<i>C. etunicatum</i>	372 esporos /50cm ³	Douds et al., (2006)
Vermiculita + composto + solução nutritiva		<i>C. etunicatum</i>	383	
Vermiculita + composto + proteína digestiva de peixe.		<i>C. etunicatum</i>	416	
		<i>F. mosseae</i>	342	
Composto de folha + vermiculita	<i>Paspalum notatum</i>	<i>F. mosseae</i>	525 esporos/50 cm ³	Douds et al., (2010)
		<i>C. claroideum</i>	946	
Composto de folha + perlita		<i>F. mosseae</i>	346	
		<i>C. claroideum</i>	452	
Composto de folha + turfa		<i>F. mosseae</i>	512	

		<i>G. intraradices</i>	650		
		<i>G. claroideum</i>	1220		
Solo + areia + FYM	<i>Daucus carota</i>	<i>G. intraradices</i> (exótico)	159	propágulos	Sharma; Adholeya (2011)
		<i>G. intraradices</i> (inóculo Mycorise)	148	infectivos/g	
In vitro	<i>Daucus carota</i>	<i>G. intraradices</i>	6680	esporos/100 ml de meio	Tiwari; Adholeya (2002)
		<i>Gi. Margarita</i>	750		
	<i>Solanum lycopersicon</i>	<i>G. intraradices</i>	893	esporos/40 ml de meio de cultura	Diop et al., (1994)
		<i>D. versiforme</i>	2065		
	<i>Daucus carota</i>	<i>D. reticulata</i>	42	esporos/placa de Petri	Declerck et al., (2004)
	<i>Daucus carota</i>	<i>C. etunicatum</i>	150		
	<i>Daucus carota</i>	<i>D. versiforme</i>	9500		Declerck et al., (1996)
Aeroponia	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>K. colombiana</i>	5082	esporos/g de raiz seca	Souza et al., (1996)
	<i>Manihot esculenta</i>	<i>K. colombiana</i>	3500		
	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>C. etunicatum</i>	177,6		Mergulhão (2001) Paiva et al., (2003)
	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Glomus</i> sp.	135.000		
	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Glomus</i> sp.	3738		Sylvia; Jarstfer (1992) Jarstfer et al., (1998)
	<i>Paspalum notatum</i>	<i>F. mosseae</i>	5		
		<i>G. intraradices</i>	8		Sylvia; Hubbel (1986)

Fonte: O autor, 2017.

2.3.1 Produção de inoculante em solo e outros substratos

A produção de inóculo de FMA em potes de cultura com solo ou com mistura de substratos é conhecida (ZAMBOLIM et al., 1992; GENTILI; JUMPPONEN, 2005). A técnica consiste na utilização de espécies vegetais micotróficas que são plantadas em potes contendo solo ou outro substrato esterilizado e permanecem por um período de mais ou menos três meses em casa de vegetação e, quando possível, em condições controladas de temperatura e umidade. Muitas vezes são aplicados materiais inorgânicos inertes como perlita, turfa e vermiculita para compor o substrato de cultivo (KAPOOR et al., 2008), o que favorece a aeração e a retenção de umidade.

Composição de substratos ou apenas solo para produção de inoculante de FMA, normalmente devem apresentar baixa quantidade de fósforo disponível, uma vez que altas

concentrações desse nutriente podem diminuir ou, até mesmo, inibir a colonização micorrízica (SILVA, 2008). O teor de nutrientes e a adição de macro e micronutrientes podem interferir na simbiose micorrízica arbuscular, atuando diretamente em relação ao fungo ou indiretamente em relação à planta (IJDO et al., 2011).

Fatores como pH do solo, temperatura, umidade, aeração, luz e radiação, íons inorgânicos, dormência e estocagem dos glomerosporos, dentre outros, podem afetar o processo de produção. Em relação às plantas, a sua influência sobre a fotossíntese e alocação de carbono para as raízes podem afetar indiretamente a colonização e a produção de glomerosporos do simbiote (IJDO et al., 2011).

Revisando os métodos de produção de inoculantes de FMA em larga escala, Ijdo et al. (2011) listaram como bons hospedeiros vegetais: cebola, alho poró (*Allium* spp.), milho (*Zea mays* L.) e grama batatais (*Paspalum notatum* Flugge). Sylvia (1994) e Gaur et al. (2007) também citaram alfafa (*Medicago sativa* L.), trigo (*Triticum* spp. L.) e sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] como bons hospedeiros. Essas plantas apresentam várias vantagens, como ciclo de vida curto, adequado desenvolvimento do sistema radicular, facilidade de serem colonizadas por diferentes espécies de FMA, tolerância a níveis relativamente baixos de fósforo, baixa suscetibilidade a patógenos e tolerância à variação de temperatura.

Segundo Siqueira et al. (1985), em geral espécies de *Gigaspora* e *Acaulospora* têm melhor desenvolvimento em pH ácido, enquanto espécies de *Glomus* preferem solo neutro a alcalino. Uma forma de estabilizar o pH do substrato, adequando-o para melhor desenvolvimento do fungo é a aplicação de tampão orgânico. Silva et al. (2005) verificaram estímulo na produção de esporos de FMA quando adicionaram tampão Tris-HCl ao substrato de cultivo, composto de solo + areia + vermiculita (2:1:1 v/v).

Diversas substâncias, como sacarose, glicose e formononetina podem ser aplicadas nos substratos de cultivo com o intuito de estimular a esporulação dos FMA (VILARIÑO; SAINZ, 1997; GRYNDLER et al., 2003; NOVAIS; SIQUEIRA, 2009). Nesse aspecto, a adição de quitina ao substrato de cultivo do fungo micorrízico contribuiu para maior produção de glomerosporos, aumento na colonização das raízes e no crescimento do micélio externo (GRYNDLER et al., 2003).

A aplicação do isoflavonóide formononetina ao substrato de cultivo estimulou em até 89% a esporulação de sete dos 13 isolados de FMA testados em associação com *Brachiaria decumbens* Stapf., sendo produzidos, em média, 2.666 por 50 ml de solo (NOVAIS; SIQUEIRA, 2009).

A utilização de adubos orgânicos ao meio de cultivo de produção de inóculo de FMA pode favorecer a produção de glomerosporos devido ao maior crescimento e extensão das hifas do micobionte (LABIDI et al., 2007). Kaushish et al. (2011) observaram que a quantidade de glomerosporos de *Funneliformis mosseae* foi maximizada quando o substrato de cultivo era composto por solo + resíduo vegetal à base de folhas ($111 \pm 0,81$ glomerosporos), seguido por solo + esterco bovino ($102 \pm 1,63$ glomerosporos); solo + vermiculita ($73 \pm 2,49$ glomerosporos); solo + areia ($52 \pm 2,05$ glomerosporos), todos na proporção 3:1 peso/peso e tendo como planta hospedeira o capim limão [*Cymbopogon densiflorus* (Steud) Stapf.].

Cultivo em substratos livres de solo evita a presença de organismos prejudiciais e permite o controle sobre muitas características físicas e químicas do meio de crescimento (JARSTFER; SYLVIA, 1992). Além disso, o substrato pode ter composição mais uniforme, menor peso e fornecer melhor aeração do que o meio de crescimento contendo solo (SYLVIA, 1994). Setiadi (2002) relatou o efeito de alguns substratos, sem solo, na produção de glomerosporos. O autor observou a produção de 81 e 83 glomerosporos por grama de substrato de *Glomus manihotis* e *Acaulospora tuberculata* Janus; Trappe, respectivamente, em potes de cultivo contendo apenas areia lavada pasteurizada, suplementada com fertilizante líquido (VITAFEED-102) e associação com sorgo e kudzu [*Pueraria montana* var. *lobata* (Willd.) Maesen; S. Almeida].

Para sucesso na produção de inoculante uma etapa importante é a montagem dos potes de cultura, uma vez que o risco de contaminação é grande, pois os FMA podem ser carreados de diversas formas no ambiente. O local deve ser limpo, organizado, sem presença de insetos, aves ou outros animais, e o responsável pela montagem não deve utilizar utensílios contaminados com outros fungos. Após produção do inoculante, este deve estar completamente seco, para armazenamento em sacos plásticos selados e identificados com os nomes das espécies (INVAM, 2001).

Inoculante micorrízico arbuscular pode ser armazenado em temperatura ambiente ou em geladeira (4°C) sem perder a infectividade e a efetividade (Silva 2006). A produção de

inoculante de *C. etunicatum*, *Gigaspora albida* Schenck; Smith, *F. heterogama* e *Acaulospora longula* Spain ; Schenck em associação com painço (*Panicum miliaceum* L.) foi aumentada com a adição de tampão Tris-HCl (SILVA et al., 2007). Os autores também relataram que o armazenamento em refrigerador (4 °C) contribuiu para manutenção da viabilidade (4 meses) mais do que a estocagem em temperatura ambiente (± 28 °C).

A produção em massa de inoculante micorrízico também vem sendo realizada em campo. Douds Jr. et al. (2006) desenvolveram um novo método de produção de inoculante para climas temperados reduzindo a aplicação de insumos químicos sintéticos e eliminando o processo de fumigação do substrato. Os autores utilizaram mudas de grama batatais (*Paspalum notatum*), pré-colonizadas por vários isolados de FMA (*F. mosseae*, *C. etunicatum*, *C. claroideum*, *Glomus intraradices* e *Gigaspora gigantea*) que foram cultivadas ao ar livre, em canteiros. Proporções de solo + vermiculita e composto orgânico (esterco de gado e folhas) + vermiculita foram testados verificando-se que as proporções de 1:99 e 1:4 de composto + vermiculita propiciaram elevada quantidade de propágulos ($4,7 \times 10^6$ e $56,7 \times 10^6$ propágulos/ cm^3 , respectivamente) por volume dos canteiros, sendo o maior número de propágulos produzidos por *F. mosseae* (108×10^6 propágulos/ cm^3). Douds Jr. et al., (2007) mostraram que a aplicação deste inoculante, produzido em 2006, proporcionou aumento na produção de tubérculos de batata em experimento no campo.

Em 2010, os mesmos autores deram continuidade ao trabalho, utilizando mudas de *Paspalum notatum* mantidas em casa de vegetação durante três meses, em substrato formado por solo + areia + vermiculita + turfa esterilizados (1:0.75:1:0.75 v/v). Após esse período, as mudas foram transplantadas para canteiros contendo a mistura de composto (gramíneas e folhas) + vermiculita. Diferentemente do trabalho realizado em 2006, foram adicionadas diluições de solo de campo, coletado em área de sistema orgânico, ao substrato à base de composto (folhas + adubo orgânico) + vermiculita, o que propiciou aumento na propagação de FMA nativos (*F. mosseae*, *C. claroideum*, *G. intraradices* e *Glomus* sp.), com produção de 465 propágulos de FMA por cm^3 de substrato, e média total de 132 ± 26 glomerosporos por 50 cm^3 de solo.

Esse sistema de produção de inoculante pode ser alternativa para otimizar o fornecimento de biofertilizantes para produtores agrícolas, diminuindo a utilização de fertilizantes fosfatados que são, normalmente, mais onerosos. Entretanto, problemas como o fornecimento de mudas já colonizadas por outros fungos micorrízicos, a presença de patógenos radiculares, substratos ricos

em nutrientes, sobretudo fósforo, que podem inibir a atuação do simbiote, minerais como vermiculita, que por vezes estão contaminados, para composição do substrato e outros fatores devem ser considerados antes da instalação do sistema.

2.3.2 Produção de inoculante *In vitro*

Para ser de qualidade o inoculante deve possuir as seguintes características: ser infectivo, ou seja, capaz de colonizar o hospedeiro; ser efetivo, trazendo benefícios para o hospedeiro, aumentando o crescimento e/ou proporcionando tolerância a estresses bióticos e abióticos; ser concentrado, para facilitar o estoque, o transporte e a aplicação; ser livre de patógenos; e apresentar longa viabilidade (JARSTFER; SYLVIA, 1992). Diante dessas características, a produção de propágulos de FMA *in vitro* pode ser alternativa para fornecer inoculante de qualidade, uma vez que a técnica requer controle intenso para evitar contaminação e elevada produção de micélio extra-radicular e glomerosporos (DECLERCK et al., 2004; IJDO et al., 2011). O sistema de cultivo *in vitro*, a partir de raízes transformadas por bactérias, pode ser uma ferramenta importante para avanços no conhecimento em diversas áreas como ecologia, biologia celular, fisiologia e biologia molecular, principalmente devido ao fato do método produzir grande quantidade de inóculo livre de impurezas (DE SOUZA et al., 2008).

O método de cultivo *in vitro* consiste na produção de inoculante de FMA em cultura de raízes orgânicas (ROC) em placas de Petri contendo meios de cultivo específicos, compostos por macro e micronutrientes, além de vitaminas e sacarose. São geralmente incubados glomerosporos, esporocarpos ou fragmentos de raízes micorrizadas para a produção do inoculante (TIWARI; ADHOLEYA, 2002; KAPOOR et al., 2008; IJDO et al., 2011). Declerck et al. (2004) observaram germinação de glomerosporos de *Fuscutata heterogama* incubados em meio específico com raízes de *Daucus carota* L. transformadas por bactérias, após período de 7 a 10 dias. O número de glomerosporos teve crescimento exponencial a partir da 14ª semana até a 28ª, sendo de $4,3 \pm 3,4$ glomerosporos produzidos por semana em cada placa de Petri. O pico máximo da produção foi observado da 29ª semana até a 34ª semana, com média de 42 ± 37 glomerosporos de *F. heterogama* formados por placa de Petri.

Declerck et al. (2002) testaram, em casa de vegetação, a resposta de crescimento de mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* spp. c.v. Grand Naine) que receberam inóculo de

FMA produzido *in vitro*. Os autores inocularam 400 glomerosporos de *G. intraradices* oriundos de cultura monoaxênica a partir de fragmentos de raízes colonizadas pelo FMA com raízes transformadas de cenoura (*Daucus carota* L.), obtendo maior conteúdo de fósforo e incremento no peso seco da parte subterrânea e aérea das mudas.

Pawlowska et al. (1999) também haviam obtidos resultados satisfatórios na produção *in vitro* de inoculante de *G. intraradices*. com raízes transformadas de cenoura. Duas semanas após a incubação, os autores observaram formação de novos glomerosporos de *G. intraradices* sem qualquer tipo de contaminação e com 12 semanas a densidade média produzida foi de aproximadamente 150 glomerosporos por placa.

Essa metodologia torna-se importante pela alta produção de glomerosporos limpos, sem qualquer patógeno e com grande potencial para desenvolvimento em escala industrial. Entretanto, exige elevado investimento tecnológico, altos custos e nem todas as espécies de FMA são estabelecidas com sucesso nesse sistema (IJDO et al., 2011). Herrmann e Lesueur (2013) relataram em seu artigo de revisão, que o custo para utilização de inoculante produzido *in vitro* seria, aproximadamente, o mesmo da quantidade de fertilizante fosfatado a ser utilizado, tornado-se uma limitação para os agricultores, pois não adotariam um inoculante caro, se existe uma forma mais barata de conseguir uma resposta de crescimento equivalente. Além disso, os isolados produzidos podem ser menos competitivos do que os multiplicados em solo (GIANINAZZI; VOSÁTKA, 2004).

2.3.3 Produção de inoculante livre de substrato

Métodos como hidroponia (HAWKINS; GEORGE, 1997) e aeroponia (SYLVIA; HUBBELL, 1986) também foram testados para produção de inoculante de FMA. As plantas são inoculadas previamente em substrato, que pode ser composto por solo ou areia e vermiculita, e após a colonização ser detectada, são transferidas para os sistemas de produção, onde recebem solução nutritiva com baixa concentração de fósforo e pH ajustado (JARSTFER; SYLVIA 1992). Segundo Sylvia (1994), cultivo livre de solo ou inoculante produzido em sistemas hidropônico e aeropônico devem ser usados por razões de saneamento, logística e custos.

A produção de inoculante no sistema aeropônico tem se mostrado uma tecnologia eficaz, com produção de elevada quantidade de propágulos (SYLVIA; HUBBELL, 1986; HUNG;

SYLVIA, 1988). Inóculos de *S. deserticola*, *C. etunicatum* e *Glomus clarum* produzidos em sistema aeropônico, em associação com *P. notatum* e *I. batatas* apresentaram abundante formação de arbúsculos e vesículas nas raízes das plantas (HUNG; SYLVIA, 1988). Em relação à esporulação, este diferiu entre os isolados e os autores justificaram essa diferença de produção de glomerosporos entre as espécies de FMA a fatores como grau de colonização das plantas antes da transferência para o sistema aeropônico e diferenças de respostas às novas condições ambientais impostas.

Os principais aspectos positivos da produção de inoculantes micorrízicos arbusculares em aeroponia são o fato de o inóculo ser livre de patógenos e a grande quantidade de glomerosporos produzidos (MOHAMMAD et al., 2000). Mergulhão (2001) mencionou a produção de 3.500 glomerosporos de *Kuklospora colombiana* (Spain; Schenck) Oehl e Sieverd. por planta de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), aos 105 dias, em sistema aeropônico. A mesma espécie de FMA associada à batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam), produziu respectivamente 5.082 e 156.336 glomerosporos por grama de raiz seca aos 70 e 98 dias de cultivo em aeroponia (SOUZA et al., 1996). Paiva et al. (2003) observaram que a produção de glomerosporos de *Glomus clarum* Nicol. e Schenck e *C. etunicatum*, no mesmo sistema, decresceu com o tempo, sendo maior aos 90 dias, que aos 120 dias (médias de 1290 glomerosporos e 290 glomerosporos em 100 gramas de raízes úmidas, respectivamente).

Espécies de FMA (*F. mosseae*, *G. intraradices*, *C. etunicatum*, dentre outros) vêm sendo produzidos com sucesso em sistema aeropônico, tendo como principais plantas hospedeiras a grama batatais (*Paspalum notatum*) e a batata doce (*Ipomoea batatas*) (JARSTFER; SYLVIA, 1992). Martin-Laurent et al. (1999) constataram que após quatro meses de cultivo de *Acacia mangium* em sistema aeropônico as mudas micorrizadas com espécies de *Glomus* presentes em um inóculo comercial (Endorize), produzido pela empresa AGRON (Agrochemicals Development and Marketing Ltd.), em Israel, apresentaram aumento no peso seco da parte aérea e radicular, maior área foliar e maior crescimento do que as estabelecidas em potes com solo.

Além de inóculos infectivos, efetivos e de baixo custo, também devem ser identificados carreadores adequados que facilitem o transporte, e propiciem a manutenção da viabilidade do inoculante por longo tempo. O encapsulamento de propágulos de FMA (glomerosporos) em alginato de sódio pode ser uma alternativa viável para aperfeiçoar o fornecimento de inoculante

micorrízico arbuscular no mercado, uma vez que as cápsulas apresentam-se livre de patógenos (JAIZME-VEJA et al., 2003) e podem permanecer com o material viável por muito tempo (PLENCHETTE; STRULLU, 2003).

Sylvia e Jarstfer (1992) encapsularam com carragenina raízes micorrizadas de *Ipomoea batatas*, produzidas em sistema aeropônico, contendo propágulos de *Glomus*; cada pellet produzido continha 1,2 propágulos (inóculo desinfestado) e 0,5 (inóculo não desinfestado).

Utilizando a batata (*Solanum tuberosum* L., var. Bintje) como planta hospedeira inoculada com esporos de *Glomus* sp. encapsulados em alginato, De Jaeger et al. (2011) observaram aumento na colonização de raízes com o passar do tempo do experimento, chegando a apresentar 30% de colonização micorrízica em 20 semanas. O padrão também foi seguido para a quantidade de glomerosporos: mais de 6000 glomerosporos foram quantificados a partir da vigésima semana de inoculação.

Sistemas de produção de inoculante micorrízico arbuscular livres de substrato, como a aeroponia, devem ser levados em consideração, pois produzem grande quantidade de propágulos, principalmente de glomerosporos, que são as estruturas dos FMA mais utilizadas para inoculação em mudas nos trabalhos de pesquisa. Assim, investimentos em substratos de armazenamento para manutenção da viabilidade do inoculante produzido dessa forma devem ser testados para obtenção de inoculante capaz de manter-se infectivo com o passar do tempo e poder ser comercializado.

3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

3.1 PRODUÇÃO, ESTOCAGEM E CUSTOS DE INÓCULO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)

3.1.1 Coleta do solo e local de execução dos experimentos

O solo usado no experimento, do tipo Latossolo Amarelo Distrófico Argissólico, foi coletado em Goiana, Pernambuco (07°38'20''S, 34°57'10''W, 13 metros de altitude), na profundidade de 0-30 cm. Parte das amostras foi encaminhada para análise de fertilidade no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), apresentando as seguintes características: pH = 5,4; P = 4mg dm⁻³; K = 0,04, Ca = 0,7, Mg = 0,5, Na = 0,02, Al = 0,7 e CTC = 7,3 cmolc dm⁻³. A

análise física foi realizada na Universidade Federal Rural de Pernambuco (DS = 1,60, DP = 2,53 e PT = 36,71 g/cm³) e o solo classificado como de textura areia-franca.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação e no Laboratório de Micorrizas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

3.1.2 Produção de inoculante em sistema aeropônico

Ramas de batata doce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] obtidas do Banco de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) foram lavadas e colocadas para enraizamento em recipientes contendo água. Depois de enraizadas, as ramas foram distribuídas em seis vasos/tratamento contendo substrato composto por solo + areia (3:1) esterilizados, e inoculadas (solo-inóculo contendo 200 glomerosporos), separadamente, com isolados de *Claroideoglomus etunicatum* (Becker ; Gerd.) Walker e Schüßler URM FMA 03 ou *Glomus clarum* Nicol. e Schenck URM FMA 08, fornecidos pelo Laboratório de Micorrizas/ UFPE.

Após 90 dias em casa de vegetação retirou-se, de cada um dos vasos, 0,5 g das raízes para determinação da colonização micorrízica e 20 g de substrato para avaliação do número de glomerosporos. As raízes foram lavadas, diafanizadas com KOH (10%) e coradas com 0,05% Azul-de-Tripano (PHILLIPS; HAYMAN, 1970). Foi utilizada a técnica de interseção dos quadrantes (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980) para determinação do percentual de colonização. Os glomerosporos foram extraídos pelas técnicas da decantação e peneiramento úmido seguidos de centrifugação em água e sacarose 40% (GERDEMANN; NICOLSON, 1963; JENKINS, 1964) e quantificados em estereomicroscópio (40x).

As plantas micorrizadas foram transferidas para câmaras aeropônicas montadas em caixas d'água, contendo 200 L de água destilada e 1 L de solução nutritiva de Hoagland modificada com a seguinte composição química: KH₂PO₄, 0,01M; KNO₃, 1M ; NaFeEDTA, 1M; Ca(NO₃)₂, 1M; NaCl, 0,1M; MgSO₄, 1M; H₃BO₃, 50 mM; MnCl₂.4H₂O, 1 mM; ZnSO₄.5H₂O, 0,7 mM; CuSO₄.5H₂O, 3 mM; e Na₂MoO₄.2H₂O, 0,07 mM (JARSTFER; SYLVIA 1992). Com auxílio de um conjunto de microaspersores, as plantas receberam solução nutritiva por pulverização em ciclos contínuos de um minuto de aspersão, e três minutos sem aspersão, o que permitiu atmosfera arejada para o sistema radicular suspenso. Diariamente, o pH foi aferido e ajustado para 6,0 utilizando-se soluções de HCl (1%) ou NaOH (0,1 N). Associado ao sistema foi

instalada uma fonte luminosa (GRO-LUX F-30T12), a 70 cm de altura das plantas, acesa à noite para manter as plantas iluminadas constantemente e estimular a multiplicação dos FMA.

Os valores de temperatura e umidade relativa do ar foram registrados com auxílio de um termohigrômetro, com temperatura mínima de 23,5°C e máxima de 32,6°C e média de umidade relativa de 79%.

O experimento foi analisado em delineamento inteiramente casualizado para cada FMA (*Claroideoglomus etunicatum* e *Glomus clarum*), considerando três períodos de avaliação (T1 = 45, T2 = 90 e T3 = 120), em seis repetições.

Amostras das raízes foram retiradas 45, 90 e 120 dias após o transplântio para o sistema aeropônico para estimativa de produção de glomerosporos e da colonização micorrízica. A esporulação foi avaliada a partir de 20 g de raízes que foram lavadas cuidadosamente para liberação dos glomerosporos aderidos, que foram recolhidos em peneiras de 45 µm de abertura, transferidos para placa canaletada e contados em microscópio estereoscópico (40 x). A colonização micorrízica das raízes foi avaliada como descrito.

3.1.3 Potencial infectivo do inoculante produzido em sistema aeropônico

As raízes produzidas foram secas e pesadas. Um grama de raiz, cortada em pequenos fragmentos, foi acondicionado em sacos plásticos contendo 500 mL de um dos seguintes substratos: a) areia; b) areia + vermiculita fina (1:1 v/v); c) areia + argila expandida (1:1 v/v). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três substratos de armazenamento (a, b e c) x 2 temperaturas de estocagem (ambiente = 28 ° C e refrigeração = 4 ° C), com cinco repetições. As avaliações foram realizadas para cada fungo e período de armazenamento (3, 6 e 10 meses), separadamente.

Testes de infectividade do inoculante foram feitos nos tempos zero (antes da estocagem) e após três, seis e 10 meses de estocagem. Para estes testes foi utilizado o método da percentagem média de infecção (MIP) (<http://invam.caf.wvu.edu/Myc-info/Methods/Assays/Mip.htm> 2001), usando milho (*Zea mays* L.) como hospedeiro. A diluição foi de 1:10 (inoculante : substrato v/v) e como diluente foi utilizado o mesmo solo que serviu para micorrização inicial das plantas de batata. Após 30 dias em casa de vegetação, 0,5 g de raízes de milho foram coletadas, lavadas, coradas, e avaliadas quanto à percentagem de

colonização micorrízica pelo método de interseção de quadrantes (GIOVANETTI; MOSSE, 1980). O inoculante foi considerado infectivo, quando a colonização foi igual ou maior que 25% (INVAM, 2001).

Análise estatística: os dados de número de glomerosporos foram transformados em $\log(x+1)$ e a porcentagem de colonização micorrízica em arco seno $\sqrt{x/100}$. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A porcentagem de colonização das raízes no sistema aeropônico (45, 90 e 120 dias) em relação à produção total em vasos contendo solo e areia (90 dias) foi testada pelo teste t para amostras independentes, utilizando o software Statistica (STATSOFT, 1997).

3.1.4 Custos de produção do inoculante

Os preços de aquisição dos equipamentos e materiais usados para a instalação do sistema aeropônico e conservação dos inoculantes foram contabilizados, bem como as despesas correntes para a produção do inóculos e a sua conservação. Para calcular o custo do investimento na instalação do sistema aeropônico, para uma batela (120 dias) de produção, o sistema foi considerado com uma duração de cinco anos com duas batelas produzidas a cada ano, ao passo que o custo do refrigerador utilizado para manter os inoculantes foi amortizado em 10 anos. Para calcular o custo de inoculação de uma muda, o gasto total foi dividido pelo número de doses viáveis obtidas após o período de incubação. Cada dose foi equivalente a 200 glomerosporos viáveis, usados para inocular uma muda (CAVALCANTE et al., 2001a).

3.2 PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA DE INÓCULO DE FMA EM CLIMAS TROPICAL ÚMIDO E SEMIÁRIDO

3.2.1 Montagem dos Experimentos

Dois experimentos, com dois ciclos cada, foram conduzidos, simultaneamente, em Recife (8°04'03''S e 34°55'00''W) e Petrolina (09°23'34''S e 40°30'28''W), Pernambuco, em canteiros localizados em áreas externas do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do Campus de Ciências Agrárias da Universidade do Vale do São Francisco (UNIVASF), respectivamente. No primeiro ciclo (dezembro/2011 a março/2012), as precipitações acumuladas foram 501,9 mm, em Recife, e 146,3 mm, em Petrolina; no segundo

ciclo (abril a julho de 2012) a precipitação alcançou 475,8 mm em Recife e 14,3 mm em Petrolina. As temperaturas mínimas e máximas registradas no primeiro ciclo foram, respectivamente, 22 °C e 33 °C, em Recife, e 19,4 °C e 37,4 °C em Petrolina, e no segundo ciclo, 19,5 °C e 33 °C, em Recife, e 16,6 °C e 36,9 °C, em Petrolina.

Cada experimento foi composto pelo cultivo de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), em delineamento inteiramente casualizado e arranjo fatorial de 2 x 4, com quatro repetições, correspondendo a dois tratamentos de inoculação, com *Acaulospora longula* Spain ; Schenck (URM FMA 07) ou *Claroideoglomus etunicatum* (Becker; Gerd.) Walker e Schüßler (UNIVASF 06A), e quatro substratos de cultivo: T1) 60% de areia, 40% de argila expandida; T2) 60% de areia, 35% de argila expandida e 5% de bagaço de cana; T3) 60% de areia, 35% de argila expandida e 5% de leucena; e T4) 60% de areia, 35% de argila expandida, 2,5% de bagaço de cana e 2,5% de leucena. A areia tinha textura grossa e foi peneirada para retirada de detritos, lavada até apresentar-se visualmente livre de impurezas, seca e desinfestada em estufa a 110 °C, durante 24 h; a argila expandida tinha partículas de 3 a 5 mm; o bagaço de cana triturado veio do processamento industrial da cana; e a leucena era composta de ramos de *Leucaena leucocephala* Lam. triturados até pequenos fragmentos. A análise dos substratos foi realizada na Embrapa Semiárido (Tabela 2).

Os experimentos foram instalados em canteiros de alvenaria, com 10 m de comprimento, 1 m de largura e 0,4 m de altura, divididos em 32 parcelas, separadas com divisórias de isopor e forradas com lona preta para manter a individualidade dos tratamentos. As parcelas, com 50 cm × 48,5 cm × 30 cm foram preenchidas com 70 L de substrato.

Seis sementes de sorgo foram semeadas em potes plásticos com 100 ml de areia esterilizada, inoculadas com 50 glomerosporos, mantidas em casa de vegetação e regadas diariamente; após 21 dias a colonização micorrízica foi comprovada pela observação, ao microscópio, de estruturas nas raízes diafanizadas e coradas (PHILLIPS; HAYMAN 1970). Antes da transferência das plântulas para o canteiro de alvenaria. Cada parcela recebeu 36 plântulas de sorgo pré-colonizadas por FMA.

O inóculo foi produzido em potes de argila (6 L) com mistura solo + areia (3:1) e painço (*Panicum miliacium* L.) como hospedeiro, durante três meses. Glomerosporos foram separados do substrato pelo método de peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e

centrifugação em água e sacarose (JENKINS, 1964) e contados, com auxílio de estereomicroscópio (40×), sendo utilizados como inóculo.

Tabela 2. Análise química dos substratos utilizados para produção dos inoculantes

	M.O.	pH (H ₂ O)	C.E.	P	K	Ca	Mg	Na	Al	H+Al	S (bases)	CTC	V
	-g/kg-	-1:2,5-	dS/m-	-mg/dm ³ -	-----cmolc/dm ³ -----								%
T1	0,20	8,1	0,69	4,45	0,03	0,75	0,10	0,58	0,00	0,82	1,46	2,28	64
T2	0,30	7,9	0,36	9,69	0,04	1,40	0,30	0,45	0,00	0,82	2,19	3,01	73
T3	1,91	6,9	0,84	14,94	0,25	0,65	0,25	0,47	0,05	1,48	1,62	3,10	52
T4	1,51	6,8	1,20	14,71	0,23	1,50	0,20	0,52	0,05	1,48	2,45	3,93	62

T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25). Fonte: O autor.

Regas foram realizadas diariamente no experimento realizado no semiárido e quando necessário no experimento do Recife. Ao final do ciclo, as plantas foram cortadas para avaliação da biomassa seca da parte aérea e amostras dos substratos foram retiradas para avaliação da colonização micorrízica, número de glomerosporos e percentagem média infectiva (MIP) do inoculante produzido. O número de glomerosporos foi quantificado conforme descrito. Para análise de colonização micorrízica 0,5 g de raízes (de cada tratamento) foram lavadas, diafanizadas e coradas, como mencionado, e avaliados utilizando o método de interseção de quadrantes (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980). Para avaliação do MIP foi utilizado o método descrito pelo INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/Myc-info/Methods/Assays/Mip.htm> 2001).

O delineamento foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 2 (inoculado com *A. longula* ou *C. etunicatum*) x 4 (substratos de cultivo: T1, T2, T3 e T4), com quatro repetições, para cada local. O número de glomerosporos foi transformado em $\log(x + 1)$ e a percentagem de colonização micorrízica em $\arcseno \sqrt{x/100}$. Os dados foram submetidos à análise de variância

e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando-se o programa Statistica (STATSOFT 1997).

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO, ESTOCAGEM E CUSTOS DE INÓCULO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES (FMA)

4.1.1 Produção do inoculante em diferentes sistemas

As concentrações de glomerosporos de *C. etunicatum* e *G. clarum* nas raízes após 45 dias de crescimento das plantas no sistema aeropônico foram maiores do que as concentrações no solo, no final do período de 90 dias de cultivo em vasos com solo + areia. Períodos mais longos de crescimento no sistema aeropônico (90 e 120 dias) não aumentaram, significativamente, as concentrações dos glomerosporos (Tabela 3).

Colonização das raízes por *C. etunicatum* após 45 dias no sistema aeropônico não diferiu da colonização no sistema solo + areia, mas foi significativamente inferior à colonização após 90 e 120 dias no sistema aeropônico. De modo oposto, a colonização por *G. clarum* no sistema solo + areia foi maior do que a encontrada nos três períodos de avaliação na aeroponia, os quais não diferiram significativamente entre si (Tabela 3).

Tabela 3. Produção de glomerosporos e colonização micorrízica em plantas de batata doce crescidas, inicialmente em sistema solo + areia, por 90 dias, e depois em aeroponia por 45, 90 e 120 dias

	Número de glomerosporos	Colonização (%)
<i>Claroideoglomus etunicatum</i>		
Solo + areia	11 g ⁻¹ solo*	34.6 b
Aeroponia x 45 dias	3.317 g ⁻¹ raíz A	28.7 Bb
Aeroponia x 90 dias	4.600 g ⁻¹ raíz A	54.8 Aa
Aeroponia x 120 dias	5.380 g ⁻¹ raíz A	49.2 Aa
<i>Glomus clarum</i>		
Solo + areia	3 g ⁻¹ solo*	68.2 a

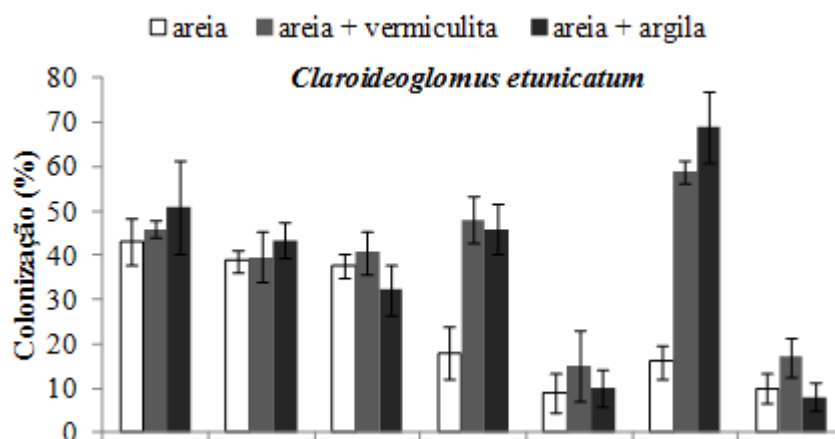
Aeroponia x 45 dias	719 g ⁻¹ raiz A	36.4 Ab
Aeroponia x 90 dias	1.184 g ⁻¹ raiz A	46.0 Ab
Aeroponia x 120 dias	1.661 g ⁻¹ raiz A	43.6 Ab

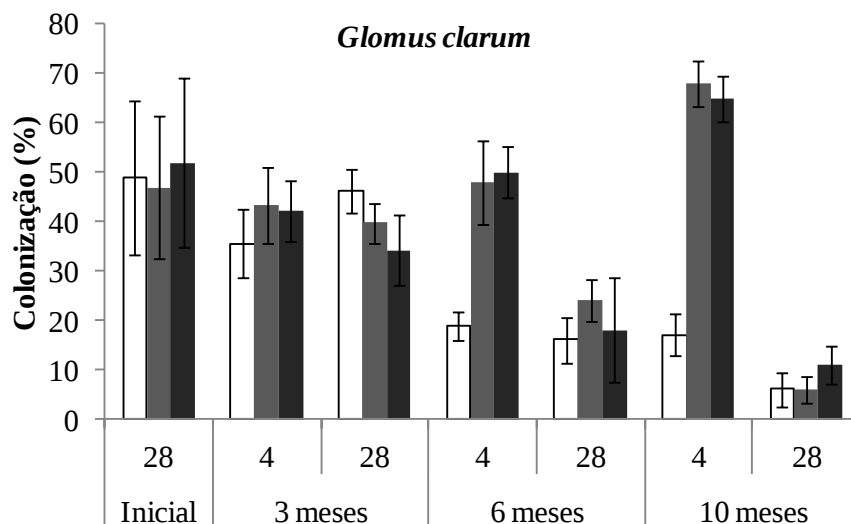
*Número de glomerosporos aos 90 dias em vasos com solo e areia; não comparado com os valores da aeroponia. Letras maiúsculas na coluna comparam as médias para os três períodos de avaliação no sistema aeropônico, para cada espécie de FMA, e letras iguais não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras minúsculas comparam colonização na aeroponia com o cultivo em solo + areia, pelo t-test ($p < 0,05$) para amostras independentes. Fonte: O autor.

4.1.2 Armazenamento e estocagem do inoculante

Considerando os três meses de estocagem em temperatura ambiente, a infectividade do inoculante de *C. etunicatum* armazenado em areia e de *C. etunicatum* e *G. clarum* em areia + argila foi inferior a infectividade inicial (tempo zero, antes da estocagem), raízes recentemente colhidas a partir do término de produção do inoculante no sistema aeropônico. Os inoculantes estocados a 4 °C, mantiveram sua viabilidade semelhante a inicial (Figura 1). Apesar da redução, em relação ao tempo zero, da infectividade a 28 °C, os inoculantes ainda foram considerados infectivos, uma vez que apresentaram colonização micorrízica acima de 25% (INVAM-<http://invam.caf.wvu.edu/Myc-info/Methods/Assays/Mip.htm> 2001).

Figura 1. Porcentagem média infectiva (MIP) de *Claroideoglomus etunicatum* e *Glomus clarum*, produzidos em sistema aeropônico (inicial), e estocados por diferentes períodos em três substratos, em 4 e 28 °C ($\pm$ desvio padrão).





Fonte: O autor, 2017.

A estocagem durante seis meses, de ambos os fungos em areia, nas duas temperaturas, e em todos os outros substratos, à temperatura ambiente, resultou em uma colonização micorrízica abaixo de 17%, sendo, por conseguinte, considerado ineficaz (Figura 1). Por outro lado, a estocagem em 4 °C em areia + vermiculita ou areia + argila expandida preservou a viabilidade depois dos seis meses e ainda durante 10 meses, com infectividade acima de 59% (Figura 1).

4.1.3 Custos de produção do inoculante

O custo de amortização do sistema aeropônico foi de R\$ 132,00 por batela, incluindo tanques (2), bomba de água, temporizador e trabalho para a instalação do sistema. O custo de amortização da refrigerador foi de R\$ 100,00 por batela. Os custos de produção de cada batela, incluindo aluguel do espaço, energia elétrica, solução nutritiva e da mão de obra foram de R\$ 1.734,00.

A média de produção do sistema em uma caixa de aeroponia, contendo 20 plantas foi de 80 g de raízes secas. Este material, contendo 5380 glomerosporos de *C. etunicatum* ou 1661 de *G. clarum* para cada 1 g de raiz seca foi misturado em 500 g de substrato, produzindo um total de 40 kg de substrato para cada FMA. Para inoculação de uma muda com os 200 glomerosporos recomendados (CAVALCANTE et al., 2001a), 18,6 e 60,2 g de substrato seriam necessários para os inóculos de *C. etunicatum* e *G. clarum*, e os 40 kg de substrato são suficientes para

inocular 2000 e 640 potes de mudas, respectivamente. Dividindo-se o gasto de produção de uma batela (R\$ 1.966,00) por esses números de potes, os custos da inoculação por muda seriam de R\$ 0,98 para *C. etunicatum* e R\$ 3,07 para *G. clarum*.

Concentrações mais elevadas de glomerosporos são características da produção de inoculante em sistema aeropônico, quando comparado aos sistemas em vasos de cultura contendo solo (SYLVIA, 1994), pois o sistema radicular das plantas no solo é uma pequena fração do substrato total e os glomerosporos produzidos nas raízes são diluídos na grande massa total do solo. O número absoluto de glomerosporos também pode ser maior devido ao melhor controle sobre o sistema, com baixa concentração de fósforo na solução nutritiva e com o controle diário do pH, mantendo as condições ideais para o melhor estabelecimento da simbiose FMA - planta (JARSTFER; SYLVIA, 1992). Mergulhão (2001) também encontrou alta concentração de esporos de FMA, obtendo 3.500 glomerosporos de *Kuklospora colombiana* (Spain; Schenck) Oehl e Sieverd. em 1,8 g de raízes de mandioca, depois de 105 dias de cultivo das plantas em sistema aeropônico. Obter a maior concentração possível de glomerosporos é uma vantagem na produção de inoculante, pois a inoculação pode ser feita com menos material, enquanto se mantém o mesmo número de glomerosporos (FELDMANN et al., 2009).

Aumento da esporulação com o passar do tempo tem sido demonstrado na maioria dos trabalhos que envolvem a produção de inoculante em sistemas aeropônicos (HUNG; SYLVIA, 1988; SYLVIA; JARSTFER, 1994; JARSTFER et al., 1998). Jarstfer et al. (1998) relataram um aumento na esporulação de *Glomus* sp., o que representou, em média, 3.738 glomerosporos por planta de batata doce, depois de 91 dias de manutenção em um sistema aeropônico. Alta esporulação na aeroponia tem sido atribuída à facilidade de acompanhamento e à relativa ausência de micro-organismos, tais como bactérias e hiperparasitas que podem afetar a produção dos glomerosporos (SYLVIA; JARSTFER, 1994).

Em oposto ao encontrado no presente trabalho, Paiva et al. (2003) observaram um declínio acentuado na esporulação do mesmo micobionte: de 1.290 glomerosporos por 100 g de raízes úmidas em 90 dias, para apenas 297 glomerosporos em 120 dias. Isto ocorreu possivelmente devido às altas temperaturas mantidas durante o período do experimento, com o máximo de 35,9 °C e o mínimo de 27,2 °C, ambas acima do encontrado no presente trabalho

(máxima de 32,6 °C e mínima de 23,5 °C). Temperaturas elevadas podem causar estresse para a planta hospedeira, afetando diretamente a simbiose micorrízica.

Em sistemas de produção isentos de substratos, tais como sistemas aeropônicos, as plantas são pré-colonizadas, antes de serem introduzidas no sistema. No entanto, com a transferência para o sistema aerônico, aos 45 dias ocorreu redução da colonização produzida por *C. etunicatum*, seguida por aumento posterior (90 dias), o que pode ter sido causado pelo estresse que envolve a mudança das plantas dos vasos de cultivo para outro sistema, com os simbiontes necessitando de um período de tempo para adaptação. Outros estudos também relatam esta redução temporária da colonização micorrízica (MERGULHÃO, 2001; PAIVA et al., 2003; LIMA, 2004).

Embora não haja nenhuma especificidade na simbiose micorriza arbuscular, há alguma compatibilidade funcional entre os isolados de FMA e a planta hospedeira (LONG et al., 2010). Paiva et al. (2003) registrou colonização micorrízica superior a 70% em plantas cultivadas em solo com *G. clarum*, o mesmo micobionte utilizado neste trabalho. Martin-Laurent et al. (1999) observaram em raízes de *Acacia mangium* Willd: 60% de colonização micorrízica por *Glomus* sp. no sistema aerônico em comparação a 30% em plantas cultivadas no solo. Altas proporções de colonização micorrízica (80% e 82%, respectivamente) em raízes de batata-doce micorrizadas com *Gigaspora margarita* Becker e Hall e *K. colombiana* em substrato composto de solo + vermiculita (3:1 v / v) foram registrados por Souza et al. (1996).

Altas taxas de colonização micorrízica podem ser estabelecidas nos sistemas aeropônicos, que juntamente com alta produção de glomerosporos contribuem para o fornecimento de inoculante concentrado e puro, sendo esse um dos principais fatores relacionados à qualidade do inoculante (FELDMANN et al., 2009).

A manutenção da viabilidade dos inoculantes produzidos ao longo dos 10 meses de estocagem, em substratos de armazenamento contendo argila expandida e vermiculita foi mais eficaz do que o substrato contendo apenas areia, o que indica que maior aeração dos substratos para estocagem proporciona um ambiente mais adequado. Argila e vermiculita também podem aumentar a capacidade de retenção de água, o que pode ter contribuído para a germinação dos

glomerosporos e desenvolvimento dos fungos a partir de outros propágulos, favorecendo a colonização do milho nos ensaios de infectividade.

Estocagem de inoculante micorrízico arbuscular seco e em condições ideais de temperatura e umidade, tem sido possível por vários anos, sem perda significativa da infectividade (FELDMANN; IDCZAK, 1994). Silva et al. (2007) verificaram que inoculantes de *Gigaspora albida* Schenck e Smith, *Acaulospora longula* Spain e Schenck e *C. etunicatum*, composto de glomerosporos, hifas e raízes colonizadas, mantidos em areia + vermiculita (1:1, v / v) com tampão Tris-HCl, preservaram seu potencial infectivo, durante quatro meses, quando armazenado a 4 °C e à temperatura ambiente os inoculantes não foram infectivos. Estes resultados foram semelhantes aos aqui encontrado, quando a infectividade dos inóculos foi mantida por um período de 10 meses a 4 °C quando comparada a obtida logo após a colheita das plantas do sistema aeropônico. Kim et al. (2002) relataram que inoculante de *G. intraradices* estocado durante três meses a 4 °C permaneceu viável, proporcionando, em média, 42,5% de colonização micorrízica em raízes de *Capsicum annuum* L.

Considerando-se que a viabilidade dos inoculantes produzidos em sistema aeropônico declinam com a estocagem se estiverem em substrato úmido (SYLVIA; JARSTFER, 1992), o inoculante deve ser seco e armazenado a 4 °C (HUNG; SYLVIA, 1988; SYLVIA, 1994), tal como evidenciado pela manutenção da infectividade durante os dez meses. Fontes de inóculo a base de raízes colonizadas, armazenados a 4 °C em água ou vermiculita umedecida retém seu potencial infectivo por apenas dois meses (SIEVERDING, 1991). Glomerosporos de *G. intraradices* produzidos em cultivo *in vitro* apresentaram redução nas taxas de germinação com o passar do tempo de armazenamento em placas de Petri, chegando a menos de 20% aos 120 dias (JUGE et al. 2002). Tal como observado neste estudo, os inoculantes de *C. etunicatum* e *G. clarum* produzidos no sistema aeropônico e armazenados em areia fina com vermiculite ou argila expandida, e estocados a 4 °C podem manter a viabilidade dos propágulos (glomerosporos e raízes colonizadas) durante dez meses.

Nesta produção experimental, os custos para inocular uma muda foram relativamente elevados, especialmente no caso de *G. clarum* (cerca de R\$ 3,00). Em outros países, os preços dos inoculantes comerciais variam de R\$ 4,50 kg⁻¹ a R\$ 100,00 kg⁻¹ (EUA \$ 40) e os produtores

indicam que com 1 Kg de inoculante pode-se inocular de 250 a 300 mudas, assim, os custos unitários variam de R\$ 0,02 a R\$ 0,40. No Brasil, não há produção comercial de inoculantes de FMA. Na produção comercial, os custos seriam certamente mais baixos do que o encontrado nessa produção experimental, considerando que quase 90% dos custos foram relativos às despesas correntes, principalmente de mão de obra (62%) e que seriam diluídos com a produção em maior escala. Este resultado é promissor do ponto de vista de uma possível produção comercial dos inoculantes, embora mais estudos sejam necessários para determinar a viabilidade financeira da produção.

4.2 PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA DE INÓCULO DE FMA EM CLIMAS TROPICAL ÚMIDO E SEMIÁRIDO

4.2.1 Biomassa vegetal em função da inoculação micorrízica

As plantas de sorgo inoculadas com *C. etunicatum* e com *A. longula* tiveram maior massa seca no substrato composto por areia + argila expandida + leucena triturada (T3) que nos demais substratos, nos dois locais e nos dois ciclos de produção (Tabela 4). A biomassa das plantas foi menor no segundo ciclo de cultivo em relação ao primeiro, nos dois locais nos dois tratamentos com FMA, especialmente quando foram utilizados substratos com incorporação de leucena triturada.

Tabela 4. Biomassa seca (g) da parte aérea de plantas de sorgo inoculadas com *Claroideoglossum etunicatum* (CE) e *Acaulospora longula* (AL), em dois ciclos de produção, em canteiro de alvenaria, utilizando quatro substratos: T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25).

RECIFE				
Tratamentos	1º ciclo		2º ciclo	
	CE	AL	CE	AL
T1	70 aC	17 aC	19 bB	13 aB
T2	32 aC	12 aC	23 aB	11 aB
T3	477 aA	410 aA	172 bA	140 bA
T4	365 aB	199 aB	92 bB	52 bB
PETROLINA				
Tratamentos	1º ciclo		2º ciclo	
	CE	AL	CE	AL

T1	14 aC	17 aC	6 aB	7 aA
T2	14 aC	12 aC	11 aB	8 aA
T3	473 aA	410 aA	93 bA	73 bA
T4	261 aB	199 aB	68 bA	40 bA

C.V (%) = 23,6

Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna, em cada local, e minúsculas na linha, para cada FMA entre os ciclos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: o autor.

4.2.2 Produção de esporos e taxa de colonização

No experimento realizado em Recife, a produção de glomerosporos de *C. etunicatum* também foi maior nestes mesmos substratos, mas a de *A. longula* não diferiu entre substratos, exceto pela produção mais baixa no substrato com bagaço de cana, no segundo ciclo. No experimento em Petrolina nos dois ciclos de cultivo, maior produção de glomerosporos (Tabela 5) e maior colonização micorrízica (Tabela 6) ocorreram nos tratamentos mantidos nos dois substratos com leucena triturada (T3 e T4). A colonização não diferiu em função dos substratos, no segundo ciclo, mas no primeiro ciclo foi menor nas mudas inoculadas com *C. etunicatum*, em substrato com areia e argila e foi maior neste mesmo substrato no tratamento com *A. longula* e nos substratos mais complexos, incluindo leucena e bagaço. Em geral, as taxas de colonização foram elevadas (>35%) em vários tratamentos, e em Petrolina atingiram perto de 90%.

Tabela 5. Número de glomerosporos (g^{-1} substrato) de *Claroideoglossum etunicatum* (CE) e de *Acaulospora longula* (AL), em dois ciclos de produção, em canteiro de alvenaria, utilizando quatro substratos: T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25).

RECIFE				
Tratamentos	1º ciclo		2º ciclo	
	CE	AL	CE	AL
T1	0,4 bC	4,25 aA	17,7 aBC	15,0 aA
T2	7,5 aB	2,50 aA	3,2 aC	1,7 aB
T3	22,7 aAB	4,25 bA	58,5 aAB	36,5 aA

T4	49,0 aA	23,00 aA	86,5 aA	21,7 aA
PETROLINA				
	1º ciclo		2º ciclo	
T1	4,0 aBC	0,6 aC	2,4 aB	0,5 aB
T2	1,1 aC	0,3 aC	0,9 aB	0,9 aB
T3	19,7 aAB	128,2 aA	21,4 aA	45,0 bA
T4	37,6 aA	86,8 aB	30,4 aA	45,6 aA

C.V (%) = 26,8

Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna, em cada local, e minúsculas na linha, para cada FMA entre os ciclos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: o autor.

Tabela 6. Colonização micorrízica (%) produzida por *Claroideoglomus etunicatum* (CE) e por *Acaulospora longula* (AL), em dois ciclos de produção, em canteiro de alvenaria, utilizando quatro substratos: T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25).

RECIFE				
	1º ciclo		2º ciclo	
Tratamentos	CE	AL	CE	AL
T1	14,5 bB	31,7 aAB	56,0 aA	45,2 aA
T2	23,0 bAB	8,2 bC	53,0 aA	45,7 aA
T3	37,0 bAB	15,0 bBC	74,7 aA	70,5 aA
T4	45,0 aA	44,5 aA	76,5 aA	59,2 aA
PETROLINA				
	1º ciclo		2º ciclo	
T1	32,3 aC	35,3 aB	39,7 aB	59,0 aB
T2	44,7 aBC	14,7 bB	41,0 aB	48,1 aB
T3	83,1 aA	89,8 aA	90,5 aA	89,2 aA
T4	74,7 aAB	82,1 aA	88,7 aA	84,0 aAB

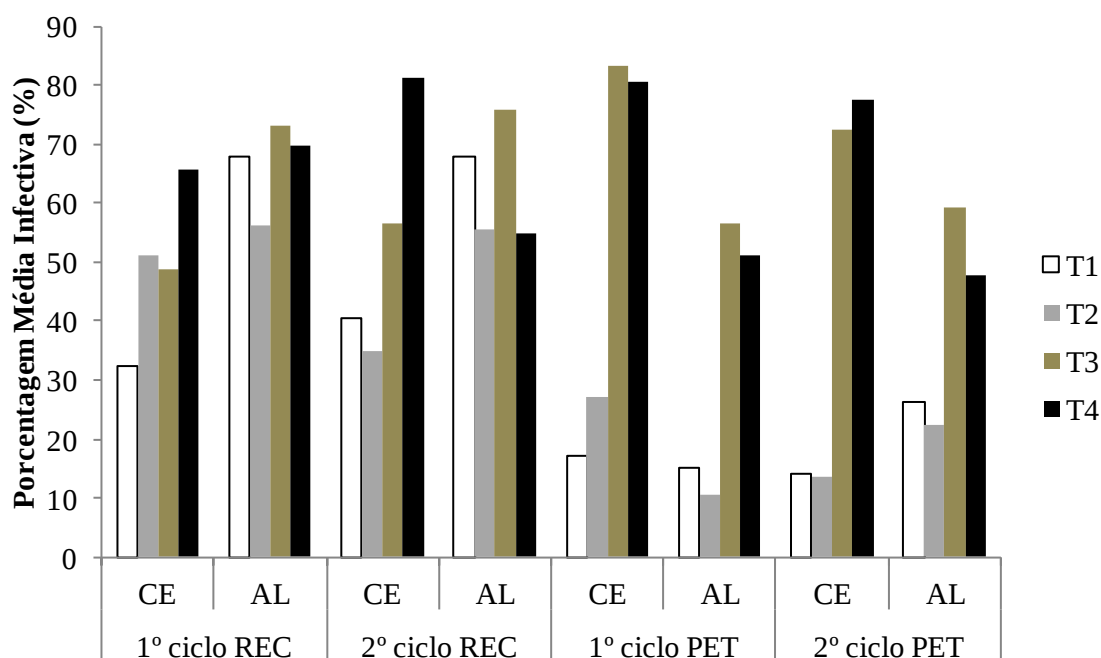
C.V (%) = 0,7

Médias seguidas de mesmas letras maiúsculas na coluna, em cada local, e minúsculas na linha, para cada FMA entre os ciclos, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os inoculantes produzidos no experimento em Recife, em todos os substratos e nos dois ciclos de multiplicação, foram considerados infectivos por apresentarem taxas de infectividade (MIP) superiores a 25%. Por outro lado, no experimento em Petrolina, os inoculantes de *A. longula* produzidos nos tratamentos com areia + argila e com areia + argila + bagaço de cana (T1 e T2), no primeiro ciclo e os inoculantes das duas espécies de FMA, no segundo ciclo, não foram infectivos, tendo apresentado taxas inferiores a 25% (Figura 2). Em geral, os inoculantes dos dois FMA produzidos no substrato T3 e T4 apresentaram infectividade mais elevada do que nos demais substratos, embora nem sempre a diferença fosse estatisticamente significativa.

A incorporação de leucena triturada ao substrato de cultivo favoreceu o desenvolvimento das plantas de sorgo, que produziram maior biomassa que as crescidas apenas em argila e areia, com ou sem incorporação de bagaço de cana. A incorporação de adubos verdes ao solo, especialmente compostos por leguminosas, é uma prática comum em cultivos agrícolas, levando a maior produtividade (SILVA, 2008). Entre as vantagens da adubação verde, além do fornecimento de nutrientes, estão a retenção de cátions e complexação de elementos tóxicos e micronutrientes e a melhoria na infiltração e retenção de água (BAYER; MIELNICZUK, 2008). A leucena é uma leguminosa com grande potencial como adubo verde devido à elevada concentração de N na biomassa aérea e da alta capacidade de fixação simbiótica deste elemento (EIRAS; COELHO, 2011), que frequentemente é o nutriente mais limitante ao desenvolvimento das plantas (CAMARGO et al., 2008).

Figura 2. Porcentagem média infectiva de inoculantes de *Claroideoglomus etunicatum* (CE) e *Acaulospora longula* (AL), em Recife (REC) e Petrolina (PET), em dois ciclos de produção, em canteiro de alvenaria, em diferentes substratos.



T1 = areia + argila expandida (6:4); T2 = areia + argila expandida + bagaço de cana (6:3,5:0,5); T3 = areia + argila expandida + leucena triturada (6:3,5:0,5); T4 = areia + argila expandida + bagaço de cana + leucena triturada (6:3,5:0,25:0,25). Fonte: o autor, 2017.

Em relação aos FMA, estes também podem ser estimulados em substratos à base de componentes orgânicos aumentando a colonização e beneficiando dessa forma o crescimento vegetal (GRYNDLER et al., 2008; LARSEN et al., 2009). Além do fósforo, os micobiontes também contribuem na aquisição do nitrogênio para o vegetal, atuando no ciclo deste elemento no solo (VERESOGLOU et al., 2012), fato que pode ter contribuído para melhor nutrição das plantas de sorgo. Foi justamente nos substratos com leucena triturada que o sorgo apresentou maior crescimento e onde ocorreu a maior produção de glomerosporos de *A. longula* e *C. etunicatum*.

A utilização de adubos orgânicos no substrato pode favorecer a produção de glomerosporos devido ao estímulo no crescimento e extensão do micélio (LABIDI et al., 2007). Kaushish et al. (2011) observaram que a produção de glomerosporos de *Funneliformis mosseae* (Nicol. e Gerd.) Gerd. e Trappe foi maximizada quando o substrato de cultivo era composto por solo + resíduo vegetal à base de folhas ($111 \pm 0,81$ glomerosporos g^{-1} solo), tendo como planta hospedeira o capim limão [*Cymbopogon densiflorus* (Steud) Stapf.]. Da mesma forma, Setiadi (2002) contabilizou 83 glomerosporos de *Acaulospora tuberculata* Janos e Trappe produzidos

em um grama de substrato composto por vermiculita + adubação orgânica à base de restos de folhas, em associação com *Pueraria javanica* (Benth.) Benth. No presente trabalho, valores semelhantes foram obtidos para *C. etunicatum* no 2º ciclo de cultivo em Recife, e para *A. longula* no 1º ciclo em Petrolina em substratos com resíduo vegetal.

Schlemper e Stürmer (2014) produziram inóculo de FMA (*Rhizophagus clarus* T. H. Nicolson & N. C. Schenck e *C. etunicatum*, utilizando sorgo como hospedeiro) em condições similares (a céu aberto) ao apresentado no presente trabalho. Os autores contabilizaram, em média, 162 ± 82.5 glomerosporos de *R. clarus* em 100 cm^3 de substrato composto por bagaço de cana + casca de arroz carbonizada + areia (1:1:1 v/v) e 111 ± 34.5 do mesmo substrato na proporção 2:1:1 (v/v). Para *C. etunicatum* a média foi de 240 ± 169.7 glomerosporos na proporção de 1:1:1 (v/v) e 389 ± 202.9 em 2:1:1 (v/v) do mesmo substrato. No presente estudo, a utilização de bagaço de cana como componente do substrato de cultivo não foi favorável à produção de inóculo dos FMA testados, nos dois locais de estudo.

Assim como verificado neste trabalho, Schlemper e Stürmer (2014) também obtiveram os melhores resultados na produção de glomerosporos, principalmente de *C. etunicatum*, nos substratos que continham resíduos de folhas. O material vegetal utilizado pelos autores foi advindo da palmeira real *Archontophoenix alexandrae* H. Wendl. e Drude e casca de cevada, misturados com casca de arroz carbonizada e areia (1:1:1 v/v).

Como mencionado, os FMA são estimulados em substratos à base de componentes orgânicos, que além de aumentarem a colonização micorrízica também podem favorecer a produção de glomerosporos (ZAMBOLIM et al., 1992). Condições adequadas do substrato são importantes para o estabelecimento da simbiose e as espécies vegetais e o uso de adubo orgânico em concentrações adequadas pode constituir alternativa para fornecimento de nutrientes de forma balanceada, não prejudicando a atuação do micobionte (SAINZ et al., 1998). O balanço nutricional estabelecido por fontes de carbono advindas do bagaço de cana e fontes de nitrogênio da leucena, aliado às condições de estresse estabelecidas por temperaturas mais elevadas em Petrolina podem ter contribuído para maior esporulação de *A. longula* nos tratamentos T3 e T4, no 1º ciclo de multiplicação. Da mesma forma, apesar de menor produção de glomerosporos, os mesmos tratamentos (T3 e T4) foram os mais promissores para produção de inoculante de *C. etunicatum*. Douds Jr. et al. (2006) obtiveram maior produção de inóculo de vários isolados de

FMA [*F. mosseae*, *C. etunicatum*, *Claroideoglossum claroideum* (N.C. Schenck e G.S. Sm.) C. Walker e A. Schüssler, *Glomus intraradices* N.C. Schenck e G.S. Sm. e *Gigaspora gigantea* (T.H. Nicolson e Gerd.) Gerd. e Trappe] em substratos que apresentavam composto orgânico (esterco de gado e folhas) no substrato de cultivo. Os autores contabilizaram em torno de 372 ± 36 glomerosporos de *C. etunicatum* em 50 cm^{-3} de substrato à base de folhas + vermiculita e 146 ± 65 glomerosporos de *F. mosseae*, com substrato composto de esterco + restos de folhas + vermiculita. Kaushish et al. (2011) também observaram maior esporulação de *F. mosseae* em substratos que apresentavam componente orgânico (restos vegetais, esterco de gado ou vermicomposto) que em substrato composto apenas por solo + areia.

A quantidade de chuva ocorrida em Recife (978 mm nos seis meses dos dois ciclos de multiplicação), deixando os substratos bastante encharcados, em comparação com a precipitação registrada para Petrolina (161 mm), pode ter contribuído para redução na produção de glomerosporos de *A. longula*. Entretanto, essas condições de umidade não limitaram a esporulação de *C. etunicatum*, principalmente no tratamento que apresentava a mistura de leucena moída + bagaço de cana no substrato de cultivo. A combinação destes componentes orgânicos à base de fontes de nitrogênio e carbono foi determinante para a produção de glomerosporos de *C. etunicatum* no experimento realizado em Recife. Idjo et al. (2011) relataram que a umidade pode afetar o processo de produção de inoculante, com a planta hospedeira e o FMA devendo ter acesso a quantidade de água suficiente. A umidade do substrato de cultivo interfere na germinação dos glomerosporos e na colonização micorrízica, ocorrendo efeito negativo em condições de excesso de água (SILVEIRA et al. 2013), fator que pode ter contribuído para redução na produção de glomerosporos de *A. longula*.

De modo geral, a presença de leucena, isoladamente ou em combinação com bagaço de cana, nos substratos de produção de inoculante contribuiu para as maiores taxas de colonização micorrízica encontradas no presente trabalho, no primeiro ciclo de multiplicação em Recife e nos dois ciclos em Petrolina, para os dois micobiontes utilizados nos experimentos. Maior colonização micorrízica em substrato com adição de compostos orgânicos tem sido observada por outros autores, como Douds Jr. et al. (2008), usando vermiculita + restos orgânicos à base de folhas e Gryndler et al. (2009), utilizando raízes e folhas secas de alfafa em plantas de milho associadas a *G. intraradices* e *C. claroideum*. A incorporação de fontes orgânicas ao solo pode

influenciar o desenvolvimento do micélio externo via liberação de componentes da decomposição e também por metabólitos secundários produzidos, afetando diretamente a colonização micorrízica (GRYNDLER et al. 2009). Em experimento de adubação em campo, os níveis de colonização micorrízica foram sempre elevados, em cultivo orgânico quando comparado com sistema convencional (RAYAN et al. 1994). Zambolim et al. (1992) registraram 100% de colonização micorrízica em plantas de sorgo inoculadas com *C. etunicatum* em substratos compostos por turfa + vermiculita + solo + matéria orgânica, turfa + vermiculita e turfa + vermiculita + matéria orgânica. Isso demonstra a importância da utilização de fontes orgânicas para compor substratos de produção de inoculante.

A produção de inoculante em canteiro de alvenaria, em substrato enriquecido com resíduo de leucena, pode ser alternativa para otimizar o fornecimento de biofertilizantes para produtores agrícolas, diminuindo a utilização de fertilizantes fosfatados. Porém, testes de infectividade devem ser feitos logo após a produção do inoculante para avaliar a capacidade infectiva dos glomerosporos produzidos. A recomendação para um inoculante micorrízico arbuscular é que apresente porcentagem média infectiva $\geq$ a 25% (INVAM, 2001). Taxas superiores foram encontradas para os inoculantes produzidos em canteiros, nos dois locais de estudos e para a maioria dos substratos de cultivo, constituindo uma alternativa promissora para os produtores obterem inoculantes na sua própria área de plantio. As quantidades de glomerosporos de *A. longula* produzidos em um canteiro de alvenaria com substrato de areia + argila expandida + leucena triturada seriam suficientes para a inoculação de 18 ha de milho, caso fosse feita com 500 glomerosporos por planta, em um plantio de milho com densidade de 2500 plantas ha⁻¹. As quantidades produzidas de *C. etunicatum* dariam para 10 ha. São áreas de plantio maiores que as da maioria das propriedades familiares do Nordeste, indicando que bastaria ao agricultor preparar um canteiro por safra para ter inóculo suficiente para esta ou qualquer outra cultura anual. Salvioli e Bonfante (2013) destacaram, entretanto, que é de grande importância unir os dados encontrados em testes experimentais controlados com os obtidos em campo. Dessa forma, testes de efetividade do inoculante produzido devem ser feitos, utilizando-se diversas culturas de interesse econômico, de modo a fornecer dados precisos para que os agricultores possam utilizar o bioinoculante em questão.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema aeropônico para a produção de inoculante de FMA é adequado, com elevada proliferação de propágulos de *Claroideoglomus etunicatum* e *Glomus clarum* e, relativamente, de menor custo, especialmente para *C. etunicatum*. Os inóculos produzidos em sistema aeropônico e armazenados a 4 °C permanecem viáveis, por pelo menos 10 meses, em substrato composto de areia adicionado de argila ou vermiculita, sendo recomendado para uso como bioinoculantes.

A tecnologia para produção de inoculante em canteiro de alvenaria é promissora como alternativa de biofertilizante tanto para áreas tropicais úmidas quanto semiáridas, utilizando-se como substrato areia + argila expandida adicionado de leucena triturada.

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) são micro-organismos do solo que conferem benefícios para as plantas, desde a promoção de crescimento até tolerância a ataque de patógenos. A utilização de inoculante desses micro-organismos pode ser uma alternativa para diminuir o uso de fertilizantes fosfatados que são, muitas vezes, onerosos. Porém, no Brasil não são encontrados inoculantes de FMA disponíveis no mercado, como ocorre em outros países.

O biotrofismo obrigatório dos FMA tem dificultado a produção de inoculante. Assim, melhorias em técnicas já conhecidas de produção de inoculante ou o estabelecimento de novas formas de produção na própria área de cultivo do agricultor podem contribuir para utilização desses fungos em larga escala.

No nosso estudo, o armazenamento de inóculo produzido em sistema aeropônico em areia + vermiculita ou areia + argila expandida e a estocagem a 4 °C favoreceu a manutenção da viabilidade do inoculante por pelo menos 10 meses. Além disso, os custos para produção do inoculante em escala comercial seriam certamente mais baixos do que o encontrado nessa produção experimental, considerando que certas despesas correntes seriam diluídas com a produção em larga escala.

A produção de inoculante de FMA em canteiro de alvenaria a céu aberto pode ser viabilizada pelos agricultores na própria área de cultivo, utilizando-se de substratos inertes (areia + argila expandida) com adição de 5% de leucena triturada.

Estudos futuros devem incluir testes (em casa de vegetação e em campo) de efetividade dos inoculantes em diversas culturas. Desse modo, protocolos de utilização desses micro-organismos poderão ser gerados para viabilizar o uso e a comercialização dos inoculantes produzidos pelas técnicas apresentadas.

REFERÊNCIAS

HOSSEIN, Abbaspour. Investigation of the effects of vesicular arbuscular mycorrhiza on mineral nutrition and growth of *Carthamus tinctorius* under salt stress conditions. **Russian Journal of Plant Physiology** 57: 526-531. 2010.

AGUIAR, R.L.F.; MAIA, L.C.; SALCEDO, I.H.; SAMPAIO, E.V. S. B. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e fósforo no desenvolvimento da algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw) DC). **Revista Árvore** 28: 589-598. 2004.

ANJOS, Erica C.T.; CAVALCANTE, Uided. M.T.; SANTOS, V.F.; MAIA, L. C. Produção de mudas de maracujazeiro-doce micorrizadas em solo desinfestado e adubado com fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 40: 345-351. 2005.

_____; _____; GONÇALVES, D.M.C., PEDROSA, E.M.R., SANTOS, V.F., MAIA, Leonor C. Interactions between an arbuscular mycorrhizal fungus (*Scutellospora heterogama*) and the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on sweet passion fruit (*Passiflora alata*). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53: 801-809. 2010.

ANZANELLO, R.; SOUZA, P.V.D.; CASAMALI, B. Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em porta-enxertos micropropagados de videira. **Bragantia** 70: 408-415. 2011.

ASRAR, A.W.A.; ELHINDI, K.M. Alleviation of drought stress of marigold (*Tagetes erecta*) plants by using arbuscular mycorrhizal fungi. **Saudi Journal of Biological Sciences** 18: 93-98. 2011.

BABU, A.G.; REDDY, M.S. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and nutrient status of bermudagrass grown in alkaline bauxite processing residue. **Environmental Pollution** 159: 25-29. 2011.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G.A., SILVA, L.S., CANELLAS, L.P., CAMARGO, F.A.O. (eds). **Fundamentos da Matéria Orgânica do solo – Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Porto Alegre: Metrópole, pp. 7-17. 2008.

BEDINI, S.; AVIO, L.; ARGESI, E.; GIOVANNETTI, E. Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. **Agriculture, Ecosystems and Environment** 120: 463-466. 2007.

BOLANDNAZAR, S.; ALIASGARZAD, N.; NEISHABURY, M.R.; CHAPARZADEH, N. Mycorrhizal colonization improves onion (*Allium cepa* L.) yield and water use efficiency under water deficit condition. **Scientia Horticulturae** 114: 11-15. 2007.

BORGES, A.J.S.; TRINDADE, A.V.; MATOS, A.P.; PEIXOTO, M.F.S. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42: 35-41. 2007.

BURITY, Hélio.A.; LYRA, M.C.C.P.; SOUZA, E.S.; MERGULHÃO, Adália.C.E.S.; SILVA, MÁRCIA.R.B. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 35: 801-807. 2000.

CAMARGO, F.A.O.; SILVA, L.S.; GIANELLO, C.; TEDESCO, M.J. Nitrogênio orgânico do solo. In: SANTOS, G.A., SILVA, L.S., CANELLAS, L.P., CAMARGO, F.A.O. (eds). **Fundamentos da Matéria Orgânica do solo – Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Porto Alegre: Metrópole, pp. 87-99. 2008.

CAMPOS, Mariluce A.S. **Fungos micorrízicos arbusculares associados a goiabeiras e efeito sobre o parasitismo de *Meloidogyne mayaguensis***. Tese de Doutorado, UFPE. 132p. 2009.

CAMPRUBI, A.; ABRIL, M.; ESTAUN, V.; CALVET, C. Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to the survival of psammophilic plants after sea water flooding. **Plant Soil** 351: 97-105. 2012.

CARAVACA, F.; BAREA, J.M.; ROLDÁN, A. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and organic amendment on *Pistacia lentiscus* L. seedlings afforested in a degraded semiarid soil. **Soil Biology Biochemistry** 34: 1139-1145. 2002.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; DAVIDE A.C. Fósforo e inoculação com fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec). **Pesquisa Agropecuária Tropical** 34: 119-125. 2004.

CASTELLANOS-MORALES, V.; VILLEGAS-MORENO, J.; VIERHEILIG, H.; CÁRDENAS-NAVARRO, R. Nitrogen availability drives the effect of *Glomus intraradices* on the growth of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 92: 2260-2264. 2012.

CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, V.F. Respostas fisiológicas em mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* SIMS. f. *Flavicarpa* DEG.) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a estresse hídrico. **Acta Botanica Brasilica** 15: 379-390. 2001a.

_____; _____; SANTOS, V.F. Mycorrhizal dependency of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fruits** 56: 317-324. 2001b.

CEBALLOS, I.; RUIZ, M.; FERNÁNDEZ, C.; PEÑA, R.; RODRÍGUEZ, A.; SANDERS, I.R. The *In Vitro* mass-produced model mycorrhizal fungus, *Rhizophagus irregularis*, significantly increases yields of the globally important food security crop cassava. **PLoS ONE**, 8: e70633. 2013.

CELEBI, S.Z.; DEMIR, S.; CELEBI, R.; DURAK, E.D.; YILMAZ, I.H; The effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) applications on the silage maize (*Zea mays* L.) yield in different irrigation regimes. **European Journal of Soil Biology** 46: 302-305. 2010.

CHAUDHARY, V., KAPOOR, R., BHATNAGAR, A.K. Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. **Applied Soil Ecology** 40: 174-181. 2008.

CHO, E.J.; LEE, D.J.; WEE, C.D.; KIM, H.L.; CHEONG, Y.H.; CHO, J.S.; SOHN, B.K. Effects of AMF inoculation on growth of *Panax ginseng* C.A. Meyer seedlings and on soil structures in mycorrhizosphere. **Scientia Horticulturae** 122: 633-637. 2009.

CORNEJO, P.; MEIER, S.; BORIE, G.; RILLIG, M.C.; BORIE, F. Glomalin-related soil protein in a Mediterranean ecosystem affected by a copper smelter and its contribution to Cu and Zn sequestration. **Science of the Total Environment** 406: 154-160. 2008.

COSTA, C.M.C.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.T.M.; NOGUEIRA, R.J.M.C. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 36: 893-901. 2001.

COZZOLINO, V.; DI MEO, V.; PICCOLO, A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. **Journal of Geochemical Exploration** 129: 40-44. 2013.

DECLERCK, S.; D'OR, D.; BIVORT, C.; DE SOUZA, F.A. Development of extraradical mycelium of *Scutellospora reticulata* under root-organ culture: spore production and function of auxiliary cells. **Mycological Research** 108: 84-92. 2004.

DECLERCK, S.; RISEDE, J.M.; DELVAUX, B. Greenhouse response of micropropagated bananas inoculated with *in vitro* monoxenically produced arbuscular mycorrhizal fungi. **Scientia Horticulturae** 93: 301-309. 2002.

DECLERCK, S.; STRULLU, D.G.; PLENCHETTE, C. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. **Mycological Research** 100: 1237-1242. 1996.

DE JAEGER, N.; LA PROVIDENCIA, I.E.; ROUHIER, H.; DECLERCK, S. Co-entrapment of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* sp. within alginate beads: impact on the arbuscular mycorrhizal fungi life cycle. **Journal of Applied Microbiology** 111: 125-135. 2011.

DE SOUZA, F.A.; SILVA, I.C.L.; BERBARA, R.L. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imagina. In: MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O., BRUSSAARD, L. (eds). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, pp. 483-536. 2008.

DIOP, T.A.; PLENCHETTE, C.; STRULLU, D.G. Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. **Mycorrhiza** 5: 17-22. 1994.

DOUDS JR., D.D. Relationship between hyphal and arbuscular colonization and sporulation in a mycorrhiza of *Paspalum notatum* Flugge. **New Phytology** 126: 233-237. 1994.

_____; NAGAHASHI, G.; REIDER, C.; HEPPELRY, P.R. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. **Biological Agriculture and Horticulture** 25: 67-78. 2007.

_____; _____; PFEFFER, P.E.; REIDER, C.; KAYSER, W.M. On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Bioresource Technology** 97: 809-818. 2006.

_____; _____ REIDER, C., HEPPELRY, P.R. Choosing a mixture ratio for the on-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Compost Science Utilization**, 16: 52-60. 2008.

_____; _____; HEPPELRY, P.R. On-farm production of inoculum of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculum production. **Bioresource Technology**, 97: 2326-2630. 2010.

DOUDS JR, D.D.; SCHENCK, N.C. Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrition and carbohydrate contents. **New Phytology** 116: 621-627. 1990.

ESTRADA-LUNA, A.A.; DAVIES JR., F.T. Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and post – acclimatization. **Journal of Plant Physiology** 160: 1073-1083. 2003.

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, San Diego, p. 799-817. 1994.

FELDMANN, F.; HUTTER, I.; SCHNEIDER, C. Best production practice of arbuscular mycorrhizal inoculum. In: Varma, A., kharkwal, A.C. (eds). **Symbiotic fungi: Principles and practice**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 319-336. 2009.

FLORES-AYLAS, W.W.; SAGGIN-JÚNIOR, O.J.; SIQUEIRA, J.O.; DAVIDE, A.C. Efeito de *Glomus etunicatum* e fósforo no crescimento inicial de espécies arbóreas em semeadura direta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 38: 257-266. 2003.

FREITAS, M.S.M.; MARTINS, M.A.; CARVALHO, A.J.C. Crescimento e composição da menta em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada. **Horticultura Brasileira** 24: 11-16. 2006.

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

GAUR, A.; VARMA, A. Research methods in arbuscular mycorrhizal fungi. In: Varma, A., Oelmüller, R. (eds). **Advanced Techniques in Soil Microbiology**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 377-396. 2007.

GENTILI, F.; JUMPPONEN, A. Potential and possible uses of bacterial and fungal biofertilizers. In: Rai, M.K. (ed). **Handbook of Microbial Biofertilizers**. USA, pp. 1-28. 2005.

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** 46: 235-244. 1963.

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

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

GRYNDLER, M.; JANSÁ, J.; HRSELOVÁ, H.; CHVÁTALOVÁ, I.; VOSÁTKA, M. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology** 22: 283-287. 2003.

GRYNDLER, M.; SUDOVÁ, R.; PÜSCHEL, D.; RYDLOVÁ, J.; JANOUSKOVÁ, M.; VOSÁTKA, M. Cultivation of high-biomass crops on coal mine spoil banks: Can microbial inoculation compensate for high doses of organic matter? **Bioresource Technology** 99: 6391-6299. 2008.

GRYNDLER, M., HRSELOVA, H., CAJTHAML, T., HAVRANKOVA, M., REZACOVA, V., GRYNDLEROVA, H., LARSEN, J. Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization. **Mycorrhiza** 19: 255-266. 2009.

HAMMER, E.C.; RILLIG, M.C. The influence of different stresses on glomalin levels in an arbuscular mycorrhizal fungus—salinity increases glomalin content. **PLoS ONE** 6: e28426. 2011.

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

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 97: 8859-8873. 2013.

HILLIS, D.G.; ANTUNES, P.; SIBLEY, P.K.; KLIRONOMOS, J.N.; SOLOMON, K.R. Structural responses of *Daucus carota* root-organ cultures and the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, to 12 pharmaceuticals. **Chemosphere** 73: 344-352. 2008.

HUNG, L.L.; SYLVIA, D.M. Production of vesicular – arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. **Applied and Environmental Microbiology** 54: 353-357. 1988.

HU, J.L.; LIN, X.G.; WANG, J.H.; SHEN, W.S.; WU, S.; PENG, S.P.; MAO, T.T. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation enhances suppression of cucumber *Fusarium* wilt in greenhouse soils. **Pedosphere** 20: 586-593. 2010.

ILBAS, A.I.; SAHIN, S. *Glomus fasciculatum* inoculation improves soybean production. **Acta Agriculture Scandinavica Section B- Soil and Plant Sciences** 12: 1-6. 2005.

IJDO, M.; CRANENBROUCK, S.; DECLERCK, S. Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. **Mycorrhiza** 21: 1-16. 2011.

INMET. < <http://www.agritempo.gov.br> > Acesso em 2013.

INVAM. <<http://invam.caf.wvu.edu>> Acesso em 2011.

JAIZME-VEGA, M.C.; RODRÍGUEZ-ROMERO, A.S.; HERMOSO, C.M.; DECLERCK, S. Growth of micropropagated bananas colonized by root-organ culture produced arbuscular mycorrhizal fungi entrapped in Ca- alginate beads. **Plant and Soil** 254: 329-335. 2003.

JANKONG, P.; VISOOTTIVISETH, P. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on plants growing on arsenic contaminated soil. **Chemosphere** 72: 1092-1097. 2008.

JARSTFER, A.G.; SYLVIA, D.M. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In.: Metting, F.B. (ed). **Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental management**, New York, pp.349-377. 1992.

JARSTFER, A.G.; FARMER-KOPPENOL, P.; SYLVIA, D.M. Tissue magnesium and calcium affect arbuscular mycorrhiza development and fungal reproduction. **Mycorrhiza** 7: 237-242. 1998.

JHA, A.; KUMAR, A.; SAXENA, R.K.; KAMALVANSI, M.; CHAKRAVARTY, N. Effect of arbuscular mycorrhizal inoculations on seedling growth and biomass productivity of two bamboo species. **Indian Journal of Microbiology** 52: 281-185. 2012.

JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report** 48: 692. 1964.

JOSHEE, N.; MENTREDDY, S.R.; YADAV, A.K. Mycorrhizal fungi and growth and development of micropropagated *Scutellaria integrifolia* plants. **Industrial Crops and Products** 25: 169-177. 2007.

JUGE, C.; SAMSON, J.; BASTIEN, C.; VIERHEILIG, H.; COUGHLAN, A.; PICHÉ, Y. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. **Mycorrhiza** 12: 37-42. 2002.

KAHILUOTO, H.; KETOJA, E.; VESTBERG, M.; SAARELA, I. Promotion of AM utilization through reduced P fertilization. 2. Field studies. **Plant and Soil** 231: 65-79. 2001.

KAPOOR, R.; CHAUDHARY V.; BHATNAGAR, A.K. Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on artemisinin concentration in *Artemisia annua* L. **Mycorrhiza** 17: 581-587. 2007.

_____; SHARMA, D. ; BHATNAGAR, A.K. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae* 116: 227–239. 2008.

KAUSHISH, S.; KUMAR, A.; AGGARWAL, A. Influence of hosts and substrates on mass multiplication of *Glomus mosseae*. **African Journal of Agricultural Research** 6: 2971-2977. 2011.

KAYA, C.; ASHRAF, M.; SONMEZ, O.; AYDEMIR, S.; TUNA, A.L.; CULLU, M.A. The influence of arbuscular mycorrhizal colonization on key growth parameters and fruit yield of pepper plants grown at high salinity. **Scientia Horticulturae** 121:1-6. 2009.

KIM, K.Y.; CHO Y.S.; SOHN, B.K.; PARK, R.D.; SHIM, J.H.; JUNG, S.J.; KIM, Y.W.; SEONG, K.Y. Cold-storage of mixed inoculum of *Glomus intraradices* enhances root colonization, phosphorus status and growth of hot pepper. **Plant and Soil** 238: 267-272. 2002.

KIRIACHEK, S.G.; AZEVEDO, L.C.B.; PERES, L.E.P.; LAMBAIS, M.R. Regulação do desenvolvimento de micorrizas arbusculares. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** 33: 1-16. 2009.

KUMAR, A.; SHARMA, S.; MISHRA, S. Influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi and salinity on seedling growth, solute accumulation, and mycorrhizal dependency of *Jatropha curcas* L. **Journal of Plant Growth Regulation** 29: 297-306. 2010.

LABIDI, S.; NASR, H.; ZOUAGHI, M.; WALLANDER, H. Effects of compost addition on extra-radical growth of arbuscular mycorrhizal fungi in *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* savanna in a pre-Saharan area. **Applied Soil Ecology** 35: 184-192. 2007.

LARSEN, J.; CORNEJO, P.; BAREA, J.M. Interactions between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and the plant growth promoting rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* and *P. macerans* in the mycorrhizosphere of *Cucumis sativus*. **Soil Biology Biochemistry** 41: 286-292. 2009.

LI, A.R.; SMITH, S.E.; SMITH, F.E.; GUAN, K.Y. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi suppresses initiation of haustoria in the root hemiparasite *Pedicularis tricolor*. **Annals of Botany** 109: 1075-1080. 2012.

MAIA, L.C.; SILVEIRA, N.S.S.; CAVALCANTE, U.T.M. Interação entre fungos micorrízicos arbusculares e patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S.J., ANDRADE, D.E.G.T., MENEZES, M. (eds). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**, Recife, UFRPE, pp. 183-205. 2005.

MARTIN-LAURENT, F.; LEE, S.K.; THAM, F.Y.; JIE, H. ; DIEM, H.G. Aeroponic production of *Acacia mangium* inoculated with AM fungi for reforestation in the tropics. **Forest Ecology and Management** 122:199-207. 1999.

MEHROTRA, V.S. Mycorrhiza: a premier biological tool for managing soil fertility. In: MEHROTRA, V.S. (ed). **Mycorrhiza: role and applications**, pp. 1-65. 2005.

MERGULHÃO, A.C.E.S. Efeito da inoculação pelo fungo micorrízico arbuscular (*Entrophospora colombiana*) em mudas micropropagadas de mandioca através do sistema aeropônico. **Revista Ecosistema** 26: 125-128. 2001.

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

MERGULHÃO, A.C.E.S.; BURITY, H.A.; SILVA, F.S.B.; PEREIRA, S.V.; MAIA, L.C. Glomalin production and microbial activity in soils impacted by gypsum mining in a Brazilian semiarid area. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences** 5: 422-429. 2010.

MILLERET, R.; LE BAYON, R.C.; LAMY, F.; GOBAT, J.M.; BOIVIN, P. Impacts of roots, mycorrhizas and earthworms on soil physical properties as assessed by shrinkage analysis. **Journal of Hydrology** 373: 499-507. 2009.

MONTE JUNIOR, I.P.; MAIA, L.C.; SILVA, F.S.B.; CAVALCANTE, U.T.M. Use of plant residues on growth of mycorrhizal seedlings of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). **Journal of the Science of Food and Agriculture** 92: 654-659. 2012.

MOREIRA FILHO, E.J.T. **Obtenção de fertilizante orgânico a partir de leucena (*Leucaena leucocephala*) para produção de hortaliças orgânicas.** Trabalho de conclusão de curso, UFSC. 23p. 2011.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Micorrizas. In: Moreira, F.M.S., Siqueira, J.O. (eds). **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: UFLA, pp. 473-578. 2006.

NOGUEIRA, M.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Plant growth and phosphorus uptake in mycorrhizal rangpur lime seedlings under different levels of phosphorus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41: 93-99. 2006.

NOVAIS, C.B.; SIQUEIRA, J.O. Aplicação de formononetina na colonização e esporulação de fungos micorrízicos em braquiária. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 44: 496-502. 2009.

ODEYEMI, I.S.; AFOLAMI, S.O.; SOSANYA, O.S. Effect of *Glomus mosseae* (arbuscular mycorrhizal fungus) on host – parasite relationship of *Meloidogyne incognita* (southern root – knot nematode) on four improved cowpea varieties. **Journal of Plant Protection Research** 50: 320-325. 2010.

OLIVEIRA, J.R.G.; MORAES, T.A.L.; MELO, N.F.; YANO-MELO, A.M. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth – promoting rizobacteria in the acclimatization of *Zingiber spectabile*. **Bragantia** 69: 687-694. 2010.

_____; _____; _____; _____ Acclimatization of *Tapeinochilos ananassae* plantlets in association with arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 46: 1099-1104. 2011.

PAIVA, L.M.; SILVA, M.A.; SILVA, P.C.; MAIA, L.C. *Glomus clarum* e *G. etunicatum*: cultivo em solo e aeroponia. **Revista Brasileira de Botânica** 26: 257-262. 2003.

PAWLOWSKA, T.E.; DOUDS JR., D.D.; CHARVAT, I. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. **Mycological Research** 103: 1549-1556. 1999.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infections. **Transactions of the British Mycological Society** 55: 158-161. 1970.

PLENCHETTE, C.; STRULLU, D.G. Long-term viability and infectivity of intraradical forms of *Glomus intraradices* vesicles encapsulated in alginate beads. **Mycological Research** 107: 614-616. 2003.

RAJA, P. Status of endomycorrhizal (AMF) biofertilizer in the global market. In: RAI, M.K. (ed). **Handbook of Microbial Biofertilizers**, USA, pp.395-416. 2005.

RAYAN, M.H.; CHILVERS, G.A.; DUMARESQ, D.C. Colonisation of wheat by VA-mycorrhizal fungi was found to be higher on a farm managed in an organic manner than on a conventional neighbour. **Plant and Soil** 160: 33-40. 1994.

REDON, P.O.; BÉRGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. **Mycorrhiza** 19: 187-195. 2009.

RUIZ, S.; ADRIANO, L.; OVANDO, I.; NAVARRO, C.; SALVADOR, M. Biofertilization of micropropagated *Agave tequilana*: Effect on plant growth and production of hydrolytic enzymes. **African Journal of Biotechnology** 47: 9623-9630. 2011.

SAGGIN-JUNIOR, O.J.; SILVA, E.M.R. Micorriza arbuscular – Papel, funcionamento e aplicação da simbiose. In: Aquino, A.M., Assis, R.L. (eds). **Processos biológicos no sistema solo – planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Agrobiologia, Brasília, pp. 101-149. 2005.

SÁINZ, M.J.; TABOADA-CASTRO; M.T.; VILARIÑO, A. Growth, mineral nutrition and mycorrhizal colonization of red clover and cucumber plants grown in a soil amended with composted urban wastes. **Plant Soil** 205: 85-92. 1998.

SALVIOLI, A.; BONFANTE, P. Systems biology and “omics” tools: A cooperation for next-generation mycorrhizal studies. **Plant Science** 203-204: 107-114. 2013.

SANTOS, J.G.D.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Eficiência de fungos micorrízicos arbusculares isolados de solos de áreas de mineração de bauxita no crescimento inicial de espécies nativas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** 32: 141-150. 2008.

SCHÜBLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research** 105: 1413-1421. 2001.

SETIADI, Y. Mycorrhizal inoculum production technique for land rehabilitation. **Tropical Forest Management Journal** 8: 5164. 2002.

SHARMA, M. P.; ADHOLEYA, A. Developing prediction equations and optimizing production of three AM fungal inocula under on-farm conditions. **Experimental Agriculture** 47: 529-537. 2011.

SHENG, M.; TANG, M.; CHEN, H.; YANG, B.; ZHANG, F.; HUANG, Y. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. **Mycorrhiza** 18: 287-296. 2008.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhizal management in tropical agrosystems**. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), eschborn, Germany. 1991.

SILVA, C.A. Uso de resíduos orgânicos na agricultura. In Santos, G.A., Silva, L.S., Canellas, L.P., Camargo, F.A.O. (eds) **Fundamentos da Matéria Orgânica do solo – Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Porto Alegre: Metrópole, pp. 597-624. 2008.

SILVA, D.K.A.; SILVA, F.S.B.; YANO-MELO, A.M.; MAIA, L.C. Uso de vermicomposto favorece crescimento de mudas de graviroleira (*Anona muricata* L. 'Morada') associadas a fungos micorrízicos arbusculares. **Acta Botanica Brasilica** 22: 863-869. 2008.

SILVA, E.M. **Colonização micorrízica em espécies de *Passiflora* e efeito da simbiose na promoção do crescimento**. Dissertação de Mestrado, UFPE. 75p. 2008

SILVA, F.S.B. **Fase assimiótica, produção, infectividade e efetividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em substratos orgânicos**. Tese de Doutorado, UFPE. 297p. 2006.

SILVA, F.S.B.; YANO-MELO, A.M.; MAIA, L.C. Production and infectivity of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi multiplied in a substrate supplemented with Tris-HCl buffer. **Brazilian Journal of Microbiology** 38: 752-755. 2007.

_____; _____; BRANDÃO, J.A.C.; MAIA, L.C. 2005. Sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi using Tris-HCl buffer in addition to nutrient solutions. **Brazilian Journal of Microbiology** 36: 327-332.

SILVA, M.F.; PESCADOR, R.; RABELO, R.A.; STÜMER, L. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi isolates on the development and oleoresin production of micropropagated *Zingiber officinale*. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 20: 119-130. 2008.

SILVA, M.F.O.; COSTA, L.M. **A indústria de defensivos agrícolas**. BNDES Setorial 35: 233-276. 2012.

SILVA, M.A.C.; SILVA, F.S.B.; YANO-MELO, A.M.; MELO, N.F.; MAIA, L.C. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicompostos na aclimação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica** 20: 249-256. 2006.

SILVA, S.; SIQUEIRA, J.O.; SOARES, C.R.F. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 41: 1749-1757. 2006.

SILVEIRA, A.P. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (eds). **Microbiologia do solo**. Campinas, SBCS, pp. 257-282. 1992.

SINGH, N.V.; SINGH, S.K.; SINGH, A.K.; MESHRA, D.T.; SUROSHE, S.S.; MISHRA, D.C. Arbuscular mycorrhizal fungi induced hardening of micropropagated pomegranate (*Punica granatum* L.) plantlets. **Scientia Horticulturae** 136: 122-127. 2012a.

SINGH, R.; KALRA, A.; RAVISH, B.S.; DIVYA, S.; PARAMESWARAN, T.N.; SRINIVAS, K.V.N.S.; BAGYARAJ, D.J. Effect of potential bioinoculants and organic manures on root-rot and wilt, growth, yield and quality of organically grown *Coleus forskohlii* in a semiarid tropical region of Bangalore (India). **Plant Pathology** 61: 700-708. 2012b.

SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J.; HUBBEL, D.H. Spores, germination, and germ tubes of vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Microbiology** 31: 965-972. 1985.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3rd edition. New York, NY, USA: Academic Press. 2008.

SORIANO, A.P.; MARTÍN, M.L.S.; PIEDRA, A.P.; AZCÓN, R. Arbuscular mycorrhizal fungi increased growth, nutrient uptake and tolerance to salinity in olive trees under nursery conditions. **Journal of Plant Physiology** 166: 1350-1359. 2009.

SOUZA, E.S.; BURITY, H.A.; SANTO, A.C.E.; SILVA, M.L.R.B. Alternativa de produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares em aeroponia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 31: 153-158. 1996.

SOUZA, R.G.; GOTO, B.T.; SILVA, D.K.A.; SILVA, F.S.B.; SAMPAIO, E.V.S.B.; MAIA, L.C. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and cattle manure in the establishment of *Tocoyena selloana* Shum. in mined dune areas. **European Journal of Biology** 46: 237-242. 2010.

STANCATO, G.C.; SILVEIRA, A.P.D. Associação de fungos micorrízicos arbusculares e cultivares micropropagadas de antúrio. **Bragantia** 65: 511-516. 2006.

STATSOFT. **Statistic for Windows**. CD ROM, Tulsa, USA. 1997.

SYLVIA, D.M. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: Mickelson, S.H., Bigham, J.M. (eds.). **Methods of soil analysis, Part 2. Microbiological and biochemical properties – SSA Book Series 5**, pp. 351-378. 1994.

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

SYLVIA, D.M.; JARSTFER, A.G. Sheared – root inocula of vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology** 58: 229-232. 1992.

TIWARI, P.; ADHOLEYA, A. In vitro co-culture of two AMF isolates *Gigaspora margarita* and *Glomus intraradices* on Ri T-DNA transformed roots. **FEMS Microbiology Letters** 206: 39-43. 2002.

VÁZQUEZ-HERNÁNDEZ, M.V.; ARÉVALO-GALARZA, L.; JEAN-CONTRERAS, D.; ESCAMILLA-GARCÍA, J.L.; MORA-AGUILERA, A.; HERNÁNDEZ-CASTRO, E.;

CIBRIÁN-TOVAR, J.; TÉLIZ-ORTIZ, D. Effect of *Glomus mosseae* and *Entrophospora colombiana* on plant growth, production, and fruit quality of 'Maradol' papaya (*Carica papaya* L.). **Scientia Horticulturae** 128: 255-260. 2011.

VERESOGLOU, S.D.; CHEN, B.; RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. **Soil Biology Biochemistry** 46: 53-62. 2012.

VILARIÑO, A.; SAINZ, M.J. Treatment of *Glomus mosseae* propagules with 50% sucrose increases spore germination and inoculum potential. **Soil Biology and Biochemistry** 29: 1571-1573. 1997.

VODNIK, D.; GRČMAN, H.; MACEK, I.; VAN ELTEREN, J.T.; KOVACEVIC, M. The contribution of glomalin-related soil protein to Pb and Zn sequestration in polluted soil. **Science of the total Environment** 392: 130-136. 2008.

ZAMBOLIM, L., REIS, M.A., COSTA, L.M. Substratos para multiplicação de inóculo do fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Glomus etunicatum*. **Fitopatologia Brasileira** 17: 28-31. 1992.

ZANGARO, W.; NISIZAKI S.M.A.; DOMINGOS, J.C.B.; NAKANO, E.M. Mycorrhizal response and successional status in 80 woody species from south Brazil. **Journal of Tropical Ecology** 19: 315-324. 2003.

_____; NISHIDADE, F.R.; VANDRESEN, J.; ANDRADE, G.; NOGUEIRA, M.A. Root mycorrhizal colonization and plant response are related to root plasticity, soil fertility and successional status of native woody species in Southern Brazil. **Journal of Tropical Ecology** 23: 53-62. 2007.

ZUBEK, S.; MIELCAREK, S.; TURNAU, K. Hypericin and pseudohypericin concentrations of a valuable medicinal plant *Hypericum perforatum* L. are enhanced by arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza** 22: 149-156. 2012.

WANG, F.Y.; SHI, Z.Y.; TONG, R.J.; XU, X.F. Dynamics of phoxim residues in green onion and soil as influenced by arbuscular mycorrhizal fungi. **Journal of Hazardous Materials** 185: 112-116. 2011.

WANG, ZH.; ZANG, JL.; CHRISTIE P.; LI, XL. Influence of inoculation with *Glomus mosseae* or *Acaulospora morrowiae* on arsenic uptake and translocation by maize. **Plant Soil** 311: 235-244. 2008.

WEBER, O.B.; SOUZA, C.C.M.; GONDIN, D.M.F.; OLIVEIRA, F.N.S.; CRISÓSTOMO, L.A.; CAPRONI, A.L.; SAGGIN-JÚNIOR, O. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precoce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 39: 477-483. 2004.

WU, C.G.; LIU, Y.S; HUNG, L.L. Spore development of *Entrophospora kentinensis* in an aeroponic system. **Mycologia** 87: 582-587. 1995.

WU, Q.S.; XIA, R.X. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. **Journal of Plant Physiology** 163: 417-425. 2006.

WU, Q.S.; XIA, R.X.; ZOU, Y.N. Improved soil structure and citrus growth after inoculation with three arbuscular mycorrhizal fungi under drought stress. **European Journal of Soil Biology** 44: 122-128. 2008.

YADAV, K.; SINGH, N.; AGGARWAL, A. Arbuscular mycorrhizal technology for the growth enhancement of micropropagated *Spilanthes acmella* Murr. **Plant Protection Science** 48: 31-36. 2012.

YAO, Q.; ZHU, H.H.; HU, Y.L.; LI, L.Q. Differential influence of native and introduced arbuscular mycorrhizal fungi on growth of dominant and subordinate plants. **Plant Ecology** 196: 261-268. 2008.