

Fábio Sérgio Barbosa da Silva

**Fase assimbiótica, produção, infectividade e
efetividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA)
em substratos com adubos orgânicos**

Recife

Fevereiro/2006

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Micologia
Pós-Graduação em Biologia de Fungos
(Nível Doutorado)

Fábio Sérgio Barbosa da Silva

**Fase assimbiótica, produção, infectividade e efetividade de fungos
micorrízicos arbusculares (FMA) em substratos com adubos orgânicos**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração:
Micologia Aplicada

Orientadora:
Dra. Leonor Costa Maia

Co-orientadora:
Dra. Adriana M. Yano-Melo

Recife

Fevereiro/2006

**Fase assimbiótica, produção, infectividade e efetividade de fungos micorrízicos
arbusculares (FMA) em substratos com adubos orgânicos**

Fábio Sérgio Barbosa da Silva

Comissão examinadora


Membros Titulares



Dra. Leonor Costa Maia (Depto. de Micologia, UFPE – Orientadora)



Dr. Aldo Vilar Trindade (Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical)



Dr. Rildo Sartori Barbosa Coelho (Depto. de Fitossanidade, UFRPE)



Dra. Sandra Farto Botelho Trufem (Universidade São Marcos)



Dra. Sônia Valéria Pereira (Instituto Tecnológico de Pernambuco)

Membros suplentes



Dr. Nataniel Franklin de Melo (Embrapa Semi-Árido)



Dra. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante (Depto. de Micologia, UFPE)

**“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”**

(Do Poema *Para Ser Grande*, Ricardo Reis).

À minha mãe (*in memoriam*)

Dedico

Agradecimentos

A Deus, pela dádiva de estar vivo e saudável e pelo fortalecimento diante das adversidades e caminhos tortuosos, indispensáveis para o amadurecimento espiritual.

À espiritualidade amiga, por me fortalecer diante dos obstáculos e me direcionar a prática do bem.

À minha querida e amada mãe (in memorian) pelo exemplo de humildade, perseverança e amor.

À minha família pelo imenso apoio.

À Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Dra. Leonor Costa Maia, pela orientação e ensinamentos desde o início da caminhada entre os fungos micorrízicos, confiança depositada e por ter acreditado na minha capacidade interior.

À Dra. Adriana Mayumi Yano-Melo, pela imensa ajuda em todas as etapas da Tese, por sempre acreditar que poderia ir mais longe.

Aos professores do Programa, pelos conhecimentos transmitidos, em especial à Dra. Sandra Farto Botelho Trufem e ao Dr. José Luiz Bezerra.

À Embrapa Semi-Árido, pelo uso das instalações para condução e avaliação dos experimentos em campo.

Ao Dr. Nataniel Franklin de Melo, pelo auxílio e discussões valiosas durante a idealização e desenvolvimento dos experimentos em campo.

Ao Dr. Geraldo Milanez de Resende, pela imprescindível ajuda nas recomendações para adubação, delineamento experimental e análise dos dados dos ensaios em campo.

À Dra. Sônia Valéria Pereira, pela transmissão de conhecimentos sobre atividade microbiana.

Ao Dr. Luiz Balbino Morgado, pela permanência no Laboratório de Microbiologia do solo (Embrapa Semi-Árido).

À Dra. Tereza Correia, por disponibilizar o Lab. de Glicoproteínas para análise de glomalina, bem como pelas sugestões.

À Dra. Uided Maaze Tibúrcio Cavalcante, pela disponibilidade em ajudar, especialmente, nas análises estatísticas.

Ao pesquisador Venézio Felipe dos Santos, pelo auxílio com análises estatísticas da Tese.

À Dra. Lindete Martins, pela amizade e conversas agradáveis.

Aos funcionários do Campo Experimental de Bebedouro e do Laboratório de Biotecnologia (Embrapa Semi-Árido), pelo auxílio indispensável na condução e avaliação dos experimentos em campo.

À Michele Dalvina, pela solicitude, paciência e ajuda na purificação da glomalina.

À Aline Melo, Danielle Karla e Nicácio Freitas, pela ajuda dispensada e inúmeros momentos de descontração, deixando o trabalho mais agradável.

À Maryluce Albuquerque pelo apoio nos momentos difíceis e pela sincera amizade demonstrada em vários momentos desta caminhada.

À Helena M. Q. Bezerra, pela várias referências bibliográficas conseguidas.

Aos colegas do Laboratório de Micorrizas pelo convívio.

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

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO GERAL	XVIII
ABSTRACT	XX
INTRODUÇÃO GERAL	22
CAPÍTULO 1 - REVISÃO GERAL	28
1. Adubação orgânica na agricultura	29
2. Atividade microbiana em solos com fertilizantes orgânicos	33
2.1. Atividade de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)	37
2.2. Evolução de CO ₂	39
3. Simbiose micorrízica arbuscular	41
3.1. Papel de FMA na atividade microbiana em solos com adubo orgânico	43
3.2. Glomalina	44
3.3. Germinação de FMA em substratos orgânicos	49
3.4. Colonização intra e extraradicular por FMA em solos com adubo orgânico	54
3.5. Eficiência de FMA em solos com resíduos orgânicos	62
4. Produção de inóculo de FMA	66
4.1. Considerações gerais	66
4.2. Uso de resíduos orgânicos para produção de inóculo de FMA	71
4.3. Infectividade e estocagem de inóculo	73
5. Seleção de inoculantes de FMA para aplicação na agricultura	76
6. A cultura do maracujazeiro-doce	81
7. Referências Bibliográficas	88
CAPÍTULO 2 - Production and infectivity of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi multiplied in a substrate supplemented with Tris-HCl buffer	143
Abstract	145
Introduction	146

Material and methods	147
Results	148
Discussion	149
Acknowledgements	152
References	152
CAPÍTULO 3 - Utilização de resíduos orgânicos na produção de inóculo e na infectividade de fungos micorrízicos arbusculares após estocagem	156
Resumo	158
Introdução	159
Material e métodos	160
Resultados	163
Discussão	168
Agradecimentos	171
Referências Bibliográficas	171
CAPÍTULO 4 - Partially purified extract of glomalin stimulates <i>in vitro</i> growth of <i>Gigaspora albida</i> mycelia	176
Abstract	178
Introduction	179
Material and methods	180
Results	181
Discussion	181
Acknowledgements	185
References	185
CAPÍTULO 5 - Influência de resíduos orgânicos sobre a fase assimbiótica de <i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith (Glomeromycota)	189
Resumo	191
Introdução	192
Material e métodos	193
Resultados	195
Discussão	202
Referências Bibliográficas	205

CAPÍTULO 6 - Fungos micorrízicos arbusculares multiplicados em substrato com adubo orgânico favorecendo a formação de mudas orgânicas de <i>Passiflora alata</i> Curtis: uma questão de adaptação?	210
Resumo	212
Introdução	213
Material e métodos	214
Resultados	216
Discussão	219
Conclusões	223
Referências Bibliográficas	223
CAPÍTULO 7 - Substratos orgânicos na produção de mudas micorrizadas de maracujazeiro-doce e na atividade microbiana do solo.	227
Resumo	229
Introdução	230
Material e métodos	231
Resultados	232
Discussão	236
Conclusão	238
Referências Bibliográficas	238
CAPÍTULO 8 - Produtividade e qualidade de frutos de maracujazeiro-doce em cultivo associado com fungos micorrízicos arbusculares, no Vale do Submédio São Francisco-PE	244
Resumo	246
Abstract	247
Introdução	248
Material e métodos	249
Resultados e Discussão	252
Conclusões	259
Referências Bibliográficas	259
CAPÍTULO 9 - Produção de glomalina e atividade microbiana na rizosfera de maracujazeiros-doce em função do uso de vermicomposto e fontes de	

inóculo micorrízico	264
Resumo	266
Introdução	267
Material e métodos	268
Resultados e Discussão	270
Referências Bibliográficas	279
CONCLUSÕES GERAIS	284
CONSIDERAÇÕES FINAIS	286
PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	289
ANEXOS	292

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
 Capítulo 3	
Figura 1. Produção de esporos de FMA, associados a <i>Panicum miliaceum</i> , em solo adubado com composto orgânico, 50 dias após a inoculação....	163
Figura 2. Produção de esporos de FMA, associados a <i>Panicum miliaceum</i> , em areia adubada com composto orgânico, 50 dias após a inoculação...	164
Figura 3. Produção de esporos de FMA, associados a <i>Panicum miliaceum</i> , em solo adubado com terra vegetal composta, 70 dias após a inoculação.....	165
Figura 4. Produção de esporos de FMA, associados a <i>Panicum miliaceum</i> , em areia adubada com terra vegetal composta, 70 dias após a inoculação.....	165
Figura 5. Produção de esporos de FMA, associados a <i>Panicum miliaceum</i> , em solo adubado com esterco bovino, 50 dias após a inoculação.....	166
Figura 6. Produção de esporos de FMA, associados a <i>Panicum miliaceum</i> , em areia adubada com esterco bovino, 50 dias após a inoculação.....	166
 Capítulo 4	
Figure 1. Germination rate of spores of <i>Gigaspora albida</i> multiplied (60 days) in soil with (number 1) and without (number 2) addition of organic compound, in medium supplemented with increasing concentrations of partially purified glomalin extract, at the 7 th (a) and 14 th (b) days.	182
Figure 2. Mycelial growth of <i>Gigaspora albida</i> multiplied (60 days) in soil with (number 1) or without (number 2) addition of organic compound, in medium supplemented with increasing concentrations of partially purified glomalin extract, at the 7 th (a) and 14 th (b) days after inoculation.....	183

Capítulo 5

- Figura 1. Índice germinativo (A) e crescimento micelial (B) de *Gigaspora albida*, multiplicado em substrato com (Número 1) ou sem (Número 2) adição de composto orgânico, em solo adubado com composto orgânico (CO), terra vegetal (TV) ou esterco bovino (EB)..... 196
- Figura 2. Índice germinativo de isolados de *Gigaspora albida*, produzidos em substrato com (número 1) ou sem (número 2) adubo orgânico, mantido em solo com proporções crescentes de composto orgânico, independentemente da época de avaliação..... 197
- Figura 3. Crescimento micelial de isolados de *Gigaspora albida*, produzidos em substrato com (Número 1) ou sem (Número 2) adubo orgânico, em solo com proporções crescentes de composto orgânico, aos 7 e 14 dias de inoculação..... 198
- Figura 4. Crescimento micelial de isolados de *Gigaspora albida*, produzidos em substrato com (Número 1) ou sem (Número 2) adubo orgânico, mantidos em solo com proporções crescentes de terra vegetal, independentemente da época de avaliação..... 199
- Figura 5. Índice germinativo e crescimento micelial de *Gigaspora albida* em solo adubado com proporções crescentes de esterco bovino, independentemente da fonte de inóculo e da época de avaliação..... 200
- Figura 6. Células auxiliares produzidas no micélio assimbiótico de *Gigaspora albida* (número 1) multiplicado em solo com composto orgânico: (a) hifas e células auxiliares (seta); (b, c) detalhe das células auxiliares alteradas pela ausência de ornamentações..... 201

Capítulo 7

- Figura 1. Colonização micorrízica total, arbuscular e hifálica de *Gigaspora albida* nas raízes de *Passiflora alata* cultivada em solo, solo e terra vegetal (S+TV), solo e esterco bovino (S+EB) e solo e palha de coco (S+PC), 46 dias após inoculação..... 234

Capítulo 8

- Figura 1. Número de frutos por hectare, produtividade, sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT) e relação SST/ATT de frutos de maracujazeiro-doce, pré-inoculados com *Gigaspora albida* provindo da multiplicação em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico e cultivado em solo com adubo químico ou orgânico..... 253

Capítulo 9

- Figura 1. Colonização micorrízica por *Gigaspora albida* multiplicado em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico, em raízes de *Passiflora alata* cultivada em solo adubado com fertilizantes químicos e orgânicos, no Vale do Submédio São Francisco, Petrolina, PE..... 273
- Figura 2. Glomalina facilmente extraível (GFE) de agregados (<1 mm) de solo adubado com fertilizantes químicos ou orgânicos, após cultivo por dez meses com maracujazeiro-doce associado a *Gigaspora albida*, multiplicado em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico, no Vale do Submédio São Francisco, Petrolina, PE..... 275
- Figura 3. Glomalina facilmente extraível (GFE) de agregados (1-2 mm) de solo adubado com fertilizantes químicos ou orgânicos, após cultivo durante dez meses com maracujazeiro-doce associado a *Gigaspora albida*, multiplicado em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico, no Vale do Submédio São Francisco, Petrolina, PE..... 275
- Figura 4. Evolução de CO₂ em solo adubado com fertilizantes químicos ou orgânicos e após cultivo durante dez meses com maracujazeiro-doce associado a *Gigaspora albida*, multiplicado em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico, no Vale do Submédio São Francisco, Petrolina, PE..... 277

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Capítulo 1	
Tabela 1. Exemplos de hospedeiros utilizados na produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA).....	67
Tabela 2. Principais métodos para produção de inóculo de FMA.....	69
Capítulo 2	
Table 1. Production of spores (spores g ⁻¹ substrate) of <i>Acaulospora longula</i> , <i>Gigaspora albida</i> , <i>Glomus etunicatum</i> and <i>Scutellospora heterogama</i> after 85 days associated with <i>Panicum miliaceum</i> , irrigated with nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950), modified by Jarstfer and Sylvia (1992) and supplemented with Tris-HCl.....	148
Table 2. Infectivity (%) of the inocula of AMF produced in a sand vermiculite substrate irrigated with Hoagland and Arnon nutrient solution modified and supplemented with Tris-HCl buffer, calculated at time 0 (without storage) and after maintenance for 120 days at 4 °C and at room temperature (28 °C).....	149
Capítulo 3	
Tabela 1. Caracterização química e físico-química dos resíduos orgânicos e dos substratos diluentes, utilizados na produção de inóculo de FMA.	161
Tabela 2. Infectividade de inóculo de FMA, em milho, após multiplicação em substrato com 10% de composto orgânico, em solo (S) ou em areia (A), tendo como hospedeiro o painço, antes e após manutenção a 4 °C e a 28 °C, por 120 dias.....	167
Tabela 3. Infectividade de inóculo de FMA, em milho, após multiplicado em substrato com 10% de terra vegetal em areia tendo como hospedeiro painço, antes e após manutenção a 4 °C e a 28 °C, por 120 dias.....	168

Capítulo 4

Table 1. Chemical characterization of the substrates used for multiplication of <i>Gigaspora albida</i>	180
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo 5

Tabela 1. Caracterização química dos substratos utilizados para multiplicação de <i>Gigaspora albida</i>	193
Tabela 2. Caracterização química dos resíduos orgânicos utilizados nos experimentos.....	194
Tabela 3. Índice germinativo e crescimento micelial de esporos de <i>Gigaspora albida</i> em solo adubado com composto orgânico (CO), terra vegetal (TV) ou esterco bovino não maturado (EB), independentemente da época de avaliação e das proporções dos resíduos.....	200

Capítulo 6

Tabela 1. Condições da produção e densidade dos inóculos de FMA.....	214
Tabela 2. Caracterização química dos substratos utilizados para multiplicação dos FMA e para cultivo do maracujazeiro-doce	215
Tabela 3. Diâmetro do caule, altura, massa seca da parte aérea e área foliar de mudas de maracujazeiro-doce, inoculadas com FMA multiplicados em substrato com adubo orgânico e cultivadas em solo com ou sem composto orgânico, 42 dias após a inoculação.....	217
Tabela 4. Percentual de colonização micorrízica total (CT), por hifas (CH) e arbúsculos (CA) e produção de glomalina em mudas de maracujazeiro-doce, inoculadas com isolados de FMA multiplicados em substrato com adubo orgânico e cultivadas em solo com ou sem composto orgânico, 42 dias após a inoculação, em casa de vegetação.....	218
Tabela 5. Percentual de colonização vesicular por <i>Acaulospora longula</i> , multiplicado em substrato com (Org) ou sem (S) adubo orgânico, nas raízes de maracujazeiro-doce cultivado em solo com ou sem	

composto orgânico, 42 dias após a inoculação, em casa de vegetação.....	219
Tabela 6. Número de esporos de FMA na rizosfera de mudas de maracujazeiro-doce inoculadas com isolados multiplicados em solo e em substrato com adubo orgânico, independentemente do tipo de substrato de cultivo, 42 dias após a inoculação.....	219
 Capítulo 7	
Tabela 1. Caracterização química dos substratos utilizados para produção de mudas de maracujazeiro-doce.....	231
Tabela 2. Níveis de significância para adubação, fungos e interação entre as variáveis avaliadas.....	233
Tabela 3. Influência da composição do substrato na área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA), diâmetro do caule (DC) e respiração microbiana (RM), em mudas de maracujazeiro-doce independentemente da micorrização com <i>Gigaspora albida</i> , 46 dias após inoculação, em casa-de-vegetação.....	233
Tabela 4. Influência da micorrização com <i>Gigaspora albida</i> na área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA), diâmetro do caule (DC) e respiração microbiana (RM), em mudas de maracujazeiro-doce 46 dias após inoculação, em casa-de-vegetação	234
Tabela 5. Influência da composição do substrato de cultivo e da micorrização com <i>Gigaspora albida</i> na atividade enzimática geral do solo, altura e produção foliar de mudas de maracujazeiro-doce, 46 dias após inoculação, em casa-de-vegetação.....	235

Capítulo 8

Tabela 1. Caracterização química dos substratos utilizados para: a) multiplicação de <i>Gigaspora albida</i> ; b) preparo das mudas de <i>Passiflora alata</i> ; c) do vermicomposto utilizado na adubação orgânica para cultivo do maracujazeiro-doce.....	250
Tabela 2. Níveis de significância para adubação e fungos e interação dos parâmetros avaliados na produtividade do maracujazeiro-doce no Vale de São Francisco, Petrolina, PE.....	257
Tabela 3. Valores médios para as características de frutos de maracujazeiro-doce, micorrizado com <i>Gigaspora albida</i> (produzido em solo com (Org) ou sem (S) 10% de composto orgânico) e cultivado em solo adubado com fertilizantes químicos ou orgânicos.....	258

Capítulo 9

Tabela 1. Caracterização química dos substratos utilizados para multiplicação de <i>Gigaspora albida</i> , preparo das mudas de <i>Passiflora alata</i> e como adubação orgânica para cultivo do maracujazeiro-doce.....	269
Tabela 2. Níveis de significância para adubação, fungos e interação entre as variáveis estudadas, em cultivo do maracujazeiro-doce no Vale de São Francisco, Petrolina, PE.....	271
Tabela 3. Influência da fertilização química e orgânica nas características químicas do solo após cultivo durante dez meses do maracujazeiro-doce associado a <i>Gigaspora albida</i>	272
Tabela 4. Influência da fertilização química e orgânica na concentração de glomalina total (GT) em duas classes de agregados (<1 e 1-2 mm), na densidade de esporos de FMA (DE) e na atividade enzimática geral (AEG) de solo após cultivo do maracujazeiro-doce associado a <i>Gigaspora albida</i> durante dez meses.....	272
Tabela 5. Coeficientes de correlação simples (r) entre as variáveis estudadas....	278

RESUMO GERAL

Adubos orgânicos têm baixo custo que podem constituir alternativa para produção de inoculante de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), sendo necessário verificar o seu efeito sobre os fungos propagados nesses substratos. Foi investigado o efeito de adubos orgânicos sobre FMA e de ambos sobre a produção de mudas e produtividade de maracujazeiro-doce. Em laboratório foram avaliados: fase assimbiótica de *Gigaspora albida*, em meio com glomalina e em solo com adubos orgânicos. Em casa de vegetação determinou-se: substratos eficientes para produção de inóculo infectivo, eficiência micorrízica na produção de mudas orgânicas de maracujazeiro-doce e adubos mais indicados para a produção de mudas micorrizadas e a atividade microbiana. Em campo avaliou-se o efeito de fontes de inóculo e tipos de adubo na produtividade e características dos frutos, atividade microbiana e produção de glomalina. A aplicação de tampão Tris-HCl estimulou a produção de esporos de FMA e o inóculo manteve-se infectivo após armazenamento por 120 dias a 4 °C. Composto orgânico e terra vegetal adicionados ao substrato para cultivo de FMA aumentaram a esporulação, mas os benefícios foram dependentes do substrato diluente (solo ou areia) e do FMA, porém quando o substrato foi adubado com esterco bovino houve redução na reprodução dos fungos. A manutenção de inóculos produzidos em substrato com adubo orgânico por 120 dias, em condições ambientais (28 °C), não afeta a infectividade, embora as repostas sejam dependentes do substrato diluente, da fonte de matéria orgânica e do FMA testado. Maior germinação e crescimento micelial de *G. albida* ocorreram em solo adubado com composto orgânico (53 % e 17,1 mm), seguido de terra vegetal (42,8 % e 13,9 mm) e esterco bovino (23,7 % e 5,2 mm). A germinação de *G. albida* não foi afetada, mas o crescimento micelial foi favorecido pela adição de 30 µg mL⁻¹ de glomalina no meio. Mudas de maracujazeiro-doce associadas a *G. albida* (multiplicado em substrato com adubo orgânico), cultivadas em solo + composto orgânico, apresentam maior crescimento, colonização micorrízica e redução de 60 % no tempo de formação. Plantas de maracujazeiro-doce cultivadas em solo com esterco bovino cresceram duas vezes mais do que as mantidas em substrato à base de palha de coco, terra vegetal ou solo, com a micorrização favorecendo a formação de mudas mais desenvolvidas e a atividade enzimática no solo. O uso de fertilizantes químicos e a inoculação com *G. albida* produzido em solo + composto orgânico propiciaram a formação de maior número de frutos (64.777 frutos ha⁻¹) com reduzida acidez (0,75 % de ácido cítrico g⁻¹ polpa), elevada °Brix/acidez (24,32) e maior produtividade (11,08 t ha⁻¹). Em condições de campo, a produção de glomalina, a emissão de CO₂ e a atividade de hidrólise do diacetato de

fluoresceína (FDA) foram favorecidas pelo uso de vermicomposto, com os benefícios sendo modulados pela fonte de inóculo micorrízico empregada na fase de formação das mudas. Adubos orgânicos podem estimular a atividade microbiana, a fase assimbiótica do FMA, a produção de inóculo micorrízico infectivo e efetivo em promover o crescimento de mudas e a produção de frutos de maracujazeiro-doce com qualidade.

Palavras-Chave: adubação orgânica; micorriza arbuscular, *Passiflora alata*.

ABSTRACT

Organic fertilizers have low cost and many of them constitute an alternative for production of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). However, it is necessary to verify the effects of the organic fertilizers on the propagation of these fungi. The effect of organic fertilizer on AMF and the effect of both on production of seedlings and productivity of sweet passion fruit were investigated. The asymbiotic phase of *Gigaspora albida* in water agar medium plus glomalin and in soil with organic fertilizer was evaluated in the laboratory. Substrates for production of infective inoculum, mycorrhizal efficiency for production of organic seedlings of sweet passion fruit and the amendment more feasible to increase production of mycorrhizal seedlings and microbial activity were investigated in greenhouse experiments. In the field, the effect of inoculum sources and fertilizer type on production and characteristics of the fruits, and the microbial activity and production of glomalin were determined. The utilization of Tris-HCl buffer stimulated AMF spores formation and the inoculum was still infective after 120 days at 4 °C. Organic compost and vegetal manure added to the substrate for AMF cultivation increased sporulation, but the benefits were dependent on the diluent substrate (sand or soil) and on the AMF species, however, when the substrate received cattle manure, reproduction of the AMF was reduced. The maintenance of the inocula produced in substrates with organic fertilizer for 120 days, under environmental conditions (28 °C), did not affect infectivity, although the responses depended on the diluent substrate, source of organic matter and tested AMF. Higher germination rate and mycelial growth of *G. albida* occurred in soil receiving organic compost (53% and 17.1 mm), followed by vegetal manure (42.8% and 13.9 mm) and cattle manure (23.7% and 5.2 mm). Germination of *G. albida* was not affected but the mycelial growth was benefited by the addition of 30 µg mL⁻¹ of glomalin in the growth medium. Seedlings associated with *G. albida* (multiplied in substrate with organic fertilizer), cultivated in soil + organic compost, presented higher growth, higher mycorrhizal colonization and 60% reduction of the seedling formation period. Growth of plants cultivated in soil with bovine manure was higher than that maintained in substrate with coconut straw, vegetal manure or soil. The mycorrhization enhanced the development of seedlings and soil enzymatic activity. Use of chemical fertilizers and the inoculation with *G. albida* produced in soil + organic compost enhanced formation of fruits (64,777 fruits ha⁻¹) with low acidity (0,75 % of citric acid g⁻¹ pulp), high °Brix/acidity (24.32) and higher productivity (11, 08 t ha⁻¹). Under field conditions, production of glomalin, CO₂

evolution and (FDA) diacetate fluorescein hydrolysis activity were benefited by the application of vermicompost, which was modulated by the source of mycorrhizal inoculum used during seedling formation. Organic fertilizers can stimulate the microbial activity, the AMF asymbiotic phase and the production of mycorrhizal inoculum infective and effective in promoting plant growth and formation of high quality sweet passion fruits.

Key words: organic amendment; arbuscular mycorrhiza, *Passiflora alata*.

Introdução geral

INTRODUÇÃO GERAL

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) tem potencial para utilização biotecnológica, pois maximizam o crescimento e a produtividade de culturas de interesse econômico (Ilbas & Sahin 2005) por favorecer a absorção de nutrientes com baixa mobilidade na solução do solo e aumentar a tolerância dos vegetais a estresses bióticos e abióticos (Smith & Read 1997).

Apesar dos benefícios comprovados, a aplicação dos FMA na agricultura tem sido dificultada devido ao caráter biotrófico obrigatório do micobionte (Jarstfer & Sylvia 1992), sendo necessário o estabelecimento da simbiose para que ao final do ciclo do fungo ocorra produção de propágulos que possam ser utilizados como inóculo. Várias metodologias têm sido propostas visando a maximização da produção de inoculante micorrízico (Sieverding 1991), tais como a utilização de diferentes substratos (Gaur & Adholeya 2000), multiplicações em sistemas hidropônicos (Hawkins & George 1997) e aeropônicos (Jarstfer & Sylvia 1992), estabelecimento de cultivos *in vitro* com raízes transformadas (Pawlowska *et al.* 1999), e a utilização de substâncias estimuladoras do desenvolvimento dos FMA (Karandashov *et al.* 2000). Algumas dessas metodologias, embora propiciando elevada esporulação (St-Arnaud *et al.* 1996), apresentam alto custo de instalação e manutenção e podendo resultar na produção de propágulos com reduzida viabilidade (Gryndler *et al.* 2003). A incorporação de adubos orgânicos na composição de substratos é metodologia de baixo custo que pode estimular a produção de inóculo de FMA (Gaur & Adholeya 2005; Douds *et al.* 2005), constituindo oportunidade para pré condicionar os fungos para substratos com alta fertilidade e para o manejo orgânico.

A manutenção da infectividade do inóculo é fator limitante da qualidade do inoculante a ser comercializado e, nesse aspecto, o armazenamento adequado é fundamental. Recomendações têm sido feitas para estocagem dos propágulos nas condições em que foram produzidos (Louis & Lim 1988b) ou em baixas temperaturas (Juge *et al.* 2002; Kim *et al.* 2002). No entanto, poucos estudos foram desenvolvidos nesta área (Sylvia 1999), especialmente com FMA multiplicados em substrato com adubo orgânico, sendo necessário determinar, pontualmente, as condições de estocagem para cada inoculante de FMA.

A busca pela sustentabilidade nos sistemas agrícolas tem favorecido a utilização de fontes orgânicas que maximizem a produção vegetal sem comprometer a qualidade edáfica. Adubos orgânicos melhoram a agregação de partículas do solo (Díaz *et al.* 1994), a

capacidade tamponante e de troca catiônica (Wagner & Wolf 1988), o teor de nutrientes (Paul & Clarck 1989), além de maximizar a atividade microbiana do solo (Fernandes *et al.* 2005). No solo, os FMA constituem a maior parte da biomassa microbiana (Kennedy 1998) e influenciam a atividade da microbiota edáfica (Duponnois *et al.* 2005), com os benefícios dependentes da espécie de FMA empregada (Caravaca *et al.* 2004). No entanto, a contribuição de fontes de inóculo de uma mesma espécie de FMA sobre tais processos não foi determinada.

Em sistemas para formação de mudas ou em plantios, recomenda-se a aplicação de adubos orgânicos (Caravaca *et al.* 2002b). Esses fertilizantes podem atuar de modo benéfico sobre os FMA, pois favorecem o desenvolvimento dos fungos tanto no solo (Douds *et al.* 2005) quanto na raiz (Cavender *et al.* 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre o efeito desses materiais sobre a germinação e o crescimento micelial inicial de FMA. Essas etapas são importantes para o estabelecimento da associação micorrízica arbuscular e a aplicação inadvertida de doses ou fontes impróprias pode comprometer programas de inoculação de plantas que passam por fase de viveiro, assim como o potencial germinativo de FMA em campos manejados organicamente.

Para proporcionar efetivos benefícios em culturas de interesse econômico, faz-se necessária prévia seleção de inóculo de FMA, visto que há diferentes graus de compatibilidade hospedeiro-micobionte (Sylvia *et al.* 2003), em função, entre outros motivos, dos isolados de uma mesma espécie apresentarem fisiologia diferenciada (Munkvold *et al.* 2004). Além disso, é desejável que o FMA utilizado em programas de inoculação seja eficiente em aumentar o crescimento vegetal e o teor de nutrientes, produzindo elevada biomassa no solo (Abbott *et al.* 1994).

O estabelecimento de sistemas orgânicos vem sendo incentivado, e os vegetais produzidos apresentam elevado valor agregado (Bettiol & Ghini 2003). No entanto, a fertilidade do solo (especialmente P) em tais sistemas pode comprometer a atuação de FMA (Freitas *et al.* 2004); por isso, o emprego de fungos adaptados, eficientes e com habilidade em esporular sob tais condições é desejável (Bagyaraj & Reddy 2005). Esses “edafotipos” podem ser obtidos pela multiplicação dos fungos em substratos com adubos orgânicos, ricos em fósforo. A aplicação desses materiais seleciona e mantém fungos mais eficientes para o hospedeiro (Muthukumar & Udaiyan 2002).

Melhores respostas dos hospedeiros pela associação com isolados adaptados a vários fatores do solo foram relatadas (Gonzalez-Chavez *et al.* 2002; Calvente *et al.* 2004; Ananthakrisnan *et al.* 2004), porém os benefícios do uso de inóculo micorrízico produzido em

substratos com adubos orgânicos na produção orgânica vegetal são pouco conhecidos. No entanto, a comunidade de FMA de áreas com manejo orgânico foi mais efetiva em promover o crescimento vegetal, quando comparado ao emprego daquela oriunda de áreas com cultivo convencional (Scullion *et al.* 1998; Eason *et al.* 1999).

Os FMA produzem no micélio externo uma glicoproteína específica, a glomalina (Rillig *et al.* 2003b), envolvida na agregação do solo (Rillig *et al.* 2002a), favorecendo a hidrofobicidade de partículas (Wright & Upadhyaya 1996) e aumentando a aeração do substrato (Wright & Upadhyaya 1998), fatores que resultam na melhoria do crescimento do hospedeiro (Piotrowski *et al.* 2004). Essa biomolécula pode ser utilizada na avaliação do impacto de práticas agrícolas (Rillig 2004b). Mesmo considerada a maior fonte de carbono da matéria orgânica, função anteriormente creditada aos ácidos húmicos (Wright & Nichols 2002), não se determinou a influência desta proteína sobre os processos assimbióticos de FMA.

Apesar da ubiquidade e da importância da glomalina em vários tipos de solo (Wright & Upadhyaya 1996; Wright & Anderson 2000), a influência do aumento da fertilidade do solo, decorrente da aplicação de adubos orgânicos, sobre a dinâmica de produção dessa glicoproteína não está esclarecida. Recentemente Wuest *et al.* (2005) registraram que a aplicação de $22,4 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de esterco não maturado favoreceu a produção de glomalina.

Além dos fatores do solo, a produção de glomalina é dependente da espécie de FMA (Rillig *et al.* 2005), mas ainda não se determinou se há variação intraespecífica (entre isolados). Este aspecto é importante na seleção de inoculantes micorrízicos para aplicação na agricultura (Miller & Jastrow 2000), pois o uso de fungos com maior potencial para produção desta proteína no solo é indicado por melhorar as condições edáficas e assim o crescimento do hospedeiro (Rillig 2004b).

Passiflora alata Curtis, conhecida popularmente como maracujá-doce, é a segunda espécie de *Passiflora* L. em importância econômica no Brasil (Vasconcellos *et al.* 2001a). Os frutos, que apresentam polpa doce e levemente acidulada, possuem elevado valor agregado, podendo alcançar US\$1,00/fruto (Braga & Junqueira 2000), constituindo cultura alternativa e rentável. Os principais mercados para exportação do maracujá-doce são os europeus, norte-americanos e canadenses (Cançado Júnior *et al.* 2000). No entanto, devido à falta de informações técnicas, essa passiflorácea ainda não é cultivada no Vale do Submédio São Francisco, um dos principais pólos de exportação de frutas do nordeste brasileiro.

Um dos problemas para instalação, manutenção e renovação de maracujais é a produção de mudas certificadas (Melletti 2001; Leonel & Pedroso 2005). Nesta fase, são

requeridos substratos ricos em nutrientes, que apresentam adubos orgânicos na composição (Prado *et al.* 2004). Uma das maneiras de reduzir os custos de produção é a aplicação de FMA selecionados, como registrado para *Passiflora edulis* Sims *f. flavicarpa* Deg. (Soares e Martins, 2000; Cavalcante *et al.* 2001; 2002a) e *Passiflora ligulares* Juss (Rodríguez *et al.* 1995). O maracujazeiro-doce também é responsivo à inoculação com FMA selecionados (Silva *et al.* 2004b), o que resulta em aumento de crescimento e redução do tempo de formação das mudas (Silva *et al.* 2004b; Anjos *et al.* 2005). Porém, não está determinado se os FMA podem contribuir para o crescimento de mudas de *P. alata* em substratos com adubo orgânico.

Nesse contexto, a avaliação do impacto da adubação orgânica sobre as diferentes fases da simbiose e de seus subprodutos (glomalina) poderá contribuir para o conhecimento e compreensão da fisiologia de FMA na agricultura sustentável. Aliado a isto, é importante a seleção de substratos de baixo custo que maximizem a produção de inóculo de FMA infectivo e efetivo, em viveiro e em condições de campo, e que os fungos contribuam para melhoria da qualidade do solo em sistemas orgânicos.

Diante disso, os objetivos deste trabalho foram: a) selecionar substratos orgânicos eficientes para produção de inóculo de FMA; b) avaliar a infectividade do inóculo produzido, após estocagem a 4 °C e a 28 °C; c) determinar o efeito de resíduos orgânicos e de glomalina sobre a germinação e o crescimento micelial assimbiótico de FMA multiplicados em substratos com ou sem aplicação de adubo orgânico; d) testar a eficiência dos inóculos produzidos na formação de mudas orgânicas de maracujazeiro-doce; e) selecionar substratos orgânicos para produção de mudas micorrizadas de maracujazeiro-doce; f) verificar o efeito de FMA provindos da multiplicação em substratos com adubo orgânico, na produtividade do maracujazeiro-doce, em cultivo químico e orgânico; g) avaliar o impacto da aplicação de vermicomposto e de fontes de inóculo micorrízico sobre a atividade microbiana e a produção de glomalina, em condições de campo.

Após extensiva revisão de literatura (Capítulo 1) foram selecionados substratos promissores para produção de inóculo de FMA, utilizando painço como planta hospedeira (Capítulos 2 e 3). A partir das combinações de substratos mais favoráveis à esporulação dos fungos, avaliou-se a infectividade do inóculo pelo método da percentagem média de infecção, em três ocasiões: logo após ter sido produzido e após armazenamento a 4 e 28 °C por 120 dias (Capítulos 2 e 3). Com a finalidade de averiguar se a multiplicação de FMA em substrato com adubo orgânico favorece a germinação e o crescimento micelial assimbiótico em relação ao inóculo produzido em solo, foram conduzidos experimentos de germinação *in vitro*, em meio

com glomalina (Capítulo 4) e em solo adubado com resíduos orgânicos (Capítulo 5). Inóculos produzidos em substrato com adubo orgânico, selecionados no Capítulo 3, foram testados quanto à eficiência em promover o crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*) em solo adubado com composto orgânico (Capítulo 6). No capítulo 7, foram testados resíduos orgânicos de baixo custo, visando confirmar se os benefícios da micorrização de *P. alata* com *Gigaspora albida* Schenck & Smith multiplicado em substrato com adubo orgânico, observados no capítulo anterior, eram evidenciados quando se empregava outra fonte orgânica. Por fim, conduziu-se experimento em campo, para validar os dados obtidos em casa de vegetação e confirmar se a utilização de FMA propagados em substrato com adubo é mais eficiente do que o uso de fungos multiplicados em solo. Foi testado o efeito desses FMA: na fase produtiva do maracujazeiro-doce (Capítulo 8) e na atividade microbiana, avaliada pela emissão de CO₂, atividade hidrolítica do diacetato de fluoresceína (FDA) e produção de glomalina (Capítulo 9).

Revisão Geral

1. Adubação orgânica na agricultura

A sociedade moderna tem se preocupado com a qualidade dos produtos de origem agrícola consumidos (Bettiol & Ghini 2003), havendo interesse nos sistemas de produção que devem fazer uso de práticas que permitam a elevada produtividade das culturas sem comprometimento da sustentabilidade do solo (Mielniczuk 1999). Esses requisitos podem ser atingidos quando os teores de matéria orgânica no solo estão adequados (Silva *et al.* 2004a). Esta é considerada, desde a antiguidade, o principal fator de fertilidade do solo (Kiehl 1985), sendo a sua aplicação uma prática clássica na agricultura. Nesse contexto, deve-se optar por práticas de manejo e uso do solo que conservem os teores de matéria orgânica (Bayer & Mielniczuk 1999).

Um dos expressivos problemas aliados ao desenvolvimento das grandes cidades é a produção de resíduos sólidos oriundos de atividades urbanas, industriais e agrícolas (Sossai *et al.* 2000). O processo de incorporação de resíduos orgânicos, por outro lado, é uma prática agrícola antiga (Gouveia & Pereira Neto 2000), que atualmente vem sendo empregada para conservação e melhoria da qualidade edáfica (Borie *et al.* 2002) e para disposição desses resíduos (Jahnel *et al.* 1999). Além disso, com o aumento nos custos da fertilização mineral, o uso de resíduos orgânicos visando aumentar a fertilidade do solo tem sido incentivado (Tedesco *et al.* 1999).

No solo, a matéria orgânica é formada por resíduos vegetais e animais e produtos resultantes da decomposição (Paul & Clarck 1989), apresentando carbono na forma de polifenóis (50%), polissacarídeos (20%), complexos nitrogenados (20%) e por outras formas (10%) (Wagner & Wolf 1998). Apenas bactérias autotróficas e plantas são capazes de sintetizá-la a partir de elementos simples. Vários microrganismos atuam na decomposição, resultando na mineralização dos nutrientes e formação de húmus (Feigl *et al.* 1998). Silva *et al.* (2004a) mencionam que a matéria orgânica do solo é subdividida em: resíduos orgânicos, fração “leve”, biomassa microbiana, substâncias não húmicas e húmicas.

A presença de substâncias húmicas nos adubos orgânicos é responsável por gerar cargas negativas (Brady 1990), que adsorvem cátions nas micelas coloidais pelos grupamentos carboxílicos (COOH), fenólicos e alcoólicos (OH) dos ácidos húmicos (Cerri *et al.* 1992); com isso, a retenção eletrostática evita a perda de nutrientes pela água (Kiehl 1998). As substâncias húmicas participam de várias reações, pois apresentam carga negativa variável (dependente de pH) que interfere na ionização de grupamentos carboxílicos (Novotny &

Martin-Neto 1999). Além disso, os ácidos húmicos podem favorecer o crescimento vegetal via estímulo de microrganismos benéficos (Linderman & Davis 2001).

A incorporação de fontes orgânicas afeta a dinâmica física, química e biológica do solo (Pavan & Chaves 1998). No âmbito físico, a adição de resíduos favorece a aeração, a infiltração, a retenção de umidade (cerca de cinco vezes) e a agregação de partículas do solo (Wagner & Wolf 1998; Tedesco *et al.* 1999; Celik *et al.* 2004). Com relação ao aspecto químico, aumenta o pH, o poder tampão do substrato, além de contribuir para suprimento de micronutrientes via formação de quelatos com ácidos orgânicos de baixo peso molecular, que reduzem a precipitação como óxidos no solo (Arden-Clarke & Hodges 1988; Bayer & Mielniczuk 1999). Físico-quimicamente, os resíduos aumentam a capacidade de troca catiônica (CTC) e a saturação por bases (V%) (Abreu Jr. *et al.* 2001; Bulluck *et al.* 2002). Esses benefícios são potencializados pela elevada superfície específica da matéria orgânica (Silva *et al.* 2004a). Por fim, as fontes orgânicas favorecem os organismos do solo (Crecchio *et al.* 2001), fornecendo substratos energéticos e condições adequadas para o desenvolvimento da microbiota (Nsabimana *et al.* 2004; Gryndler *et al.* 2005).

A aplicação de adubos orgânicos pode ainda reduzir a população de fitopatógenos, por aumentar a abundância de antagonistas (Bulluck *et al.* 2002). Aumentos de 30% e 50% na diversidade e abundância de organismos, respectivamente, em sistemas que fazem uso de adubos orgânicos em relação a sistemas de produção convencional têm sido apontados (Bengtsson *et al.* 2005).

Apesar dos benefícios da incorporação de resíduos nos substratos para produção vegetal, a presença de patógenos (Santos *et al.* 1998), bem como níveis tóxicos de metais (Alves & Passioni 1997) e elementos orgânicos podem inviabilizar sua aplicação (Angel & Heckman 1986). Pascual *et al.* (1999a) observaram que a qualidade do solo foi melhorada pela adubação com resíduos frescos em relação aos compostados; todavia, o risco de utilização de formas brutas é decorrente da instabilidade química, da presença de metais pesados ou microrganismos patogênicos.

Existem vários tipos de resíduos orgânicos, de diferentes naturezas (vegetal, animal e mista), consistências (sólida, líquida e semilíquida) e origens (industrial, urbana e agrícola), que podem ser empregados na agricultura; no entanto, sua aplicação vai depender da disponibilidade do produto (Kiehl 1985). Exemplos de resíduos comumente empregados incluem: vinhaça, lodo de curtume e de estação de tratamento de efluentes, composto orgânico, resíduos frigoríficos, tortas vegetais, entre outros (Tedesco *et al.* 1999). Esses materiais podem ser incorporados ao solo “frescos”, sem prévio tratamento, ou após

compostagem, que consiste na transformação microbiológica da matéria orgânica crua em substrato estabilizado, sendo esta conversão bioquímica realizada por bactérias e fungos (Kiehl 1985).

O processo de formação do composto orgânico é controlado, sendo afetado pela temperatura, aeração e grupos de microrganismos presentes na matéria a ser compostada (Pereira Neto 1996). Durante a compostagem, organismos patogênicos são eliminados (Elorrieta *et al.* 2003), enquanto o volume do material a ser compostado é reduzido (Zibilske 1998).

De acordo com Kiehl (1998), a compostagem inclui três fases: uma rápida, de fitotoxidade, com formação de ácidos orgânicos e toxinas, seguida da etapa de bioestabilização do substrato e uma terceira fase, denominada de humificação, é acompanhada da mineralização dos nutrientes (Jahnel *et al.* 1999). Nas fases iniciais do processo de compostagem ocorre elevado consumo de O₂ e alta atividade enzimática, que são gradativamente reduzidos com a maturação do composto; em contrapartida, geralmente ocorre aumento na biomassa microbiana e na concentração de ácidos húmicos com a evolução do processo de compostagem (Tiquia 2005).

A fase de maturação é importante na compostagem, pois possibilita a eliminação de fitotóxicos durante a humificação do material. Testando a qualidade do composto orgânico em leira de resíduos urbanos, Gouveia & Pereira Neto (2000) observaram que em leiras maturadas, os teores de matéria orgânica estavam dentro do recomendado para se classificar como fertilizante orgânico (27%). Similarmente, Jahnel *et al.* (1999) observaram que parâmetros como pH, N, produção de CO₂, temperatura, % de matéria orgânica e relação C/N, podem ser indicadores de maturação do composto, sendo a temperatura e a relação C/N indicadores isolados do grau de maturação, desde que sejam mantidas aeração e umidade adequadas durante o processo. Recentemente, Tiquia (2005) sugeriu a atividade da desidrogenase como indicador de maturação de composto orgânico.

Kiehl (1998) diferencia composto maturado daquele com qualidade agrícola; no primeiro caso o material é resultante da degradação da matéria orgânica, originando o húmus; no entanto, um composto maturado pode não apresentar características que o enquadram como fertilizante orgânico com qualidade, tal como teores de carbono abaixo de 9,8 ou acima de 13,4 % (Texeira & Mandelli 1991).

O composto orgânico pode ser utilizado na produção vegetal, tanto em horticultura, floricultura e fruticultura (Alves & Passioni 1997), como na recuperação de áreas degradadas (Leopoldino & Pereira Neto 2000), pois é um tipo de adubo estável (Palenzuela *et al.* 2002).

A adubação provoca alterações físico-químicas no solo que proporcionam aumento na estabilização e na agregação de partículas e na capacidade tamponante e de troca catiônica (Pereira Neto 1996), além de reduzir a prática de calagem. Outra importante função é a liberação de fósforo orgânico para mineralização por ação de fosfatases (Joner & Jakobsen 1994). A adição de materiais orgânicos compostados reduz a densidade aparente e aumenta a porosidade do solo, melhorando o desenvolvimento das raízes (Caravaca *et al.* 2002a). Esses benefícios são mais importantes em solos intemperizados e ácidos, como os tropicais e subtropicais (Bayer & Mielniczuk 1999).

Outra fonte de adubo empregada na agricultura é o vermicomposto, resultado da ação conjunta de minhocas (geralmente do gênero *Eisenia* Savigny 1826) e microrganismos sobre a decomposição da matéria orgânica crua (Arancon *et al.* 2003a). O processo é denominado vermicompostagem e o produto final, também conhecido como húmus de minhoca, é amplamente utilizado (Atiyeh *et al.* 2002a). Vários vegetais podem ser beneficiados na fase de viveiro (Arancon *et al.* 2003a) e em campo (Arancon *et al.* 2005) pelo uso de vermicomposto como adubo, porém as doses empregadas (Atiyeh *et al.* 2002a) e o material utilizado para a vermicompostagem podem interferir nas respostas obtidas (Arancon *et al.* 2003a; 2005). O fornecimento de nutrientes aliado ao efeito condicionante do solo e ao favorecimento da atividade da microbiota edáfica são os principais benefícios do uso desses fertilizantes (Atiyeh *et al.* 2000). Além disso, hormônios sintetizados durante a vermicompostagem e a presença de ácidos húmicos favorecem o crescimento vegetal (Atiyeh *et al.* 2002b). Os ácidos húmicos presentes em tais materiais podem atuar como hormônios, promovendo o crescimento vegetal, ou servir como adsorventes para reguladores de crescimento presentes neste tipo de adubo (Arancon *et al.* 2003b; 2004).

Geralmente se observa maior desenvolvimento de plantas cultivadas em solos com resíduos orgânicos, em comparação com aquelas não adubadas ou recebendo adubos químicos (Santos *et al.* 1998; 2001; Sossai *et al.* 2000; Perez-Murcia *et al.* 2006). Entretanto, em algumas situações, o uso de fertilizantes químicos inicialmente proporciona maior produtividade em relação ao emprego de adubos orgânicos. Esse tipo de resposta decorre da existência de fase Lag para mineralização dos nutrientes presentes no adubo (Gleissman *et al.* 1996). Apesar disso, o mercado para exportação de vegetais produzidos sob manejo orgânico está em franca expansão devido aos benefícios que proporciona (Bettiol & Ghini 2003), alcançando preços elevados, quando comparado ao de vegetais cultivados em sistemas convencionais (Gleissman *et al.* 1996).

2. Atividade microbiana em solos com fertilizantes orgânicos

O solo deve ser preservado, pois representa a base para a sustentação da biota, favorecendo trocas de energia por meio de reações bioquímicas e por processos biológicos (Fillip 2002). A manutenção ou aumento na sua qualidade assegura a produção de alimentos e subsídios para a sustentação da população humana (Ditzler & Tugel 2002), devido à ligação com a qualidade da água e do ar (Doran *et al.* 2002) e por ser fator determinante na sustentabilidade agrícola (Crecchio *et al.* 2001). No entanto, a utilização de práticas ou ações antrópicas inadequadas tem comprometido a saúde do solo e, conseqüentemente, a sustentabilidade dos ecossistemas naturais ou manejados.

Existem vários parâmetros físicos, químicos e biológicos que podem indicar alterações na qualidade do solo. Entre eles, os índices microbiológicos e bioquímicos são recomendados por serem mais sensíveis a variações na fertilidade e na qualidade edáfica (Pinzari *et al.* 1999; Steinberg 1999; García *et al.* 2000a), em relação aos parâmetros físicos e químicos (Ros *et al.* 2003) e por serem correlacionados com o aumento no crescimento vegetal (Garcia *et al.* 1998). Exemplos de índices empregados são: atividade enzimática geral (Ghini *et al.* 1998; Adam & Duncan 2001) ou específica (Caravaca *et al.* 2002d; Bending *et al.* 2002), biomassa microbiana do solo (Chaoui *et al.* 2003), atividade respiratória (Grisi, 1978; Bettiol *et al.* 2002; Ros *et al.* 2003), e presença de polissacarídeos de origem microbiana (Frighetto 2000). Metodologias mais refinadas, como a determinação da estrutura de comunidades microbianas, pelo perfil de fosfolipídeos (PFLA), de ácidos nucléicos e da utilização de fontes de carbono (Steinberg 1999; Hill *et al.* 2000) são também usadas.

O emprego de fertilizantes orgânicos pode aumentar os teores de P (García *et al.* 1992; Sarangi *et al.* 2001), de matéria orgânica (Sarangi *et al.* 2001; Lee *et al.* 2004), o pH (Eghball 2002; Mäder *et al.* 2002), capacidade de troca catiônica (Antolín *et al.* 2005) e condutividade elétrica (Sarangi *et al.* 2001) do solo, fatores que podem contribuir diretamente para maior atividade da microbiota edáfica (Bayer & Mielniczuk 1999). A maior atividade microbiana (respiração e atividade enzimática) em tais sistemas pode ser atribuída à maior exsudação radicular dos vegetais (Pascual *et al.* 1999b). Em solos adubados com fertilizantes orgânicos ocorre o melhor desenvolvimento do vegetal e conseqüente exsudação, que serve de fonte energética para os microrganismos rizosféricos (Marinari *et al.* 2000; Izquierdo *et al.* 2005).

A presença de materiais com potencial de biodegradação serve como fonte de energia adicional e de nutrientes, estimulando a microbiota autóctone do solo (Ros *et al.* 2003; Fernandes *et al.* 2005), e é considerada um dos principais fatores que afetam a atividade

microbiana (Medina *et al.* 2004a). No entanto, os benefícios da aplicação de adubos são dependentes do tipo e da dose empregada (Cervelli *et al.* 1978; Albiach *et al.* 2000; Pankhurst *et al.* 2005).

Enzimas são catalisadores biológicos que aceleram reações. No solo, são produzidas por plantas, animais e principalmente por microrganismos (Kiss *et al.* 1975; García *et al.* 2000a). Essas biomoléculas traduzem a funcionalidade do sistema, pois integram propriedades físicas, químicas e biológicas (Aon & Colaneri 2001), além de participarem de vários processos metabólicos (Nannipieri *et al.* 2002), como a mineralização de nutrientes (Bandick & Dick 1999; Izquierdo *et al.* 2003), sendo consideradas indicadoras de fertilidade atual ou potencial do solo (Canet *et al.* 2000).

A atividade enzimática do solo é devida a ação de enzimas intracelulares (biônticas), constituindo parte da biomassa microbiana, ou extracelulares (abiônticas), que são liberadas durante metabolismo e morte celular e que podem estar imobilizadas ou complexadas nos colóides minerais e orgânicos do solo (Kiss *et al.* 1975; Burns 1982). Essa imobilização torna as enzimas mais protegidas contra a desnaturação ou ao ataque de proteases (Burns 1978; García *et al.* 1994; 2000a), reduzindo sua atividade (Alexander 1977). Mesmo fora da célula, essas biomoléculas são importantes nos processos de mineralização de nutrientes (Marcote *et al.* 2001), pois respondem rapidamente à presença de substratos, e os subprodutos dessa degradação enzimática estimulam os microrganismos a secretarem mais enzimas, que dão continuidade à catálise do substrato (Burns *et al.* 1982; Pascual *et al.* 2002). Por outro lado, em solos arenosos e com reduzidos teores de matéria orgânica (< 1%), a atividade enzimática é decorrente, principalmente, de enzimas intracelulares (Caravaca *et al.* 2002d).

De acordo com Burns (1986) as enzimas que catalisam reações no solo podem estar associadas a células metabolicamente ativas ou não proliferantes, como esporos; além disso, encontram-se ligadas a células mortas ou, ainda, formando complexos, principalmente por forças de van der Waals; no entanto, pontes de hidrogênio podem estar envolvidas no processo (Burns 1978; Cepeda *et al.* 2003).

O uso de enzimas é apontado como ferramenta útil no monitoramento da qualidade edáfica (Nannipieri *et al.* 2002), pois podem ser alteradas por mudanças ambientais (Bandick & Dick 1999), informando sobre processos bioquímicos que ocorrem no solo (Kizilkaya & Bayrali 2005). A atividade enzimática pode ser alterada por vários fatores, como a presença e o tipo de vegetal (Nsabimana *et al.* 2004; García *et al.* 2002; 2005; Izquierdo *et al.* 2005), a profundidade do solo (Aon & Colaneri 2001b; Lalander *et al.* 2000; Fernandes *et al.* 2005), o tipo de adubação (Bhattacharyya *et al.* 2001; Kaushik *et al.* 2005), práticas agrícolas (Balota

et al. 2004; Roldán *et al.* 2005) e as ações antrópicas, que comprometem a saúde do solo (Brohon *et al.* 2001). Os principais grupos estudados na enzimologia do solo são as hidrolases e as oxidorreduções, sendo também avaliadas as atividades de liases e transferases (García *et al.* 2000a).

Entre os fatores que podem favorecer a atividade de enzimas no solo, destaca-se o aumento nos teores de matéria orgânica, visto que este parâmetro é considerado indicador chave da fertilidade (Roldán *et al.* 2003) e comumente solos com fertilizantes orgânicos têm a atividade enzimática maximizada (García *et al.* 1998; Marschner *et al.* 2003; Antolín *et al.* 2005; Caravaca *et al.* 2005b; Fernandes *et al.* 2005; Kaushik *et al.* 2005). Este benefício é geralmente atribuído ao fornecimento de substratos para a microbiota e à presença de microrganismos e enzimas aderidas ao adubo aplicado (Pascual *et al.* 1998; Debosz *et al.* 2002; Izquierdo *et al.* 2005). A atividade de enzimas ligadas aos ciclos de nutrientes é frequentemente alterada. Essas mudanças podem também ser decorrentes de alterações dos produtos de reação, bem como à presença de co-fatores e inibidores, decorrentes da adubação (Albiach *et al.* 2000). O aumento nos teores de C (Balota *et al.* 2004; Bandick & Dick 1999; Díaz-Raviña *et al.* 2005), de N (Frankenberger & Dick 1983; Böhme *et al.* 2005) e valores de CTC (Frankenberger & Dick 1983), decorrente da aplicação de adubos orgânicos, é positivamente correlacionado com a atividade de enzimas no solo.

A aplicação racional de fertilizantes orgânicos pode trazer benefícios a curto e em longo prazo. Após dois anos, a aplicação de composto orgânico de resíduos urbanos no solo foi suficiente para estimular a atividade da desidrogenase e da β -glicosidase (Crecchio *et al.* 2001). Por outro lado, a fertilização por 120 anos com esterco bovino ($12 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) aumentou a atividade da invertase e da xilanase (Poll *et al.* 2003) em relação ao solo não fertilizado. Efeitos cumulativos benéficos da aplicação de $15 \text{ t ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de esterco bovino por mais de 100 anos sobre a atividade microbiana também foram referidos por Böhme *et al.* (2005).

Devido à heterogeneidade dos adubos orgânicos, a composição química do fertilizante empregado pode modular a atividade de enzimas no solo (Marcote *et al.* 2001). Albiach *et al.* (2000) evidenciaram máximo estímulo na atividade de enzimas (desidrogenase, fosfodiesterase, fosfatase alcalina, arilsulfatase e urease) quando o solo foi fertilizado com composto orgânico, em relação ao uso de resíduos de ovinos, lodo de esgoto, vermicomposto ou solução de ácidos húmicos, como alternativas de fertilização. Benítez *et al.* (2000) também registraram que o benefício da adubação orgânica no substrato de cultivo de *Capsicum annum* L., sobre a atividade da urease, da fosfatase e da desidrogenase foi dependente do adubo

aplicado. De modo semelhante, Lee *et al.* (2004) evidenciaram que a atividade da fosfatase (ácida e alcalina) e da desidrogenase foi maximizada com a aplicação de composto de alimentos, em relação ao uso de composto orgânico comercial.

O estado de maturação da fonte orgânica aplicada também influencia a atividade enzimática. Pascual *et al.* (2002) registraram que a persistência da atividade da urease e da fosfatase ácida foi maior quando se empregou adubo compostado, em relação ao uso de materiais frescos. O uso de materiais compostados na agricultura pode ser recomendado, visto que há aumento na fertilidade (García *et al.* 1991) e na atividade microbiana do solo (Carpenter-Boggs *et al.* 2000), além de resolver o problema da disposição de resíduos no ambiente (García-Gil *et al.* 2000). Por outro lado, com emprego de materiais não compostados, pode ocorrer rápido aumento na atividade microbiana, devido à presença de materiais facilmente degradáveis (Masciandaro *et al.* 2000). Diante da diversidade de respostas observada quando se emprega fertilizantes orgânicos, ensaios preliminares são necessários antes da recomendação para o agricultor.

A dose de resíduo aplicado também pode interferir na atividade de microrganismos do solo (Pascual *et al.* 1999b; Höflich *et al.* 2000). Lalander *et al.* (2000) observaram que a quantidade de resíduo líquido de esterco suíno interferiu na atividade de fosfatase (ácida e alcalina), urease, arilsulfatase e desidrogenase. García *et al.* (1994), por sua vez, também verificaram que a aplicação de 195 e 260 t ha⁻¹ de resíduo sólido urbano, favoreceu a atividade da urease, fosfatase, e β -glicosidase, em relação ao solo não fertilizado e ao que recebeu apenas 65 e 130 t ha⁻¹ do resíduo. Por outro lado, doses acima de 15 t ha⁻¹ de resíduo orgânico reduziram a atividade de invertase, protease, amilase e desidrogenase (Sarangi *et al.* 2001).

A crescente utilização de fertilizantes minerais tem recebido atenção devido à destruição de fontes renováveis e aos impactos que causam no solo (Calvo 1999), porém este problema pode ser minimizado com o uso adequado de resíduos orgânicos que favorecem a microbiota edáfica (Albiach *et al.* 2000; Roldán *et al.* 2003). Em geral o emprego desses materiais estimula a atividade enzimática em relação ao uso de fertilizantes minerais sintéticos (García-Gil *et al.* 2000; Lalander *et al.* 2000; Mäder *et al.* 2002; Lee *et al.* 2004; Aracon *et al.* 2004; 2005). Böhme *et al.* (2005) observaram aumento da atividade da fosfatase alcalina, β -glicosidase e urease em solo com esterco bovino, em relação à fertilização mineral. De modo similar, Marcote *et al.* (2001) obtiveram mais benefícios do uso de composto orgânico e esterco bovino sobre a atividade de enzimas do que o emprego de fertilizantes químicos. Chakrabarti *et al.* (2000) também referiram que uso de esterco bovino favoreceu a

atividade da urease e da fosfatase ácida, quando comparado ao emprego de uréia + superfosfato + muriato de potássio.

Por outro lado, a aplicação conjunta de fertilizantes minerais e orgânicos pode favorecer a atividade enzimática edáfica, como evidenciado por Goyal *et al.* (1999), os quais registraram aumento na atividade de desidrogenase, urease e fosfatase alcalina quando o solo foi fertilizado com palha de trigo associada a fertilizantes minerais (uréia + superfosfato simples).

2.1. Atividade de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA)

Substâncias fluorogênicas sintéticas, como os ésteres de fluoresceína, que são hidrolisados por enzimas, podem servir como indicativo do estágio metabólico celular (Lundgren 1981). O subproduto liberado (fluoresceína) é positivamente correlacionado com a atividade enzimática (Kramer & Guilbault 1963), a respiração microbiana (Södestrom 1977), o conteúdo de ATP (Stubberfield & Shaw 1990) e a produção de biomassa fúngica (Swisher & Carrol 1980). Entre os acetatos de bases fenólicas mais utilizados, destaca-se o FDA (3'-6' diacetato de fluoresceína), uma fluoresceína esterificada a dois radicais acetato (apolar e incolor) que, após hidrólise enzimática, torna-se polar e fluorescente (Alef 1995a; Adam & Duncan 2001). A reação pode ser mediada por enzimas produzidas por fungos, bactérias, algas, protozoários e tecidos animais (Brunnius 1980; Schnürer & Rosswall 1982; Battin 1997; Monteiro 2000); por isso, fornece medida da atividade enzimática geral do solo (Bandick & Dick 1999).

As enzimas que atuam no processo estão ligadas à parede de microrganismos (Stubberfield & Shaw 1990) e envolvidas na decomposição da matéria orgânica do solo, sendo proteases, lipases e esterases não específicas, intracelulares ou não, capazes de clivar o FDA (Nannipieri *et al.* 2003). Vantagens da utilização do FDA como medida da atividade enzimática geral do solo incluem a simplicidade, rapidez e sensibilidade do método (Schnürer & Rosswall 1982). Porém, a possível adsorção da fluoresceína liberada nas partículas do solo (Ghini *et al.* 1998) e a hidrólise abiótica do FDA, em extremos de pH e na presença de algumas substâncias, constituem limitações para uso do método (Schnürer & Rosswall 1982; Clarke *et al.* 2001).

A hidrólise de FDA tem sido empregada em vários sistemas. Battin (1997) considerou que a metodologia é sensível para avaliação da atividade biológica e esterásica total em biofilmes constituídos por algas, bactérias e fungos embebidos em matrix polissacarídica.

Outra aplicação é o monitoramento da formação de biofilmes bacterianos em tubulações de água potável (de Rosa *et al.* 1998). Fontvielle *et al.* (1992) sugeriram que o método pode ser empregado na avaliação da atividade microbiana em lodo ativado de sistemas aquáticos.

O impacto da aplicação de xenobióticos (Elsgaard *et al.* 2003) e herbicidas (Araújo *et al.* 2003), da rotação de culturas (Larkin 2003), do tipo de vegetal (Bandick & Dick, 1999; Nsabimana *et al.* 2004) e da aplicação de rejeito salino (Pereira *et al.* 2004) sobre a atividade microbiana do solo também foi avaliado por essa metodologia.

A aplicação do método de hidrólise de FDA constitui alternativa para se averiguar o impacto de práticas agrícolas na atividade enzimática geral (Aon *et al.* 2001; Taylor *et al.* 2002), porém as respostas podem ser dependentes da profundidade em que o solo foi coletado e da fenologia do hospedeiro. Aon & Colaneri (2001) observaram correlações positivas entre a hidrólise de FDA e os teores de C, N e a relação C/N apenas na fase de plantio da soja [*Glycine max* (L.) Merr]; no período de floração e de pré-colheita a relação não se manteve.

A abundância de bactérias, assim como os teores de matéria orgânica, a capacidade de troca catiônica, a biomassa microbiana e a atividade de várias enzimas (arilsulfatase, desidrogenase, β -glicosidades e fosfatases ácida e alcalina) foram positivamente correlacionadas com a atividade de hidrólise de FDA, tanto em solo argiloso quanto arenoso (Taylor *et al.* 2002). Correlações positivas entre atividade de hidrólise de FDA e emissão de CO₂ também foram referidas (Ghini *et al.* 1998; Araújo *et al.* 2003; Nasabimana *et al.* 2004).

A incorporação de adubos orgânicos pode favorecer a atividade microbiana no solo (Graham *et al.* 2002) e teores de MO do solo têm sido positivamente relacionados à atividade hidrolítica do FDA (Ghini *et al.* 1998; Bandick & Dick 1999; Nsabimana *et al.* 2004; Díaz-Raviña *et al.* 2005). Pérez Sarmentero *et al.* (1994) verificaram que a aplicação de 20 t ha⁻¹ de composto orgânico incrementou a atividade de hidrólise do FDA em relação ao controle sem adubação ou à aplicação de adubos químicos, com o aumento positivamente relacionado aos teores de matéria orgânica do solo. Com resultados semelhantes, Debosz *et al.* (2002) verificaram que a aplicação de 4,2 t ha⁻¹ de lodo de esgoto ou 17 t ha⁻¹ de composto orgânico estimulou a atividade enzimática geral do solo, sendo o benefício atribuído à presença de microrganismos metabolicamente ativos nos resíduos aplicados.

Ghini *et al.* (2002) registraram aumento na atividade hidrolítica de FDA com o emprego de adubos orgânicos, porém o benefício foi dependente do tipo de adubo aplicado. Cama de frango favoreceu a atividade enzimática geral, o que não ocorreu quando lodo de esgoto e casca de *Pinus* foram empregados como alternativa para adubação. De modo semelhante, Pankhurst *et al.* (2005) verificaram que a aplicação de resíduos orgânicos no

cultivo de cana-de-açúcar favoreceu a atividade hidrolítica do FDA, com os benefícios dependentes da fonte utilizada. Por outro lado, Bandick & Dick (1999) não verificaram incrementos na hidrólise de FDA em solo adubado com 11,2 t ha⁻¹ ano⁻¹ de esterco, em relação ao solo com fertilizantes minerais (90 kg N ha⁻¹). Isso reforça a necessidade de avaliação do impacto de fontes orgânicas ao substrato antes da recomendação de adubação, tanto na fase de formação de mudas quanto na fase produtiva de vegetais.

2.2. Evolução de CO₂

Um dos métodos mais antigos e amplamente utilizados para se avaliar a atividade microbiana do solo é a estimativa da taxa respiratória (Nsabamina *et al.* 2004), seja através da liberação de dióxido de carbono (CO₂) ou do consumo de oxigênio (O₂). A produção de CO₂ é parte final do metabolismo de organismos heterotróficos (Hernández & García 2003), refletindo a atividade da microbiota aeróbica e anaeróbica (Gama-Rodrigues 1999). O CO₂ liberado pela microbiota edáfica pode ser quantificado por várias metodologias (Alef 1995b), mas freqüentemente se utiliza solução básica (KOH ou NaOH) para “capturar” o CO₂, que é titulada com HCl (Grisi, 1978). Este é um dos métodos mais simples que fornece estimativas de evolução de CO₂ (Van Cleve *et al.* 1979). Dessa forma, a respiração basal traduz a capacidade metabólica da microbiota edáfica em degradar compostos orgânicos em condições aeróbicas (Brohon *et al.* 2001; Nannipieri *et al.* 2003). Por outro lado, em solos com elevados teores de carbonato pode haver liberação abiótica do CO₂ (Alef 1995b; Hernández & García 2003).

Solos com maior emissão de CO₂ são geralmente considerados com qualidade superior, pois existe elevada atividade de microrganismos capazes de oxidar a matéria orgânica (Abdelhamid *et al.* 2004). Esse parâmetro, portanto, é importante na avaliação do emprego de adubos orgânicos visando aumento na fertilidade do solo (García *et al.* 2000b). Por outro lado, maiores taxas de CO₂ evoluído podem significar redução nos estoques de carbono, pois existe maior perda do carbono nativo do solo (Vasconcelos *et al.* 1998). Werner (1997) considera que a maior perda de C via evolução de CO₂, em cultivos orgânicos, é compensada por maior entrada de C no sistema pela incorporação de resíduos orgânicos, sendo as perdas comparativamente menores às observadas em sistemas convencionais.

Fatores como umidade, temperatura e disponibilidade de nutrientes afetam a atividade respiratória da microbiota edáfica (Alef 1995b). A aplicação de materiais orgânicos também pode interferir na atividade respiratória dos microrganismos do solo (Lundquist *et al.* 1999;

Bhattacharyya *et al.* 2001; Abdelhamid *et al.* 2004) devido, principalmente, aos teores de carbono solúvel em água (Pascual *et al.* 1999b), pois o resíduo aplicado serve com fonte de energia (Ros *et al.* 2003; Caravaca *et al.* 2005b), além de melhorar a aeração (disponibilidade de oxigênio) do substrato (Chaoui *et al.* 2003). Esse comportamento pode ser constatado pelas correlações positivas entre evolução de CO₂ e carbono orgânico (Nsabimana *et al.* 2004).

A adição de palha de milho favoreceu a emissão de CO₂ em solo sob diferentes tipos de manejo (plantio direto ou adubação verde) (Vasconcelos *et al.* 1998). Palha de trigo, associada à fertilização mineral, também estimulou a mineralização do C, em relação ao uso de adubos químicos (Goyal *et al.* 1999). A aplicação de resíduos sólidos de origem urbana também incrementou a respiração microbiana, e o aumento foi relacionado à liberação de exsudados radiculares, gerados pelo melhor desenvolvimento do vegetal no solo fertilizado com adubo orgânico (Pascual *et al.* 1999b). De modo semelhante, Debosz *et al.* (2002) e Fernandes *et al.* (2005) registraram que a respiração basal também foi estimulada com a aplicação de resíduos orgânicos ao solo.

Sistemas de cultivo orgânico, devido aos elevados teores de matéria orgânica, podem apresentar duas vezes mais CO₂ evoluído do que sistemas convencionais (Bettiol *et al.* 2002). Sarangi *et al.* (2001) registraram aumento de 143% nas emissões de CO₂ em solo fertilizado com 17,5 t resíduo ha⁻¹, quando comparado ao tratamento com adubos sintéticos (N:P:K 80:40:40 kg ha⁻¹). Similarmente, a aplicação de composto orgânico, associado ou não a preparações fermentadas (biodinâmicas), favoreceu a respiração microbiana, em relação ao solo não adubado ou recebendo fertilizantes minerais (Carpenter-Boggs *et al.* 2000). Composto orgânico também foi fonte eficaz em estimular a respiração de solo cultivado com trigo (*Triticum aestivum* L.), quando comparado à aplicação de fertilizantes químicos (Chaoui *et al.* 2003). Esses benefícios sobre a atividade microbiana podem ser atribuídos ao suprimento de fósforo pelo adubo orgânico, que fornece maior balanço nutricional em relação ao uso de adubos químicos (Marinari *et al.* 2000).

O carbono adicionado na forma de composto orgânico é liberado em duas fases: na primeira ocorre degradação dos compostos mais simples e a segunda é caracterizada pela mineralização mais lenta das substâncias resistentes à degradação (Caravaca *et al.* 2005b). Com isso, o tempo decorrido da aplicação do adubo interfere na atividade respiratória dos microrganismos do solo. García-Gil *et al.* (2004) verificaram que a aplicação de 40 t ha⁻¹ de lodo de esgoto estimulou a emissão de CO₂ após nove meses da aplicação do adubo, benefício que não foi registrado após 36 meses da adubação, possivelmente devido à exaustão de substratos facilmente degradáveis. No entanto, aplicações sucessivas de resíduo podem

favorecer a respiração basal (Antolín *et al.* 2005). Geralmente, em sistemas orgânicos observa-se correlações positivas entre a atividade de várias enzimas e a evolução de CO₂ (Antolín *et al.* 2005; García *et al.* 2005).

O uso de fertilizantes orgânicos não serve apenas para incrementar a produtividade e melhoria da qualidade de solos agrícolas; no semi-árido da Espanha, a aplicação adequada tem sido prática na recuperação de áreas desertificadas (Guerrero *et al.* 2000), com o emprego desses fertilizantes aumentando os teores de M.O. do solo (Pascual *et al.* 1998) e favorecendo a atividade respiratória e de enzimas (Caravaca *et al.* 2002a; Ros *et al.* 2003; Caravaca *et al.* 2004).

3. Simbiose Micorrízica Arbuscular

Através do sistema radicular as plantas estabelecem relações com fungos do solo. Em algumas situações, a interação pode ser patogênica, em outras não produz qualquer impacto evidente no vegetal, mas há muitos casos em que a relação é benéfica para os dois parceiros. Um exemplo clássico dessa associação é a simbiose mutualística entre certos grupos de fungos do solo e raízes da maioria das plantas, conhecida como micorriza (Newsham *et al.* 1995). Nesta interação, o fotobionte é favorecido pelo aumento na absorção de água e nutrientes do solo, enquanto o micobionte recebe fotossintatos produzidos pelo vegetal (Smith & Read 1997).

Com base na morfoanatomia do sistema radicular colonizado pelos fungos, as micorrizas são agrupadas em três grandes grupos: ectomicorrizas, ectendomicorrizas e endomicorrizas. Entre os tipos de endomicorrizas, a arbuscular, que é caracterizada pela formação de arbúsculos no córtex radicular do hospedeiro, é cosmopolita ocorrendo tanto em Briophytas e Pteridophytas, quanto em plantas vasculares (Smith & Read 1997). Este tipo de simbiose é formado por cerca de 200 espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que constituem atualmente o Filo Glomeromycota (Schussler *et al.* 2001). Evidências de reprodução sexuada não foram obtidas, mas os esporos de FMA apresentam núcleos geneticamente distintos (Hijri & Sanders 2005), que conferem diversidade genética e funcional a esse grupo de fungos.

A simbiose micorrízica arbuscular é antiga e os FMA parecem ter sido determinantes no processo de colonização das plantas no ambiente terrestre. Registros fósseis indicam que esses fungos surgiram há 460 milhões de anos (Ordoviciano), período em que a flora era possivelmente representada por Briophytas (Redecker *et al.* 2000). A parceria entre os

simbiontes teve êxito e pode ser atualmente constatada nas diversas regiões do mundo (ártica, temperada e tropical) (Mehrotra 2005). Além disso, os fungos micorrízicos potencialmente determinam a estrutura de comunidades vegetais (van der Heidjen *et al.* 1998), enquanto as plantas parecem controlar a diversidade de FMA nos ecossistemas (Johnson *et al.* 2005).

Após germinação e crescimento micelial assimbiótico, os FMA colonizam o córtex radicular dos vegetais, com formação de estruturas inter e intracelulares (Smith & Read 1997) que, após intensa dicotomização, originam os arbúsculos, considerados sítios de troca entre os parceiros (Azcón-Aguilar & Barea 1997). Apesar da ocorrência generalizada no Reino Vegetal, apenas dois tipos morfológicos de colonização têm sido evidenciados: o denominado *Arum*, que se caracteriza por intensa colonização intercelular e formação de arbúsculos altamente ramificados e o *Paris*, que é reconhecido pela formação de hifas enoveladas intracelulares (Karandashov & Bucher 2005).

A formação da simbiose é regulada pela expressão de genes do fungo e da planta e ativada pela percepção e transdução de sinais primários; no entanto, a origem (fúngica ou vegetal) e a natureza desses sinais não são conhecidas (Karandashov & Bucher 2005). Recentemente, Pamiske (2005) referiu que vegetais liberam estrigolactonas (grupo dos sesquiterpenos lactona) como possíveis ativadores da ramificação de hifas de FMA no processo de colonização radicular.

O custo da presença do fungo na raiz pode ser de 4-20% do conjunto de fotossintatos (Morgan *et al.* 2005), que geralmente é revertido em maior aporte de nutrientes para o vegetal (Bratek *et al.* 2002; Ilbas & Sahin 2005). Ao mesmo tempo em que ocorre a colonização intraradicular, começa a produção de micélio extraradicular, responsável pela absorção de nutrientes e formação de esporos no solo (Sylvia 1990). Adicionalmente, o micélio externo pode formar estruturas ramificadas absorptivas, conhecidas como 'BAS' (do inglês, *branched absorbing structure*), que também estão envolvidas na aquisição de nutrientes, apresentando alta atividade metabólica (Bago 2000).

Os FMA são considerados os principais componentes da microbiota do solo (Oehl *et al.* 2003), sendo um dos principais benefícios da simbiose micorrízica arbuscular para o hospedeiro o aumento na absorção de nutrientes com baixa mobilidade no solo, como o P (Johnson *et al.* 2005). Entretanto, o papel dos FMA na absorção de elementos considerados altamente móveis no solo, como o nitrogênio, também foi evidenciado (Newsham *et al.* 1995). Esses fungos são importantes no estabelecimento e manutenção de sistemas sustentáveis, que visam a conservação da capacidade produtiva do solo, redução no uso de insumos e energia e otimização da ciclagem de nutrientes (Bagyaraj & Reddy 2005).

Apesar da ocorrência generalizada e ausência de especificidade hospedeira (Allen *et al.* 1995), pois os FMA podem se associar a cerca de 200.000 espécies vegetais (Johnson *et al.* 2005), compatibilidade funcional entre os parceiros tem sido registrada (Sylvia *et al.* 2003). Mesmo assim, alguns vegetais não formam simbiose micorrízica arbuscular. Entre esses, estão representantes das famílias Amaranthaceae, Brassicaceae, Chenopodiaceae, Commelinaceae, Cyperaceae, Juncaceae, Polygonaceae e Proteaceae (Moreira & Siqueira 2002).

A importância da simbiose micorrízica arbuscular é conhecida tanto em sistemas naturais como manejados, sendo atualmente considerada um dos principais componentes de sistemas sustentáveis (Jeffries *et al.* 2003). No entanto, as dificuldades na comercialização de inoculantes, associado à falta de conscientização dos agricultores sobre os benefícios do uso de FMA têm sido empecilho à aplicação efetiva desses fungos na agricultura, devendo-se determinar a viabilidade econômica da inoculação (Sieverding 1991).

3.1. Papel de FMA na atividade microbiana em solos com adubo orgânico

No solo, os FMA constituem a maior parte da biomassa microbiana (Kennedy 1998), desempenhando importante papel na agregação de partículas (Rillig 2004b) e no ciclo de nutrientes, especialmente do P (Smith & Read 1997); porém, pouco se conhece sobre a contribuição desses microrganismos na atividade microbiana do solo. Duponnois *et al.* (2005) registraram alterações na atividade microbiana quando *Acácia holoserica* Cunn. Ex G. Dan estava simbioticamente associada a *Glomus intraradices* Schenck & Smith. Por outro lado, Wamberg *et al.* (2003) verificaram benefício da inoculação de *G. intraradices* na evolução de CO₂ de solo cultivado com *Pisum sativa* L., apenas quando as plantas estavam no estágio reprodutivo. O principal mecanismo micorrízico no aumento da atividade microbiana do solo são as alterações na liberação de carboidratos pelas raízes de plantas micorrizadas, que afetaria a atividade dos microrganismos rizosféricos (Wamberg *et al.* 2003; Rillig 2004a), visto que tais compostos servem de fonte de nutrientes para a microbiota do solo (Izquierdo *et al.* 2005). Contudo, não se pode descartar a influência direta da trama de hifas na melhoria da qualidade do solo (Rillig 2004a).

A micorrização de *Dorycnium pentaphyllum* Scop com *Glomus deserticola* Trappe, Bloss & Menge ou *G. intraradices* favoreceu a atividade de enzimas (desidrogenase, urease, fosfatase ácida, e β -glicosidase) em solo adubado com resíduo de beterraba + *Aspergillus*

niger Tiegh + fosfato de rocha, em relação ao solo sem adubo, sendo os maiores valores observados quando as plantas estavam associadas a *G. deserticola*, indicando que os benefícios podem ser dependentes da espécie de FMA (Caravaca *et al.* 2004). No sistema ectomicorrízico, *Pinus halepensis* Mill e *Pisolithus arhizus* (Pers) Rauschert, em solo com 100 t ha⁻¹ de resíduo orgânico municipal, houve aumento na atividade de enzimas (desidrogenase, catalase, urease, protease e fosfatase ácida) e na evolução de CO₂ (García *et al.* 2000b). Com isso, observa-se a importância da aplicação conjunta de FMA e adubos orgânicos na modificação das características biológicas do solo (Medina *et al.* 2004b).

Apesar dos FMA desempenharem importante papel na agricultura orgânica (Jeffries *et al.* 2003) e contribuírem para aumentar a atividade microbiana, Caravaca *et al.* (2002a) observaram que a aplicação de composto orgânico superou o efeito da micorrização (*Olea europaea* L. e *G. intraradices*) em aumentar a atividade de enzimas (β -glicosidase, fosfatase ácida e desidrogenase). De modo similar, Medina *et al.* (2004a) registraram que a aplicação de resíduos foi o principal fator que alterou a atividade da β -glicosidase e da fosfatase ácida na rizosfera de *D. pentaphyllum*, em relação à inoculação com FMA nativos.

3.2. Glomalina

Um dos benefícios relevantes da simbiose micorrízica arbuscular é o favorecimento da formação de agregados do solo (Bethlenfalvay *et al.* 1999), importante para o bom desenvolvimento do hospedeiro (Rillig *et al.* 2002a). Inicialmente, pensava-se que a contribuição do FMA neste processo era devido apenas à trama de hifas presentes no solo (Tisdall & Oades 1982). A possível ação de subprodutos atuando como agentes cimentantes foi considerada (Tisdall 1994), visto que moléculas, como polissacarídeos de origem microbiana, atuam no processo de agregação (Foster 1981); contudo, a natureza bioquímica desse(s) componente(s) não era conhecida. Em meados da década de 1990, Wright & Upadhyaya (1996) observaram a presença de uma proteína que era extraída do solo em grandes quantidades (na ordem de miligramas) quando se utilizava citrato de sódio em elevadas temperaturas (121 °C). Testes imunoreativos indicaram que essa biomolécula é produzida apenas por FMA (Wright *et al.* 1996) e por isso foi denominada glomalina, numa referência à antiga ordem Glomales na qual os FMA estavam classificados (Morton & Benny 1990). Esta proteína contribui de modo similar às raízes e à cobertura vegetal, no processo de agregação de partículas do solo, sendo o efeito neste processo mais efetivo do que a trama micelial (Rillig *et al.* 2002b).

A glomalina é positivamente relacionada com a produção de micélio extraradicular (Treseder *et al.* 2004); e as hifas externas são responsáveis pela síntese deste glicoconjugado, que também é encontrado em esporos e raízes colonizadas (Wright *et al.* 1996). Recentemente, Driver *et al.* (2005) sugeriram que a maior parte da glomalina no solo não provém de liberação passiva ou de secreção hifálica, visto que 80% da proteína estava fortemente ligada à parede de hifas e esporos de *G. intraradices*, não estando simplesmente associada à superfície da hifa.

Bioquimicamente, a glomalina é uma glicoproteína, formada por 60% de carboidrato (Wright & Upadhyaya, 1998) que se liga à porção protéica por ligações glicosídicas do tipo *N* (resíduos de asparagina) (Voet *et al.* 2002; Wright *et al.* 1998), apresentando aminoácidos alifáticos (valina, por exemplo) e aromáticos na cadeia polipeptídica (Rillig *et al.* 2001b). A molécula é insolúvel, hidrofóbica (Wright & Upadhyaya 1996), com presença de resíduos glicídicos tipo manose, glicose, N-acetil galactosamina e di/triacetil chitobiose (Wright *et al.* 1996) e elevada quantidade de ferro (0,8-8%) na sua estrutura química (Wright & Upadhyaya, 1998). Apresenta-se em gel SDS-PAGE com duas bandas (67 e 94 KD), devido à presença de proteínas com diferentes graus de glicosilação nos extratos brutos, enquanto em gel para proteínas nativas uma banda mostra focalização isoeletrica entre pH 7,3-7,5 e a outra em pH 6,9 (Wright *et al.* 1996). Igualmente a outras substâncias, como ácidos graxos e suberinas, a glomalina constitui a fração humina da matéria orgânica (Hayes & Clapp 2001), sendo considerada o maior componente da fase orgânica do solo (27%), função anteriormente creditada aos ácidos húmicos, que representam apenas 8% (Wright & Nichols 2002). Rillig (2005) sugere que a glomalina pode ser classificada como hidrofobina, pois está presente na superfície de hifas e forma uma camada hidrofóbica na interface água-ar.

Tipicamente considera-se duas frações de glomalina: a facilmente extraível (GFE) e a glomalina total (GT) (Wright & Upadhyaya 1996). Recentemente, Nichols (2003) sugeriu um terceiro “pool” denominado “scum”, que é altamente hidrofóbico e observado quando potes de cultivo de FMA em areia são submersos em água e ocorre a formação de uma camada espumosa na superfície. Adicionalmente, Lovelock *et al.* (2004b) sugerem a presença de uma fração denominada “residual”, que é extraída apenas quando bases fortes são empregadas. A fração GFE é extraída em solução de citrato de sódio (20 mM; pH 7,0) após um ciclo em autoclave (121 °C) por 30 minutos. Ao sedimento deste extrato e com a adição de citrato de sódio mais concentrado e alcalino (50 mM; pH 8,0), consegue-se extrair a fração GT, sendo que este procedimento deve ser conduzido até os sobrenadantes não apresentarem coloração marrom-avermelhada, característica da glomalina (Wright & Upadhyaya 1998).

Recentemente González-Chávez *et al.* (2004) fizeram uso de borato de sódio (100 mM; pH 9,0) como solução extratora. O processo de extração desse glicoconjugado do solo elimina proteínas termossensíveis (Wright *et al.* 2000); com isso, a precipitação ácida, usando HCl ou ácido tricloroacético (TCA), que é empregada para precipitar proteínas extracelulares presentes no solo (Murase *et al.* 2003), seguida de diálise, em meio com ou sem tampões orgânicos (borato de sódio ou Tris-HCl), fornece fração protéica com elevado grau de purificação (González-Chávez *et al.* 2004). Utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear, Rillig *et al.* (2001b) observaram que, além da glomalina, os extratos protéicos não apresentam outros peptídeos ou taninos, componentes comumente presentes em extratos de solo.

Após extração, que pode ser realizada em simples “panela de pressão” (Wright & Jawson 2001), a quantificação da glomalina é feita por métodos bioquímicos de rotina na dosagem de proteínas (por ex. Bradford 1976) ou pode-se ainda fazer uso de técnicas imunológicas, como o ELISA. Para isso é necessário o anticorpo monoclonal MAb32B11, que foi utilizado inicialmente por Wright *et al.* (1996) para identificar a presença da glomalina em hifas, esporos e raízes colonizadas por FMA. Esse anticorpo, que foi produzido a partir de macerado de esporos de *G. intraradices* injetado em camundongo, reconhece epítipo da glomalina apenas em FMA, não reagindo com outros fungos do solo. A reação com a glomalina nos extratos de solo, superfície de hifas e esporos é verificada pela ligação do anti-anticorpo conjugado ao isocianato de fluoresceína (FITC) (Wright 2000). As frações de glomalina GFE e GT determinadas por este método são denominadas glomalina facilmente extraível e glomalina total imunorreativas (GFEIR e GTIR, respectivamente), sendo esta imunorreatividade indicativo da similaridade da glomalina extraída de solo com a proteína das hifas de *G. intraradices*, utilizada para produção do MAb32B11 (Rillig 2004b).

Pouco se conhece sobre a caracterização química da glomalina e isto constitui empecilho para melhor entendimento da contribuição desta biomolécula no ciclo do carbono no solo (Zhu & Miller 2003). Aliado a isto, não se conhece o(s) gene(s) responsável (eis) pela sua síntese. Diante dessa problemática, Rillig (2004b) propôs nova terminologia, sugerindo a troca do termo “glomalina” por “proteína do solo relacionada a glomalina”; para as frações de glomalina comumente extraídas de solo, o autor sugere a substituição do termo GT e GFE por BRSP (proteína total do solo reativa ao método de Bradford) e EE-BRPS (proteína facilmente extraível do solo reativa ao Bradford), respectivamente. Caso a fração utilizada seja a imunorreativa, deve-se substituir “BR” por “IR”. Wander (2004) acrescenta que os

procedimentos de extração de glomalina devem ser otimizados, visando a separação de “pools” com cinéticas e funções distintas.

Estimativas da produção de glomalina variam de 1-15 mg g⁻¹ solo (Wright & Upadhyaya 1996; 1998). Em áreas agrícolas, os valores de glomalina facilmente extraível e total estão em torno de 0,5 e 3 mg g⁻¹ solo, respectivamente (Rillig *et al.* 2003a); porém, em regiões semi-áridas, os valores de produção são comparativamente baixos, não excedendo 0,3 e 0,6 mg g⁻¹ solo (Bird *et al.* 2002). Em áreas revegetadas com plantas micorrizadas a produção pode chegar a 3,65 mg g⁻¹ solo (Caravaca *et al.* 2005a). Em solos de floresta, Rillig *et al.* (2001b) conseguiram extrair > 60 mg glomalina g⁻¹ solo.

A glomalina representa 8 % da massa seca das hifas (González-Chávez *et al.* 2004) e é considerada produto da atividade dos FMA. Algumas frações são potenciais indicadores do impacto de práticas agrícolas (Rillig 2004b) e apontadas como biomarcadores para biomassa e atividade desses fungos no solo (Millner & Wright 2002), especialmente ao nível de ecossistema (Rillig & Allen 1999). A glomalina representa 4-5 % do carbono orgânico do solo, enquanto a biomassa microbiana (estimada pelo método da fumigação e extração) representa apenas 0,2 % (Rillig *et al.* 2001b). Estima-se que sua residência no solo seja longa (6-42 anos) e com baixa taxa de degradação (25 %) em relação às hifas, que apresentam elevada (60 %) decomposição e reduzida permanência (5-6 dias) no solo (Rillig *et al.* 2001a; Staddon *et al.* 2003; Steinberg & Rillig 2003). O rápido “turnover” das hifas em relação à glomalina pode justificar a ausência de correlação entre produção de micélio e proteína, apontada por Rillig *et al.* (2001a). A relação linear da glomalina com a estabilidade de agregados indica a influência deste subproduto da hifa no processo de estabilidade e hidrofobicidade de partículas do solo (Wright & Anderson 2000). Porém, em solos com elevados teores de carbonato de cálcio (71 %), a contribuição da glomalina no processo de agregação de partículas é pequena, visto que nesses solos os principais agentes cimentantes são carbonatos (Rillig *et al.* 2003a).

Presume-se que fatores do solo que afetam a simbiose micorrízica arbuscular também regulem a produção de glomalina, visto que a presença (Rillig *et al.* 2002a) e o tipo de vegetal (Wright & Anderson 2000; Bird *et al.* 2002) afetam a produção de proteína. Frações imunorreativas de glomalina não foram afetadas pela aplicação de fogo em solos dos EUA, fato possivelmente relacionado à estabilidade térmica desta proteína (Knorr *et al.* 2003). Em contrapartida, Rillig *et al.* (2002b) registraram que as mesmas frações imunorreativas foram reduzidas com o aquecimento do solo. Wuest *et al.* (2005) verificaram que a produção de glomalina total também foi reduzida pela aplicação de fogo.

A glomalina pode servir como fonte de nutrientes (C e N), como sugerido por Harner *et al.* (2005). Correlação positiva entre a emissão de CO₂ e concentração de glomalina indica que a microbiota pode utilizar a porção glicídica desta glicoproteína nos processos oxidativos (Rillig *et al.* 2003b).

O estado de agregação do solo influencia a produção de glomalina, como enfatizado por Rillig & Steinberg (2002), os quais registraram que em solos com menor grau de agregação, há maior produção de proteína e menor formação de hifas. Este comportamento pode traduzir economia na produção de micélio extraradicular para que ocorra a síntese de glomalina, que consiste em alto gasto energético para o micobionte (Driver *et al.* 2005).

Em algumas situações, solos férteis podem favorecer a síntese de glomalina (Lovelock *et al.* 2004a), devido à maior produção de hifas externas nesses solos. Entretanto, aumento nos teores de Ca, P e K foram referidos por Lovelock *et al.* (2004b) como inibidores da produção de GFE. Por outro lado, Rillig *et al.* (2003b) não encontraram relação entre os teores de Ca, Mg, P e K e a produção de glomalina, enquanto o pH do solo foi negativamente correlacionado com as frações GFE e GT. Correlações positivas entre as frações de glomalina e o teor de carbono orgânico do solo têm sido registradas (Wright & Upadhyaya 1996; Franzluebbers *et al.* 2000; Bird *et al.* 2002). Entretanto, mesmo esta proteína sendo fortemente correlacionada com o carbono e o nitrogênio orgânicos do solo (Bird *et al.* 2002; Wuest *et al.* 2005), pouco se conhece sobre a influência do aumento da fertilidade do solo, decorrente da aplicação de adubos orgânicos, sobre a dinâmica da glomalina. Recentemente, Wuest *et al.* (2005) registraram que a aplicação por 70 anos de 22,4 t ha⁻¹ ano⁻¹ de esterco não maturado favoreceu a produção de glomalina; os autores atribuíram o efeito benéfico ao aumento da retenção de umidade nos solos fertilizados.

Elevadas concentrações de dióxido de carbono na atmosfera afetam os FMA, que podem funcionar indiretamente como dreno do excesso de carbono atmosférico (Staddon & Fitter 1998), aumentando a produção de micélio extraradicular e de glomalina (Rillig *et al.* 2000), que favorece o estoque de carbono no solo (Rillig *et al.* 1999; Rillig *et al.* 2001b). Quando incorporado na glomalina, o C apresenta-se estável no solo, visto que a sazonalidade tem pouca influência na concentração desta proteína no meio (Lutgen *et al.* 2003).

Além dos fatores do solo, a produção de glomalina é dependente da espécie de FMA (Wright *et al.* 1996; Rillig *et al.* 2005), e este aspecto tem sido indicado como importante na seleção de inoculantes para aplicação na agricultura (Miller & Jastrow 2000). O uso de fungos com maior potencial para produção desta proteína no solo é indicado por melhorar as condições edáficas e o crescimento do hospedeiro (Piotrowski *et al.* 2004; Rillig 2004b).

Nesse sentido, Wright & Upadhyaya (1999) registraram maior produção de glomalina por *Gigaspora rosea* Nicolson & Schenck e *Glomus caledonium* (Nicolson & Gerdemann) Trappe & Gerdemann em relação a *Glomus intraradices*, associados ao sorgo cultivado em areia por cerca de três meses. Do mesmo modo, em condições de campo, Caravaca *et al.* (2005a) verificaram maior produção de glomalina na rizosfera de *Olea europaea* quando simbioticamente associada a *Glomus claroideum* Schenck & Smith em relação à inoculação com fungos nativos. Porém, ainda não se determinou se há variação intraespecífica (entre isolados) na produção de glomalina.

Apesar do conhecimento científico recente da glomalina, aspectos relacionados à dinâmica desta glicoproteína em nível de ecossistema têm sido relatados. Rillig (2004b) sugere a condução de ensaios em condições controladas para que haja melhor compreensão da dinâmica desta proteína, visando posterior extrapolação dos padrões obtidos para o nível de ecossistema. No panorama brasileiro, não se conhece a dinâmica e a ciclagem desta biomolécula, tanto em ambientes naturais quanto manejados.

3.3. Germinação de FMA em substratos orgânicos

Antes de estabelecer simbiose com a raiz do hospedeiro, os FMA apresentam uma fase denominada assimbiótica (ou pré-simbiótica), que consiste da germinação, com formação de tubo germinativo, e produção limitada de micélio assimbiótico (Pawlowska & Charvat 2004). Esses são os únicos estádios ativos dos FMA que podem ser estudados sem a presença do vegetal (Brundrett & Juniper 1995).

O processo germinativo ocorre na ausência de hospedeiro, a partir das reservas energéticas contidas no esporo (Giovannetti 2000). Contudo, o micélio formado, mesmo absorvendo nutrientes do meio (Souza & Berbara 1999), não consegue se estender sem a formação da micorriza (Becárd *et al.* 2004); ocorre senescência das hifas, caracterizada pela formação de septos e retração citoplasmática a partir do ápice hifálico (Maia *et al.* 1994; Parmiske 2005) e início de autólise (Hildebrant *et al.* 2002). Esse comportamento caracteriza o biotrofismo obrigatório do fungo (Hepper 1983c), visto que apenas na presença de raízes o ciclo se completa (Bécárd & Piché 1989a). Becárd *et al.* (2004) sugeriram que na presença de sinais radiculares ocorre indução na expressão de genes ligados à atividade mitocondrial, resultando no aumento das taxas respiratórias e na atividade ATPase da bomba de prótons, responsável pelo aumento na absorção de Pi e redução na acidez citoplasmática. Com isso, o micélio se estende e se ramifica em direção ao hospedeiro (Sbrana & Giovannetti 2005).

Após hidratação e acepção de oxigênio pelos esporos, ocorre divisão nuclear com formação de grande número de vesículas e movimentos citoplasmáticos; posteriormente, segue-se o alargamento da camada interna e digestão da parede intermediária do esporo, havendo, por fim, possível pressão física para emissão do tubo germinativo (Siqueira *et al.* 1985). Esses processos são decorrentes da ativação do metabolismo, que resulta na formação de micélio; porém, mesmo após 15-20 dias da germinação, não há depleção total das reservas do esporo (Giovannetti 2000). Os esporos apresentam 45-72% de lipídeos, dependendo do estágio de desenvolvimento do processo assimbiótico (Beilby & Kidby 1980) e durante o processo germinativo ocorre redução nos triacilgliceróis de reserva e aumento nos fosfolipídeos (Becard *et al.* 2004). Processos bioquímicos tais como: conversão de lipídios em trealose, absorção e utilização de glicose e frutose, síntese de aminoácidos, como arginina e glutamina e fixação do CO₂ (Bago *et al.* 1999) concorrem para o anabolismo durante a fase assimbiótica dos FMA.

A germinação de FMA pode ocorrer através da parede do esporo ou de estrutura especializada (Mehrotra 2005) e modos diferenciados de emissão do tubo germinativo entre os gêneros de FMA têm sido registrados (Giovannetti 2000). Em *Gigaspora* Gerdemann & Trappe emend. Walker & Sanders é formada uma “parede” germinativa; *Acaulospora* Gerdemann & Trappe emend. Buch germina depois da formação de uma estrutura específica denominada “orb”; em *Glomus* Tulasne & Tulasne ocorre re-crescimento da hifa de sustentação; em *Scutellospora* Walker & Sanders forma-se uma placa germinativa. Múltipla germinação tem sido registrada em espécies de *Gigaspora*, e parece constituir mecanismo para aumentar as chances de colonização do hospedeiro (Koske 1981b; Maia *et al.* 1994).

Os esporos de FMA podem passar por período de dormência, caracterizado pela ausência de germinação, mesmo em condições ideais ao processo (Tommerup 1987); a duração dessa fase depende da espécie de FMA, com longos períodos comumente referidos em representantes de *Acaulospora* (Tommerup 1983a). A presença deste fenômeno pode estar relacionada à época do ano em que os esporos são formados (Gemma & Koske 1988). A manutenção dos esporos em baixas temperaturas é uma das formas de quebrar a dormência (Safir *et al.* 1990).

Fatores físicos, químicos e biológicos do solo afetam a germinação e o crescimento micelial assimbiótico, devendo ser fornecidas condições edáficas ideais para garantir o desenvolvimento desta etapa do ciclo de vida dos FMA. Espécies de FMA requerem faixas diferenciadas de pH para seu desenvolvimento (Hepper 1984d; Mosse 1987); nesse aspecto, Green *et al.* (1976) observaram que *Scutellospora coralloidea* (Trappe, Gerdemann & Ho)

Walker & Sanders e *Scutellospora heterogama* (Nicolson & Gerdemann) Walker & Sanders germinaram mais em condições ácidas, enquanto *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe em meio alcalino. Siqueira *et al.* (1984) referiram que esporos de *Gigaspora margarita* Becker & Hall apresentaram maior taxa de germinação e de crescimento micelial em meio ácido, o que não ocorreu com *G. mosseae*.

Elevadas concentrações de nutrientes no meio de crescimento podem inibir a emissão do tubo germinativo em esporos de FMA (Daniels & Graham 1976); porém, o efeito prejudicial depende do nutriente (Siqueira *et al.* 1982). Bressan (2001) registrou que a adição de N (5, 10 e 50 mg dm⁻³) em meio com 2 mg P dm⁻³ inibiu a germinação de *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann. Em contrapartida, com a adição de 20 mg P dm⁻³ em meio contendo 5 mg N dm⁻³ houve estímulo no processo, indicando o efeito deletério do nitrogênio, em relação ao fósforo, na fase assimbiótica. Similarmente, Daniels & Trappe (1980) registraram elevadas taxas (60-80%) de germinação de *Glomus epigaeus*=*Glomus versiforme* (Karsten) Buch em meio com 100 mg dm⁻³ de fosfato monocálcico. Concentrações entre 5 - 500 mg P dm⁻³ também não inibiram a germinação de *Gigaspora gigantea* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe (Koske 1981a). Hepper (1983a) considerou que a presença de 4080 mg dm⁻³ de fosfato de potássio em meio ágar-água reduziu a germinação de *G. mosseae* e *G. caledonium*; no entanto, em solo com 982 mg P dm⁻³ não houve inibição do processo. Wilson *et al.* (1989) consideraram que o efeito negativo do P na germinação de *G. etunicatum* e *G. mosseae* foi dependente da esterilização do solo, pois em solo não esterilizado altas concentrações de P (60 mg dm⁻³) são necessárias para não haver competição dos FMA com os demais microrganismos do solo por este nutriente.

O aumento na quantidade de sais no solo afeta negativamente a emissão do tubo germinativo por reduzir o potencial osmótico do meio (Estaun 1989); porém, a presença do cloro e do sódio também pode inibir o processo (Hirrel 1981; Vallini *et al.* 1993). Outro fator edáfico que pode comprometer as etapas assimbióticas é a saturação por alumínio, sendo o uso do índice germinativo ferramenta útil na seleção de FMA tolerantes em favorecer o cultivo de vegetais em solos com elevados teores deste elemento (Bartolome-Esteban & Schenck 1994).

Fatores físicos como temperatura e umidade controlam o curso da fase pré-simbiótica (Nadarajah & Nawawi 1987; Siqueira *et al.* 1985). Como registrado por Daniels & Trappe (1980), umidade próxima à capacidade de campo e temperatura entre 18-25 °C são condições ideais para germinação de esporos de *G. versiforme*. Koske (1981a) observou que temperaturas acima de 35 °C ou abaixo de 15° C são prejudiciais ao processo e que a umidade

entre 5-28 % é ideal para o desenvolvimento assimbiótico de *G. gigantea*. *Glomus caledonium* e *Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe não germinaram em solos mantidos a 5 °C (Tommerup 1983b). Solos com elevada umidade (18%) inibiram a germinação de *Glomus clarum* Nicolson & Schenck e *Glomus macrocarpum* Tulasne & Tulasne e *G. etunicatum*, sendo o efeito atribuído à redução na aeração do substrato e ao hiperparasitismo dos esporos (Sylvia & Schenck, 1983).

A luminosidade também pode afetar o crescimento micelial assimbiótico de FMA. Varela-Castejón *et al.* (1998) registraram redução na germinação de *G. macrocarpum* quando os esporos foram expostos à luz; em contrapartida, Nagahashi *et al.* (2000) verificaram que a luz induziu a ramificação do tubo germinativo em *Gigaspora rosea*, o que aumenta as chances de colonização do hospedeiro.

Na tentativa de cultivar os FMA na ausência de raízes, estudos visando selecionar tipos e concentrações de biomoléculas que permitissem a propagação do fungo sem hospedeiro foram conduzidos, mas sem sucesso. Vários tipos de carboidratos foram adicionados ao meio de cultivo de FMA, visando a propagação axênica. Koske (1981a) registrou redução no crescimento micelial de *G. gigantea* em meio com 5 g L⁻¹ de glicose. Inibição do crescimento micelial também foi registrada quando esporos de *G. gigantea* foram mantidos em meio ágar-água suplementado com trealose, porém a presença de frutose, arabinose, manitol, amido e sacarose não afetou o processo, sendo sugerida a ausência de vias de absorção e metabolização desses compostos (Silva & Siqueira 1991). Taxas reduzidas de germinação de *G. margarita* com o aumento na concentração de sacarose foram registradas por Siqueira *et al.* (1982); no entanto, os autores verificaram estímulo no crescimento micelial quando concentrações menores que 4g L⁻¹ foram empregadas, sendo o efeito estimulatório da sacarose evidenciado após 20 dias de incubação. Vilariño & Sainz (1997) observaram que a exposição, por até 30 minutos, em solução de sacarose, estimulou a germinação de esporos de *G. mosseae*. De modo semelhante aos carboidratos, a presença de aminoácidos no meio pode estimular (histidina, cistina e leucina), inibir (metionina e fenilalanina) ou não afetar (glicina, lisina, prolina, entre outros) os processos pré-simbióticos de *G. gigantea* (Freitas & Siqueira 1994).

Moléculas presentes no meio de crescimento para FMA podem modular a fase pré-simbiótica (Koske 1982). Tampões orgânicos podem ser utilizados na composição do meio de germinação (Fracchia *et al.* 2001), e na maioria dos casos estimulam o crescimento do micélio assimbiótico de várias espécies de FMA, tais como: *Glomus caledonium* (Carr 1991) e *G. etunicatum* (Pawlowska *et al.* 1999); porém, os benefícios são dependentes do tampão

utilizado. Hepper (1984b) registrou aumento no crescimento micelial de *G. caledonium* em meio com diferentes sais de enxofre (tiosulfato, metabisulfito, sulfito e sulfato), indicando que esses compostos podem alterar o potencial óxido-redutor do meio e assim favorecer o processo pré-simbiótico. Bécárd *et al.* (1989), por sua vez, enfatizaram o papel estimulatório do CO₂ (0,5%) no crescimento micelial de *G. margarita*. Este efeito é potencializado na presença de alguns tipos de flavonóides no meio (Becárd *et al.* 1992; Chabot *et al.* 1992; Poulin *et al.* 1993).

Flavonóides são moléculas que atuam na ativação de genes de nodulação em rizóbio, podendo também estimular o crescimento micelial de FMA (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1989). Ishii *et al.* (1997) verificaram que flavonóides com a presença de grupamento OH na posição 3 da molécula estimularam o crescimento micelial de *Gigaspora ramisporophora* Spain, Sieverding & Schenck. *Gigaspora gigantea* também teve a fase assimbiótica favorecida pela presença de flavonóides, porém os benefícios foram dependentes do tipo e concentração utilizados (Romero & Siqueira 1996).

Em algumas situações, a presença de certas moléculas não interfere nos processos pré-simbióticos. Sannazaro *et al.* (2004) registraram que não houve efeito da adição de inibidores da síntese de poliaminas (di-fluoro metil arginina e di-fluoro metil ornitina) sobre a fase assimbiótica de *G. rosea*. Similarmente, Kirk *et al.* (2005) verificaram que a aplicação de derivados de petróleo ao solo não interferiu na fase assimbiótica de *Glomus intraradices*, na ausência de raízes.

A presença de microrganismos pode maximizar os processos pré-simbióticos (Graham 1982), tanto pela utilização de inibidores da germinação pelos microrganismos, como pela produção de substâncias voláteis ou altamente difusíveis (Azcón-Aguilar *et al.* 1986), que favorecem o desenvolvimento desta etapa do ciclo de vida dos FMA. Carpenter-Boggs *et al.* (1995) registraram aumento no índice germinativo de *G. margarita* na presença de actinomicetos (*Streptomyces orientalis* (Pitenger & Brigham) Lechevalier, Prauser, Cabeda & Ruan), sendo o benefício atribuído à presença de compostos voláteis (MIB-2 metil-isoborneol). Protuberâncias nas hifas assimbióticas de *G. versiforme* foram observadas quando se utilizou esporos desinfestados, o que não ocorreu quando bactérias estavam associadas ao esporo, indicando que esses microrganismos podem interferir na morfologia do micélio (Mayo *et al.* 1986).

O processo germinativo ocorre na ausência de vegetais, contudo o efeito estimulatório de sinais do hospedeiro tem sido documentado (Becárd *et al.* 2004). Suspensão de células de *Pueraria phaseoloides* Benth estimulou o crescimento micelial de *G. margarita* (Paula &

Siqueira 1990) e *S. heterogama* (Paula *et al.* 1991), sendo o efeito decorrente do acúmulo e liberação de metabólitos no meio. De modo similar, Gianinazzi-Pearson *et al.* (1989) registraram que exsudados radiculares de *Trifolium pratense* L. estimularam os processos pré-simbióticos de *G. margarita*. Exsudados radiculares de *Lycopersicon esculentum* Mill e *Daucus carota* L. também favoreceram a ramificação das hifas de *G. gigantea*, *G. rosea* e *G. intraradices* (Nagahashi & Douds 2000). Em contrapartida, a presença de exsudados de *Medicago sativa* L. não afetou a germinação de *G. mosseae* (El-Atrach *et al.* 1989).

A composição do meio de germinação pode afetar o crescimento do tubo germinativo de FMA (Daniels & Graham 1976). Máxima germinação (100%) ocorreu em 7 dias de incubação quando esporos de *G. albida* foram inoculados em meio ágar-água, situação não observada quando o meio de germinação foi areia ou à base de extratos de *Panicum miliaceum* L. (Maia & Yano-Melo 2001).

Meios com elevada capacidade de troca catiônica (CTC) podem favorecer o processo germinativo por adsorverem ou imobilizarem substâncias que podem inibir as etapas pré-simbióticas (Watrud *et al.* 1978; Daniels & Trappe 1980). Aumento na CTC do substrato pode ser alcançado pelo uso de materiais orgânicos compostados. Calvet *et al.* (1992) observaram que a presença de substratos orgânicos (composto de casca de árvore, composto de oliveira e turfa) não afetou a germinação e o crescimento micelial. Entretanto, maior produção de esporos vegetativos de *G. mosseae* foi obtida nos substratos compostados. Por outro lado, os ácidos húmicos encontrados em adubos compostados reduziram linearmente o crescimento micelial assimbiótico de *G. mosseae* (Vallini *et al.* 1993). É necessário, portanto, selecionar doses e tipos de adubos para estabelecimento de sistemas agrícolas orgânicos, visando não comprometer a fase assimbiótica dos FMA, importante para desenvolvimento da simbiose em áreas com manejo orgânico.

3.4. Colonização intra e extraradicular por FMA em solos com adubo orgânico

Como parte do ciclo de vida, os FMA colonizam o córtex radicular dos hospedeiros, formando extensa rede de hifas (Smith & Read 1997); Estas podem apresentar morfologias diferenciadas para desempenhar funções específicas, como é o caso dos arbúsculos que participam da troca de nutrientes entre os simbiontes (Barker *et al.* 1998). Vesículas também podem ser formadas, mas a presença destas estruturas é restrita a alguns gêneros (Bierman &

Linderman 1983) e relacionada ao estoque de nutrientes do fungo, sendo importante fonte de propagação (Staddon & Fitter 2001).

A perspectiva do estabelecimento de sistemas agrícolas sustentáveis implica, atualmente, na utilização de quantidades adequadas de resíduos orgânicos com qualidade (Salami & Osonubi 2002), devendo-se considerar o componente micorrízico no sistema (Celik *et al.* 2004), que pode ser beneficiado pela composição química e produtos da decomposição dos adubos no solo (Baby & Manibhushanrao 1996; Gryndler *et al.* 2005). No entanto, o uso indiscriminado de fontes, e doses inadequadas, pode comprometer a formação da associação micorrízica em solos com resíduos orgânicos (Angel & Heckman 1986; Martín *et al.* 2002), privando os vegetais dos benefícios da simbiose. Por outro lado, respostas positivas da aplicação de resíduos sobre o desenvolvimento intraradicular de FMA têm sido relatadas (Verma & Arya 1998; Murphy *et al.* 2000; Gaur & Adholeya 2002; Oehl *et al.* 2004). Em outros casos, a presença do adubo orgânico no solo não interfere na colonização pelo fungo (Caravaca *et al.* 2003b). Assim, para adequado estabelecimento da simbiose, as condições de fertilidade do substrato devem ser determinadas (Trindade *et al.* 2003).

Fatores como espécie vegetal (Zabir & Koide 2000; Gaur *et al.* 2000) e de FMA (Hart & Reader 2002b), além de características físico-químicas do solo (Ryan & Graham 2002) e práticas de manejo (Baltruschat & Dehne 1988), como o uso de fertilizantes orgânicos, afetam o estabelecimento da simbiose micorrízica (Brechelt 1989).

Os mecanismos que beneficiam os FMA em solos submetidos à adubação orgânica não são claros (Palenzuela *et al.* 2002). Todavia, Muthukumar & Udaiyan (2000) observaram que a elevada concentração de carboidratos na raiz foi correlacionada com os elevados níveis de colonização arbuscular em *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivada em solos com adubos orgânicos. Gryndler *et al.* (2005) sugeriram a melhoria nas propriedades do solo e a presença de substâncias produzidas durante a decomposição da matéria orgânica adicionada ao solo, como possíveis mecanismos para melhorar o desenvolvimento de FMA em solos adubados com resíduos orgânicos.

A aplicação de resíduos orgânicos pode favorecer o estabelecimento de FMA, especialmente em solos pobres em nutrientes, como observado na simbiose *Pistacia lentiscus* L. e *G. intraradices*, em solos do semi-árido adubados com composto orgânico (Caravaca *et al.* 2002b). De modo semelhante, Muthukumar & Udaiyan (2002) observaram que melhor estado nutricional de *V. unguiculata*, decorrente da aplicação de resíduos orgânicos de origem vegetal ou animal, foi correlacionado com a colonização micorrízica. Em contrapartida, alguns autores (Angel & Heckman 1986; Ryan & Ash 1999) sugerem que a aplicação de P,

oriundo da adubação, em solos com baixa fertilidade, reduz a colonização por FMA e que em solos férteis não há efeito negativo da fertilização orgânica.

O teor de matéria orgânica do solo é importante para o estabelecimento do FMA na raiz (Quintero-Ramos *et al.* 1993; Carrenho *et al.* 2001). No entanto, a dose aplicada é fundamental para resultados satisfatórios (Cavender *et al.* 2003), pois em quantidades elevadas (50%), mesmo a aplicação de materiais compostados pode reduzir a taxa de colonização a valores menores que 2% (Sainz *et al.* 1998). Este comportamento foi observado por Noyd *et al.* (1996), que relataram aumento na infectividade de FMA em áreas sujeitas à mineração quando doses moderadas de composto orgânico (22,4 t ha⁻¹) foram aplicadas. Entretanto, quantidades elevadas do adubo (44,8 t ha⁻¹) trouxeram prejuízos na atividade dos fungos. Similarmente, Avio & Giovannetti (1988) verificaram redução na colonização micorrízica com aumento na concentração de celulose no substrato de cultivo de *Medicago sativa*. Em experimento de longa duração (18 meses) Caravaca *et al.* (2004) observaram que as raízes de *D. pentaphyllum* tiveram menor taxa de colonização por *G. deserticola* ou *G. intraradices* em solo adubado com resíduo de beterraba, o que não ocorreu no solo sem adubo. Com o uso de FMA adaptados às condições de alta fertilidade, maior estabelecimento do fungo poderia ocorrer em solos com elevadas doses de fertilizantes orgânicos (Hayman 1982); no entanto, estudos são necessários para comprovar esta hipótese.

Apesar da preconização que o aumento nas doses de resíduos orgânicos reduz o potencial infectivo e a reprodução dos FMA, Tanu *et al.* (2004) obtiveram respostas lineares no potencial infectivo de fungos nativos associados a *Cymbopogon winterianus* Jowitt, com o aumento nas doses de resíduos orgânicos. Soedarjo & Habte (1993) também observaram correlação entre o teor de matéria orgânica, incrementado pela incorporação de folhas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit no substrato de cultivo dessa espécie e a taxa de colonização por *Glomus aggregatum* Schench & Smith emend. Koske. Este tipo de resposta pode ser atribuído à depleção do P em substratos com adubos orgânicos, como sugerido por Schubert & Lubraco (2000), o que resulta em elevadas taxas de colonização radicular.

Respostas negativas do uso de fertilizantes orgânicos sobre os FMA são freqüentemente atribuídas ao elevado teor de nutrientes no solo após aplicação do adubo (Estaún *et al.* 1999). Porém, Schiavo & Martins (2002) não observaram inibição na colonização de *Psidium guajava* L. por *G. clarum* em substrato constituído por bagaço de cana-de-açúcar e torta de filtro (3:1 v/v) apresentando 73 mg P dm⁻³. Este substrato também foi favorável à colonização de raízes de bananeiras micropropagadas por *G. clarum* (Leal *et al.* 2005). Similarmente, Zambolim *et al.* (1992) registraram elevadas taxas (100%) de

colonização de *G. etunicatum* em raízes de sorgo [*Sorghum bicolor* L. (Moench)] cultivadas em substrato à base de turfa, vermiculita e esterco de galinha (4,5: 4,5: 1 v/v) com 1080 mg P dm⁻³. Isto indica que outros fatores, além dos teores de nutrientes, podem atuar negativamente no estabelecimento da simbiose, como substâncias fitotóxicas (Martín *et al.* 2002), composição do resíduo (Borie *et al.* 2002) e a presença de patógenos nos resíduos orgânicos (Elorrieta *et al.* 2003).

A manipulação adequada dos fatores do solo pelo emprego de fontes orgânicas pode favorecer os FMA. Miller & Jackson (1998) verificaram que elevados teores de matéria orgânica no solo e alta relação C/N foram positivamente correlacionados com a colonização micorrízica de *Lactuca sativa* L. Em contrapartida, o aumento na densidade aparente do substrato e o pH na faixa alcalina, decorrentes da adubação orgânica, foram apontadas por Trindade *et al.* (2003) como fatores que influenciaram negativamente o estabelecimento de *G. margarita* em raízes de *Musa* spp.

A redução na colonização dos FMA pode estar relacionada ao tipo de resíduo empregado. Boyle & Paul (1988) registraram que a fertilização por oito anos com resíduo compostado não alterou a simbiose em raízes de cevada (*Hordeum vulgare* L.) em relação ao controle não adubado, enquanto a aplicação de materiais não compostados reduziu cerca de seis vezes a colonização radicular. Além disso, a presença de substâncias inibitórias em resíduos orgânicos, como apontado por Roldán & Albaladejo (1993), pode contribuir para as respostas negativas observadas. Trindade *et al.* (1996) consideraram que o bom estado de maturação do composto de lixo utilizado no substrato de cultivo foi importante para o estabelecimento de *G. clarum* nas raízes de *Zea mays* L. Esse aspecto é importante, pois materiais compostados apresentam elevadas concentrações de substâncias húmicas (ácidos húmicos e fúlvicos) que favorecem a produção de micélio intra e extraradicular (Gryndler *et al.* 2005).

Na agricultura orgânica, a escolha por fontes disponíveis na propriedade agrícola é desejável (Ryan *et al.* 1994), pois reduz os custos de produção. A seleção do tipo de resíduo orgânico mais promissor para formação da simbiose é importante, pois a heterogeneidade dos materiais utilizados pode comprometer o estabelecimento do fungo na raiz (Borie *et al.* 2002). Selecionando substratos para produção de mudas de videira (*Vitis* L.) micorrizadas, Zenke *et al.* (2003) concluíram que o substrato comercial Plantmax[®], constituído por cascas de árvore, turfa, vermiculita e calcário, reduziu a colonização por *G. etunicatum*, *G. clarum* e *Acaulospora* sp., enquanto o uso de composto termofílico foi o mais favorável para os fungos, no final do período de aclimatização das plantas.

Outro fator que modula a colonização micorrízica em solos com elevadas doses de adubo é a espécie vegetal. Utilizando elevadas proporções (50 %) de composto orgânico, Gaur & Adholeya (2000) observaram que a colonização de *Allium cepa* L. foi estimulada, a de *Allium sativum* L. reduzida e a de *Solanum tuberosum* L. não alterada. De modo similar, Caravaca *et al.* (2002c) verificaram que em raízes de *O. europaea* a taxa de colonização por *G. intraradices* não afetada pela presença de composto orgânico no solo, enquanto a adubação prejudicou o estabelecimento do fungo no córtex radicular de *Rhamnus lycioides* L.

Respostas neutras da adubação orgânica sobre a fase intraradicular dos FMA também já foram registradas (Ishac *et al.* 1986; Vassilev *et al.* 1998; Souza *et al.* 2005). O uso de 30% de esterco de curral não afetou a colonização micorrízica de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) inoculados com *G. margarita* (Souza *et al.* 1991). Utilizando isolado dessa mesma espécie de FMA, Lins *et al.* (2003) também não evidenciaram alterações na taxa de colonização de raízes de bananeira (*Musa* L. var. Caipira) em substrato adubado com 5 % de esterco. O teor de matéria orgânica do solo cultivado com *Glycine max* não afetou o estabelecimento da simbiose com *G. intraradices* (Frey & Ellis 1997). Com respostas semelhantes e utilizando isolado dessa mesma espécie de FMA, Caravaca *et al.* (2002a) verificaram que não houve alteração na colonização de raízes de *O. europaea* em solo adubado com composto orgânico. A adição de P orgânico ao solo não interferiu na interação *Calamagrostis villosa* (Chaix) J.F. Gmel e *G. etunicatum* (Baláz & Vosátka 1997).

Sistemas de cultivo tradicionais, que utilizam elevadas doses de adubos químicos, apresentam altos teores de P inorgânico e esta característica é freqüentemente apontada por prejudicar a fase intraradicular da simbiose (Dann *et al.* 1996; Bressan 2002). Por outro lado, áreas com manejo orgânico apresentam elevado potencial de infectividade como apontado por Douds *et al.* (1993, 1995, 1997). Em tais sistemas, os vegetais geralmente têm o sistema radicular mais colonizado por FMA, quando comparados com aqueles sob cultivo convencional (Mäder *et al.* 2002; Bending *et al.* 2004). Comprovando este fato, Mäder *et al.* (2000) observaram que a aplicação de fertilizantes orgânicos aumentou de 30-60% a taxa de colonização micorrízica em relação a áreas submetidas à adubação mineral. De modo semelhante, Ryan *et al.* (1994) constataram que trigo cultivado em sistema orgânico teve as raízes três vezes mais colonizadas que o controle, mantido em sistema convencional.

Raízes de *Secale cereale* L. cultivadas em sistema orgânico tiveram taxa de colonização micorrízica em torno de 77%, enquanto em solo sob manejo convencional os valores não ultrapassaram 11% (Sattelmacher *et al.* 1991). Foi sugerido que o elevado teor de P presente no solo foi o fator chave para as respostas observadas. Ryan *et al.* (2000) não

observaram relação negativa entre o P, presente no solo de áreas com manejo orgânico ou convencional, e a colonização micorrízica de *Trifolium repens* L., *Lolium perene* L. e *Paspalum dilatatum* Poir. Apesar das respostas divergentes, Joner (2000) sugere que o uso de fertilizantes orgânicos tem efeito menos deletério que a aplicação de doses equivalentes de adubos minerais NPK, visto que o P orgânico presente nos adubos orgânicos, mesmo em elevadas concentrações, não inibe os FMA (Linderman & Davis 2001).

A conversão de sistemas agrícolas convencionais em áreas de produção sustentável inclui o uso de resíduos orgânicos que favorecem a microbiota do solo (Ryan & Ash 1999), especialmente os FMA (Galvez *et al.* 2001). Nesse sentido, Gleissman *et al.* (1990, 1996) constataram maior colonização micorrízica em morangueiros (*Fragaria ananassa* Duch) por FMA em áreas convertidas para manejo orgânico em relação às mantidas em sistema de produção convencional. Do mesmo modo, Werner *et al.* (1990) registraram maiores taxas de colonização micorrízica (14,4 %) em áreas com transição para cultivo orgânico do que em ambientes com fertilizantes minerais (2%). Esses benefícios são geralmente atribuídos à ausência de pesticidas e ao aumento no teor de matéria orgânica do solo nas áreas orgânicas recém-convertidas (Kurle & Pflieger 1994).

A utilização de adubos orgânicos associados a fertilizantes minerais, prática denominada adubação organomineral, pode trazer benefícios para o vegetal (Kiehl, 1998). No entanto, essa combinação pode prejudicar o estabelecimento dos FMA (Harinikumar & Bagyaraj 1989). Vejsadová (1992) relatou aumento na colonização de trevo vermelho em substrato com esterco, mas quando houve aplicação conjugada de fertilizantes minerais e orgânicos, os FMA nativos apresentaram redução na habilidade de colonizar. Do mesmo modo, Trindade *et al.* (2000) constataram que a aplicação de 30% de esterco bovino associado à fertilização mineral (superfosfato simples e cloreto de potássio) reduziu a colonização micorrízica de FMA nativos em mudas de mamoeiro (*Carica papaya* L.).

Em algumas situações, o uso combinado de adubos químicos e orgânicos pode favorecer a formação da micorriza, como assinalado por Gryndler *et al.* (1989), os quais observaram que o uso, por oito anos, de adubo organomineral (esterco + N + K + P + Ca), favoreceu a colonização de plantas de milho (*Z. mays*), em relação à utilização do resíduo sem suplementação mineral. De modo semelhante, Alloush *et al.* (2000) não registraram efeito negativo na micorrização de *Cicer areitinum* L. por *G. clarum*, em substrato com superfosfato (50 mg P dm⁻³) associado a esterco bovino (12,5 g dm⁻³).

Estudos sobre o efeito de resíduos orgânicos na fase intraradicular dos FMA geralmente informam a taxa de colonização micorrízica total, existindo poucos relatos da

intensidade das diferentes estruturas (hifas, arbúsculos e vesículas) formadas por FMA nas raízes. Neste aspecto, Muthukumar & Udaiyan (2000) registraram aumento na formação de arbúsculos e vesículas em raízes de *V. unguiculata*, após 45 dias de associação com fungos nativos, em solos com resíduos orgânicos de origem animal e vegetal. Boddington & Dodd (2000) também evidenciaram maior formação de arbúsculos em raízes de *Desmodium ovalifolium* Wall colonizadas por *Gigaspora rosea*, *Glomus manihots* Howeler, Sieverding & Schenck e *Acaulospora tuberculata* Janos & Trappe, em solo adubado com matéria orgânica, em relação à fertilização mineral.

Avaliando qualitativamente a colonização por *G. mosseae*, *G. claroideum* e *Glomus geosporum* (Nicolson & Gerdemann) Walker nas raízes de *Plantago lanceolata* L., após 11 meses de simbiose, Gryndler *et al.* (2002) constataram estímulo na produção de arbúsculos nas raízes cultivadas em substrato adubado com 2 g dm⁻³ de celulose, o que não ocorreu quando o substrato foi adubado com 2,5 g dm⁻³ de quitina (Gryndler *et al.* 2003). Quitina também não foi fonte orgânica favorável ao desenvolvimento de arbúsculos por *G. intraradices* em raízes de *Sorghum bicolor* (Abdel-Fattah & Mohamedin 2000). De modo similar, redução na formação de arbúsculos no córtex radicular de sorgo (*S. bicolor*) e soja (*Glycine max*) foi evidenciada por Ellis *et al.* (1992) em solo adubado com 15,8 t ha⁻¹ ano⁻¹ de esterco bovino. Loth & Hofner (1995) consideraram que os efeitos inibitórios da aplicação de resíduos orgânicos são mais pronunciados na formação de vesículas, visto que tais estruturas estão presentes com maior intensidade em solos sem adubo (Christie & Kilpatrick 1992).

Como observado, o emprego de fontes orgânicas pode favorecer a fase intraradicular, mas fatores como dose e tipo de resíduo, além da espécie vegetal e de FMA devem ser considerados para o sucesso do estabelecimento da simbiose em áreas com manejo orgânico.

Após estabelecimento do fungo no córtex radicular, ocorre formação de extensa rede de hifas externas à raiz, que em conjunto formam o micélio extraradicular. No micélio externo de *Gigaspora* e *Scutellospora* ocorre a formação de células auxiliares, cuja produção antecede a esporulação (INVAM 1993), pois existe translocação do material armazenado para formação dos esporos (Declerck *et al.* 2004).

O micélio extraradicular é responsável pela absorção de água e nutrientes, melhorando o aporte hídrico e nutricional do hospedeiro (Sylvia 1988; 1994). Além da ligação com a nutrição, transportando especialmente o fósforo do solo para o fotobionte (Joner & Jakobsen 1994), o micélio externo também participa no processo de agregação de partículas (Wright & Upadhyaya 1998), representando ca. 2% da matéria orgânica do solo (Gryndler *et al.* 2002). Outro benefício do micélio é a capacidade de adsorver rapidamente (< 30 minutos) metais

pesados, protegendo o vegetal contra os prejuízos destes elementos em elevadas concentrações no solo (Joner *et al.* 2000).

Alguns fatores edáficos como pH (van Aarle *et al.* 2002) e fósforo (Nogueira & Cardoso 2000), regulam diretamente a produção de micélio externo (Christie & Kilpatrick 1992); porém, a produção da biomassa micorrízica no solo também depende da espécie de fungo (Hart & Reader 2002a,b), visto que os FMA formam micélio com dimensões e morfologias diferenciadas (Dodd *et al.* 2000).

A matéria orgânica do solo tem relação com a produção de micélio externo de FMA (Joner & Jakobsen 1992), visto que as hifas destes fungos estão preferencialmente associadas a partículas orgânicas como observado por St. Jonh *et al.* (1983). Apesar do metabolismo assimilatório de FMA estar ausente (Moreira & Siqueira 2002), a habilidade saprofítica desses fungos foi registrada em vários relatos (Hepper & Warner 1983; Warner 1984) e, mesmo que restrita, indica papel relevante da matéria orgânica no desenvolvimento do fungo. Hodge *et al.* (2001) observaram que *Glomus hoi* Buch & Trappe apresentou habilidade em utilizar N orgânico em substrato adubado com folhas e caule de *L. perene*. Tarafdar & Marschner (1994) relataram utilização de P orgânico pelas hifas de *Glomus mosseae*. Posteriormente, Koide & Kabir (2000) observaram que as hifas externas de *Glomus intraradices* também foram capazes de hidrolisar P orgânico. Isso credita aos FMA a função de mineralizadores do P orgânico presente no solo (Feng *et al.* 2003).

Apesar de observarem que plantas de *Trifolium subterraneum* L. associadas a *Glomus invermaium* Hall foram mais eficientes na utilização de P proveniente da matéria orgânica, Joner & Jakobsen (1995b) não atribuíram esse efeito à aquisição direta ou mineralização do P pelas hifas.

De modo similar à colonização intraradicular, a fertilização orgânica pode aumentar o comprimento do micélio externo de FMA, sendo as respostas moduladas pela qualidade da matéria orgânica aplicada (Joner & Jakobsen 1995a). Nesse sentido, Gryndler *et al.* (2002) observaram que em solo adubado com celulose (2g/ litro de substrato) houve incremento na produção de hifas externas de *G. mosseae*, *G. claroideum* e *G. geosporum* em simbiose com *P. lanceolata*. Com o mesmo sistema simbiótico, Gryndler *et al.* (2003) observaram benefícios da utilização de quitina na fase extra-radicular dos fungos testados. Estudando a influência de parâmetros físico-químicos do solo sobre a simbiose *Glycine max* e *G. intraradices*, Frey & Ellis (1997) verificaram que a presença de 42 g dm⁻³ de matéria orgânica no substrato estimulou a produção de micélio externo em relação ao substrato com apenas 10 g dm⁻³. De modo semelhante, Palenzuela *et al.* (2002) observaram aumento na produção de

micélio externo de *G. intraradices* associado a *O. europaea*, em solo adubado com composto orgânico.

Boddington & Dodd (2000) observaram que a utilização de fósforo orgânico proveniente da aplicação de matéria orgânica tem efeito menos deletério sobre o micélio externo do que a aplicação de doses equivalentes de fertilizante mineral, comprovando o efeito benéfico da adubação orgânica sobre os FMA.

Em avaliações do micélio externo, a difícil distinção entre o formado por FMA e aquele produzido por outros fungos do solo implica na utilização de controles sem inoculação, visando eliminar possíveis superestimativas (Sylvia 1994). Isto restringe o conhecimento da dinâmica da produção de micélio a ensaios em casa-de-vegetação, e justifica o menor número de relatos da influência de fontes orgânicas sobre o micélio externo em relação à fase intraradicular da simbiose. No entanto, a aplicação de resíduos orgânicos aumenta o potencial infectivo de FMA (Tanu *et al.* 2004), cuja participação das hifas externas é reconhecida. Diante disso, deve-se escolher práticas sustentáveis, como o uso adequado de adubos orgânicos, que favoreçam a fertilidade e não comprometam o desenvolvimento do fungo micorrízico no solo (Mäder *et al.* 2000).

3.5. Eficiência de FMA em solos com resíduos orgânicos

O estabelecimento do FMA nas raízes do hospedeiro pode favorecê-lo devido ao aumento na absorção de nutrientes da solução do solo (Munyanziza *et al.* 1997) via formação de microzonas de depleção (Werner *et al.* 1990). Este aspecto tem sido extensivamente citado, especialmente em culturas de interesse agrônômico (Barea 1991; Leal *et al.* 2005). A melhoria na estruturação do solo pelos FMA, apesar de pouco estudada em relação aos benefícios nutricionais (Ryan & Graham 2002), tem sido apontada como o segundo mecanismo micorrízico para promoção do crescimento vegetal (Knorr *et al.* 2003).

Benefícios para a planta simbioticamente associada aos FMA incluem aumento na produção de fitomassa (Kapoor *et al.* 2002) e produtividade (Mohammad *et al.* 2004; Ilbas & Sahin 2005), redução no tempo de floração (Gaur *et al.* 2000), maior aporte nutricional (Gupta *et al.* 2002), aumento na produção de óleos essenciais (Kapoor *et al.* 2004), tolerância a estresses hídrico (Borkowska, 2002), salino (Yano-Melo *et al.* 2003) e antrópico (Malcová *et al.* 2001), além da proteção contra patógenos radiculares (Pandey *et al.* 1999).

Benefícios da micorrização foram evidenciados em várias culturas de importância econômica, como por exemplo, cafeeiro - *Coffea arabica* (Siqueira *et al.*, 1998), mamoeiro -

Carica papaya (Trindade *et al.* 2000), bananeira - *Musa* spp. cv Pacovan (Yano-Melo *et al.* 1999), maracujazeiro amarelo - *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg (Cavalcante *et al.* 2002a,b) e doce - *Passiflora alata* Curtis (Silva *et al.* 2004b), aceroleira - *Malpighia emarginata* D.C. (Costa *et al.* 2001), mangabeira - *Hancornia speciosa* Gomes (Costa *et al.* 2003), gravioleira - *Annona muricata* L. (Chu *et al.* 2001), goiabeira - *Psidium guajava* (Schiavo & Martins 2002), açaizeiro - *Euterpe oleracea* Mart (Chu 1999), cajueiro - *Anacardium occidentale* L. (Ananthakrishnan *et al.* 2004), morangueiro - *Fragaria ananassa* (Borkowska 2002), videira - *Vitis* sp. (Zenke *et al.* 2003), tomateiro - *Lycopersicon esculentum* (Araújo *et al.* 1994) e macieira - *Prunus prunifolia* (Willd) Borkh (Locatelli & Lovato 2002), entre outras.

O emprego de resíduos orgânicos é comum na agricultura, tanto na fase de muda, quanto na formação e produtividade de pomares, e atualmente, os vegetais produzidos em cultivo orgânico apresentam maior valor agregado no comércio em relação aos produzidos de modo convencional (Gleissman *et al.* 1996). No entanto, para que a simbiose micorrízica, importante componente de agrossistemas sustentáveis (Barea *et al.* 2002), possa atuar em solos enriquecidos com adubo orgânico, a escolha do substrato é importante para se atingir máxima resposta à micorrização (Vosatka *et al.* 1992). Nesse sentido, a qualidade (Martín *et al.* 2002) e quantidade (Brecht 1987) do resíduo aplicado são fundamentais.

O benefício da utilização de FMA na promoção do crescimento vegetal tem sido demonstrado em solos com baixa fertilidade (Kahiluoto *et al.* 2001; Ilbas & Sahin 2005); entretanto, em solos muito pobres o efeito da inoculação não é evidenciado (Caravaca *et al.* 2002a), sendo necessários níveis adequados de P e de outros nutrientes para se obter resultados satisfatórios da micorrização (Mohammad *et al.* 2004). Nesse âmbito, Sainz *et al.* (1998) não evidenciaram benefícios da micorrização de *Trifolium pratense* L. ou *Cucumis sativa* L. em solo pobre em nutrientes, porém com a aplicação de 10% de vermicomposto, maior crescimento vegetal foi obtido, sem inibição dos FMA. De modo similar, Ilbas & Sahin (2005) verificaram que a aplicação de 100 mg $\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ dm}^{-3}$ associada à micorrização com *Glomus fasciculatum* Gerdemann & Trappe favoreceu a produção de grãos de soja, o que não ocorreu em solo não fertilizado.

A atuação do componente micorrízico em sistemas agrícolas requer condições edáficas favoráveis ao estabelecimento da simbiose, sendo a utilização de adubos, em doses adequadas, primordial para fornecer nutrientes de forma balanceada, sem prejudicar a atividade do fungo no hospedeiro (Sainz *et al.* 1998). Contudo, em substratos ricos em

nutrientes, a simbiose pode se estabelecer, mas os benefícios da associação são mais evidentes em estádios mais avançados da interação fungo-planta (Estaún *et al.* 1999).

Em alguns casos, o emprego de resíduos orgânicos pode favorecer o crescimento do hospedeiro através do estímulo (Harinikumar & Bagyaraj 1989) ou mudança nas populações nativas de FMA. A adubação orgânica pode selecionar e manter FMA mais eficientes, como sugerido por Muthukumar & Udaiyan (2002) a partir de estudo com *Vigna unguiculata* cultivada em solo adubado com fontes orgânicas de origem animal e vegetal, em condições de campo.

Trabalhos visando a seleção de adubos e fungos mais promissores para o crescimento vegetal em sistemas utilizando fontes orgânicas para adubação têm sido conduzidos. Lins *et al.* (1999) relataram que a presença de 10% de esterco bovino estimulou o desenvolvimento de mudas de *Carica papaya* associadas a fungos nativos isolados da rizosfera de mamoeiro. Trabalhando com a mesma cultura, Trindade *et al.* (2000) verificaram que a simbiose com *Glomus etunicatum* em solo com 5 ou 10% de esterco bovino favoreceu a formação de mudas saudáveis. Por outro lado, o uso de 10% de esterco bovino inibiu a colonização micorrízica de bananeiras (*Musa* sp.) micropropagadas, sendo a utilização de doses menores (5%) + turfa + vermiculita, o substrato mais indicado para formação das mudas, sem comprometer os benefícios da simbiose com *G. margarita* (Lins *et al.* 2003). Incrementos de ca. 300% no crescimento de *T. repens* em simbiose com *G. deserticola* foram obtidos apenas quando o solo recebeu resíduo aquoso de oliveiras (Vassilev *et al.* 1998).

Sinergismo positivo entre aplicação de composto de lixo urbano e a inoculação com *G. clarum* sobre o crescimento do milho foi observado por Trindade *et al.* (1996), sendo apontada a necessidade da presença do fungo para melhor aproveitamento do P encontrado no resíduo. Do mesmo modo, em goiabeiras (*P. guajava*) cultivadas em substratos à base de bagaço de cana-de-açúcar e torta de filtro (3:1 v/v), a inoculação com *Glomus clarum* promoveu aumento na massa seca e nos teores de N e P das plantas, em relação ao controle sem FMA (Schiavo & Martins 2002). Videiras micropropagadas, recebendo inóculo misto de FMA (*G. etunicatum*, *G. clarum* e *Acaulospora* sp.) tiveram maior crescimento quando cultivadas em substratos com adubos orgânicos do que em solo sem adubo; no entanto, quando se utilizou o substrato comercial Plantmax[®], o estabelecimento do fungo na raiz foi prejudicado (Zemke *et al.* 2003).

Gaur & Adholeya (2000) observaram que em solo adubado com 50% de composto orgânico de folhas, a inoculação com inóculo misto de FMA (*Gigaspora*, *Scuellospora* e *Glomus*) incrementou em 52% e 46% a massa seca de plantas de cebola (*Allium cepa*) e batata

(*Solanum tuberosum*), respectivamente, em relação às plantas não associadas aos FMA. Mudanças micropropagadas de bambu [*Dendrocalamus asper* (Schultes) Backer ex Heyne] também tiveram crescimento favorecido em solo adubado com ca. 17% de esterco de búfalo, quando associadas a fungos micorrízicos nativos (Verma & Arya 1998). Estes também foram importantes para a produção de óleos essenciais em *Cymbopogon winterianus* cultivado em solo com 100 t ha⁻¹ de esterco de ave (Tanu *et al.* 2004).

O uso de resíduos humificados pode incrementar o crescimento vegetal pelo estímulo de microrganismos benéficos como os FMA, como observado por Linderman & Davis (2001) em solo adubado, com resíduos de videira compostados, para cultivo de cebola (*A. cepa*) associada a *G. intraradices*. Brechelt (1989) também atribuíram aos microrganismos benéficos, presentes no esterco bovino, utilizado para adubação do substrato, o aumento no crescimento de *Capsicum annum* L. em associação com *Acaulospora longula* Spain & Schenck.

A utilização conjunta de resíduos orgânicos e FMA também pode favorecer o estabelecimento de vegetais em áreas semi-áridas (Caravaca *et al.* 2002a). Caravaca *et al.* (2003b) registraram maior crescimento de *Olea europaea* formando simbiose com *G. intraradices* em solo adubado com composto orgânico, após dois anos de experimentação. Com respostas semelhantes, Caravaca *et al.* (2002b) verificaram maior altura de *Pistacia lentiscus* L. em simbiose com *G. intraradices* apenas quando o solo foi adubado com composto de lixo urbano. Esses benefícios são geralmente atribuídos ao aumento na fertilidade do solo (Caravaca *et al.* 2004).

Baby & Manibhusharao (1996) verificaram que o emprego de resíduos orgânicos favoreceu a população nativa de FMA e incrementou o desenvolvimento de plantas de arroz, em relação ao tratamento sem adubação, sendo as respostas dependentes do tipo de resíduo aplicado. No entanto, a necessidade da fase Lag na mineralização dos nutrientes em solo com resíduos orgânicos pode retardar, inicialmente, os benefícios da adubação orgânica. Gleissman *et al.* (1990) relataram que morangueiros cultivados em sistema de produção convencional tiveram maior produção foliar e de frutos do que aqueles cultivados em sistema orgânico. Por outro lado, o uso de 30 ou 60 t ha⁻¹ de esterco, além de possibilitar a formação da micorriza, foi mais favorável ao crescimento de *T. subterraneum* do que a fertilização com 0,025 ou 0,044 t P ha⁻¹ (Joner 2000).

O uso de fertilizantes orgânicos pode não afetar o crescimento do hospedeiro associado com FMA. Como observado por Alloush *et al.* (2000), a aplicação de 125 t ha⁻¹ de esterco bovino não favoreceu o crescimento de *Cicer areitinum* em simbiose com *Glomus*

clarum. Com respostas similares, Palenzuela *et al.* (2002) não registraram aumento no crescimento de *Rhizomucor luteus* L. associada a *G. intraradices* e cultivada em solo com 67 t ha⁻¹ de composto orgânico. Abdel-Fattah & Mohamedin (2000) também verificaram que em substrato com 1% de quitina, a aplicação de FMA é dispensável para incrementar o crescimento do sorgo (*Sorghum bicolor*).

O uso de fertilizantes é importante para assegurar a produtividade de culturas. No entanto, quando aplicado indevidamente pode comprometer os benefícios da simbiose micorrízica como verificado em sorgo (*S. bicolor*) e soja (*G. max*), que tiveram produtividade favorecida quando cultivados em solo adubado com esterco bovino (15,8 t ha⁻¹ ano⁻¹), mas a colonização foi inibida nesta condição (Ellis *et al.* 1992). Souza *et al.* (2005) também registraram que o uso de 20% de composto de casca de acácia-negra no substrato para cultivo de porta-enxertos de citrus [*Poncirus trifoliolata* (L.) Raf.] prejudicou a atuação de *Acaulospora scrobiculata* Trappe e *G. clarum*, o que não ocorreu quando o substrato era constituído por solo e areia.

4. Produção de inóculo de FMA

4.1. Considerações gerais

Como organismos benéficos aos vegetais, dentre estes vários de interesse agrônomo, os FMA devem ser produzidos em larga escala, visando sua aplicação e conseqüente redução dos insumos agrícolas (Bagyaraj & Reddy 2005). No entanto, o caráter simbiotrófico do fungo tem dificultado a produção de inóculo em larga escala visto que, diferentemente de outros fungos de interesse biotecnológico, os FMA necessitam de um hospedeiro vegetal compatível para completar o ciclo de vida e assim produzir propágulos que irão constituir o inoculante desses fungos (Gianinazzi *et al.* 1988; Strullu *et al.* 1991). Mesmo com várias pesquisas no campo de produção de inóculo de FMA, não se conseguiu propagar o fungo axenicamente (Douds *et al.* 2005).

No Brasil, o campo de pesquisa para produção e comercialização de inóculo de FMA é promissor e pouco estudado, visto que não existem inoculantes disponíveis no mercado, como acontece no exterior (Siqueira & Klauber Filho 2000). Além disso, o conhecimento limitado da biologia dos FMA dificulta a comercialização, sendo necessários avanços nas tecnologias de produção e armazenamento do inóculo (Azcón-Aguilar & Barea 1997). Transposto este obstáculo, várias culturas poderão ser efetivamente beneficiadas pela simbiose micorrízica

arbuscular. No entanto, tentativas têm sido feitas para maximizar o processo e o emprego de substâncias que estimulam o crescimento micelial dos FMA, como tampões orgânicos, apontados como ferramentas na maximização da produção de propágulos de FMA (Millner & Kitt 1992; Vilariño *et al.* 1997; Karandashov *et al.* 2000).

Fatores como tipo de hospedeiro, características físico-químicas do substrato de cultivo (Sieverding 1991), e o método escolhido, devem ser levados em consideração na produção de inóculo de FMA (Jarstfer & Sylvia 1992; Sylvia 1994).

O hospedeiro para multiplicação de FMA deve ser tolerante a alta intensidade luminosa, ser propagado por sementes, produzir abundante sistema radicular e que este seja extensivamente colonizado pelos fungos (Sylvia & Jarstfer 1994; INVAM, 1995). Vários vegetais possuem esses requisitos, e podem ser utilizados como plantas multiplicadoras (Tabela 1); todavia, a escolha vai depender da disponibilidade e da tolerância do vegetal à temperatura local e ao ataque de pragas (Sieverding 1991).

Tabela 1. Exemplos de hospedeiros utilizados na produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA)

Hospedeiro	Referência
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Dugassa <i>et al.</i> (1995); Hawkins & George (1997)
<i>Paspalum notatum</i> Flüggé	Sylvia & Hubbel (1986); Wu <i>et al.</i> (1995) Douds & Schenck (1990a); Struble & Skipper (1988) INVAM (1995); Douds <i>et al.</i> (2005)
<i>Ipomoea batatas</i> L.	Wu <i>et al.</i> (1995); Jarstfer <i>et al.</i> (1998) Paiva <i>et al.</i> (2003)
<i>Allium cepa</i>	Jarstfer <i>et al.</i> (1998); Gaur & Adholeya (2000)
<i>Manihot esculenta</i> Crantz	Potty (1985)
<i>Sorghum bicolor</i>	Zambolim <i>et al.</i> (1992); Raju <i>et al.</i> (1990)
<i>Sorghum vulgare</i> Piper Hitch	Struble & Skipper (1988); Hetrick & Bloom (1986) Gaur & Adholeya (2002)
<i>Sorghum sudanense</i> Staph	Mohammad <i>et al.</i> (2000)
<i>Glycine max</i>	Struble & Skipper (1988); Luedders <i>et al.</i> (1979) Bethlenfalvay <i>et al.</i> (1982)
<i>Panicum maximum</i> Jacq.	Bagyaraj & Manjunath (1980)
<i>Panicum miliaceum</i>	Louis & Lim (1988a)
<i>Tagetes erecta</i> L.	Hetrick & Bloom (1986)
<i>Daucus carota</i>	St-Arnaud <i>et al.</i> (1996); Douds (1997)

	Bécard & Piché (1989a,b); Declerck <i>et al.</i> (1998)
	Douds (2002)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Hetrick & Bloom (1986)
<i>Zea mays</i>	Simpson & Daft (1990); Huang & Tang (1988)
	Elmes & Mosse (1984); Millner & Kitt (1992)
	Gaur & Adholeya (2002)
<i>Trifolium pratense</i>	Chen <i>et al.</i> (2001)
<i>Trifolium alexandrinum</i> L.	Gaur & Adholeya (2002)
<i>Trifolium parviflorum</i> Bunge ex Nyman	Mac Donald (1981)
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Elmes & Mosse (1984)
<i>Triticum aestivum</i>	Thompson (1986); Simpson & Daft (1990)
	Hawkins & George (1997); INVAM (1995)
<i>Solanum tuberosum</i>	Gaur & Adholeya (2000)
<i>Pennisetum americanum</i> L.	Simpson & Daft (1990)
<i>Allium sativum</i>	Gaur & Adholeya (2000)
<i>Pueraria phaseoloides</i>	INVAM (1995)
<i>Avena sativa</i> L.	Gaur & Adholeya (2002)
<i>Cicer arietinum</i>	Simpson & Daft (1990)
<i>Polianthes tuberosa</i> L.	Gaur <i>et al.</i> (1998)
<i>Medicago sativa</i>	Gaur & Adholeya (2002)

Várias metodologias têm sido desenvolvidas para produção de inóculo de FMA (Tabela 2) e todas demandam meses para produção de propágulos do fungo (Wood 1991). Entretanto, na perspectiva da aplicação em larga escala, deve-se optar pelo método mais econômico e prático, em termos de instalação e manutenção (Gianinazzi *et al.* 1988; Mehrotra 2005). A escolha vai depender da disponibilidade de material para estabelecimento do sistema de produção, bem como da aplicação que se deseja fazer com o inóculo produzido (Saggin-Júnior & Lovato 1999). Independente da técnica selecionada, o sucesso na multiplicação dependerá de fatores como teores de nutrientes (Jarstfer *et al.* 1998), especialmente o P (Douds *et al.* 2005; Bhadalung *et al.* 2005), pH (van Aarle *et al.* 2002) e temperatura do meio (Raju *et al.* 1990; Gavito *et al.* 2005), os quais devem ser determinados para cada isolado de FMA.

Tabela 2. Principais métodos para produção de inóculo de FMA

Métodos	FFMA multiplicado	RReferência
<i>Cultivo em solo</i>		
	<i>Gigaspora margarita</i>	Cardoso & Sanhueza (1985) Struble & Skipper (1988) Douds & Schenck (1990a)
	<i>Glomus fasciculatum</i>	Cardoso & Sanhueza (1985)
	<i>Glomus mosseae</i>	Struble & Skipper (1988) Potty (1985) Kuszala <i>et al.</i> (2001)
	<i>Glomus claroideum</i>	Struble & Skipper (1988)
	<i>Glomus clarum</i>	Paiva <i>et al.</i> (2003)
	<i>Glomus etunicatum</i>	Struble & Skipper (1988) Paiva <i>et al.</i> (2003)
	<i>Glomus macrocarpum</i>	Struble & Skipper (1988)
	<i>Glomus manihots</i>	Sieverding (1991)
	<i>Glomus intraradices</i>	Bagyaraj & Manjunath (1980)
	<i>Acaulospora laevis</i>	Gazey <i>et al.</i> (1992)
	<i>Acaulospora longula</i>	Luedders <i>et al.</i> (1979)
	<i>Acaulospora appendicula</i>	Sieverding (1991)
	Spain, Sieverding & Schenck	
	Entrophospora colombiana	Sieverding (1991)
	Spain & Schenck	
<i>Cultivo em areia</i>		
	<i>Glomus</i> sp.	Jarstfer <i>et al.</i> (1998)
	<i>G. clarum</i>	Simpson & Daft (1990)
	<i>G. etunicatum</i>	Millner & Kitt (1992)
	<i>G. margarita</i>	
	<i>G. mosseae</i>	Millner & Kitt (1992) Elmes & Mosse (1984) Thompson (1986)
	<i>G. fasciculatum</i>	Elmes & Mosse (1984) Thompson (1986)
Misturas específicas		
Areia e solo	<i>G. mosseae</i>	Luedders <i>et al.</i> (1979)
	<i>G. fasciculatum</i>	Bagyaraj & Manjunath (1980)
Solo e argila expandida	<i>Glomus geosporum</i>	Kuszala <i>et al.</i> (2001)
	<i>G. fasciculatum</i>	Kuszala <i>et al.</i> (2001)

Argila expandida	<i>Gigaspora rosea</i>	Kuszala <i>et al.</i> (2001)
Fibra de vidro	<i>Glomus aggregatum</i>	Huang & Tang (1988)
Areia e “glass beads”	<i>G. mosseae</i>	Chen <i>et al.</i> (2001)
Turfa + solo + vermiculita + esterco	<i>G. etunicatum</i>	Zambolim <i>et al.</i> (1992)
Solo + composto de folhas	<i>Glomus</i> sp.	Gaur & Adholeya (2002; 2005)
	<i>Gigaspora</i> sp.	
	<i>Scutellospora</i> sp.	
Solo + areia + celulose ou quitina	<i>G. claroideum</i>	Gryndler <i>et al.</i> (2002, 2003)
	<i>G. mosseae</i>	
	<i>G. geosporum</i>	
Vermiculita + composto orgânico	<i>G. mosseae</i>	Douds <i>et al.</i> (2005)
	<i>G. etunicatum</i>	
	<i>G. geosporum</i>	
	<i>G. claroideum</i>	
	<i>G. intraradices</i>	
	<i>Gigaspora gigantea</i>	

Hidroponia

<i>Glomus caledonium</i>	Mc Donald (1981)
<i>G. mosseae</i>	Hawkins & George (1997)
<i>G. intraradices</i>	Dugassa <i>et al.</i> (1995)

Aeroponia

<i>E. colombiana</i>	Souza <i>et al.</i> (1996)
<i>Entrophospora kentinensis</i> Wu & Liu	Wu <i>et al.</i> (1995)
<i>G. clarum</i>	Paiva <i>et al.</i> (2003)
<i>G. etunicatum</i>	Wang & Tschen (1994)
	Paiva <i>et al.</i> (2003)
<i>G. intraradices</i>	Dugassa <i>et al.</i> (1995)
	Mohammad <i>et al.</i> (2000; 2004)
	Sylvia & Hubbel (1986)
<i>G. fasciculatum</i>	Wang & Tschen (1994)
<i>G. mosseae</i>	Sylvia & Hubbel (1986)
<i>Glomus</i> sp.	Jarstfer <i>et al.</i> (1998)

Cultivo in vitro

<i>G. margarita</i>	Becárd & Piché (1989a,b) Gadkar & Adholeya (2000) Miller-Wideman & Watrud (1984)
<i>G. intraradices</i>	Chabot <i>et al.</i> (1992) Declerck <i>et al.</i> (1998) Diop <i>et al.</i> (1994a,b) Douds (2002) Juge <i>et al.</i> (2002) St-Arnaud <i>et al.</i> (1996) Gavito <i>et al.</i> (2005)
<i>G. fasciculatum</i>	Declerck <i>et al.</i> (1998)
<i>G. macrocarpum</i>	Declerck <i>et al.</i> (1998)
<i>G. mosseae</i>	Douds (1997)
<i>Glomus versiforme</i>	Diop <i>et al.</i> (1994a,b) Declerck <i>et al.</i> (1996a,b; 1998)
<i>Glomus cerebriforme</i> McGee	Gavito <i>et al.</i> (2005)
<i>Glomus proliferum</i> Dalpé et Declerck	Gavito <i>et al.</i> (2005)

4.2. Uso de resíduos orgânicos para produção de inóculo de FMA

A reprodução dos FMA pode ser afetada pela presença da matéria orgânica do solo, visto que tanto esporos quanto os demais propágulos do fungo estão geralmente aderidos às partículas orgânicas (Gianinazzi-Pearson *et al.* 1984), havendo comumente estímulo na esporulação quando fontes orgânicas são aplicadas ao solo (Baby & Manibhushanrao 1996; Douds *et al.* 2005). Este benefício é decorrente da alteração na concentração de nutrientes (Muthukumar & Udaiyan 2002) e aumento na aeração (Sieverding 1991) do solo pela adubação, porém elevados teores de P podem inibir a reprodução de FMA (Mohammad *et al.* 2004).

Substratos com 2-4 % de matéria orgânica são indicados para cultivo de FMA (Sieverding 1991), no entanto, o emprego de fontes orgânicas pode favorecer ou não a abundância (Harinikumar & Bagyaraj 1989; Kurle & Pfleger 1994; Noyd *et al.* 1996) e a diversidade (Oehl *et al.* 2003; 2004) de espécies de FMA. Focchi *et al.* (2004) não registraram benefício da aplicação de adubos orgânicos sobre a abundância e diversidade de FMA em citros. *Glomus* é o gênero de FMA mais referido em áreas orgânicas (Galvéz *et al.* 2001), pois a produção de esporos neste grupo é favorecida pelo aumento nos teores de matéria orgânica

do solo (Carrenho *et al.* 2001). Por outro lado, espécies de *Gigaspora* e *Scutellospora* têm sido referidas com baixa frequência de ocorrência (Frank-Snyder *et al.* 2001; Oehl *et al.* 2003; 2004;). Enquanto espécies de *Acaulospora* e *Entrophospora* Ames & Schneider não tinham sido registradas em áreas orgânicas (Douds *et al.* 1993; 1995; 1997; Galvéz *et al.* 2001; Franke-Snyder *et al.* 2001). No entanto, recentemente, Oehl *et al.* (2003; 2004) encontraram espécies de Acaulosporaceae em áreas com plantio orgânico, na Suíça.

Em algumas situações, o uso de resíduos pode comprometer a produção de esporos de FMA, como observado por Ishac *et al.* (1986), os quais registraram redução na taxa de reprodução de fungos nativos quando 5 g dm⁻³ de composto de lixo foi adicionado ao solo para cultivo do trigo (*Triticum aestivum*). Este tipo de resposta pode estar relacionada à composição química (Roldán & Albaladejo 1993), à presença de metais pesados (Ortega-Larrocea *et al.* 2001) e ao teor de P (Gaur & Adholeya 2000) presente no resíduo aplicado. Entretanto, em algumas situações a concentração de P no substrato para cultivo de FMA não inibe a propagação dos fungos. O uso de areia adubada com 111 mg P dm⁻³ não inibiu a esporulação de *G. mosseae* (Vestberg 1992) e a presença de 1800 mg P dm⁻³ no composto orgânico favoreceu a produção de inóculo misto de FMA em condições de campo (Douds *et al.* 2005).

O aumento nos teores de matéria orgânica do solo é positivamente correlacionado com a produção de esporos de FMA (Mohammad *et al.* 2003), sendo alternativa de baixo custo na otimização da produção de inóculo e favorecendo a adaptação dos fungos ao manejo orgânico. No entanto, poucos ensaios visando selecionar fontes e proporções adequadas de resíduos orgânicos para este fim têm sido conduzidos. Elevada esporulação (ca. 70 esporos g⁻¹ substrato) de *G. etunicatum* foi obtida por Zambolim *et al.* (1992), os quais utilizaram substrato à base de solo, turfa e vermiculita enriquecido com esterco de galinha. Com resultados semelhantes e em experimentos independentes, sucesso na esporulação de *G. claroideum*, *G. geosporum* e *G. mosseae* foi obtido quando se incorporou 2 g quitina L⁻¹ (Gryndler *et al.* 2003) ou 2 g celulose L⁻¹ (Gryndler *et al.* 2002) no substrato de cultivo dos fungos, em associação com *Plantago lanceolata* por 11 meses.

Para minimizar os custos de aquisição de inoculante micorrízico pode-se optar pela propagação de FMA em campo, pois elevada esporulação (700 esporos g⁻¹ substrato) de *Glomus occultum* (*Paraglomus occultum* Morton & Redecker) foi registrada por Sieverding (1991) em condições de campo, na Colômbia. Porém, a solarização do solo deve ser conduzida para reduzir a contaminação do inóculo produzido (Tarafdar 2005). O emprego de fontes orgânicas que estimulem a propagação de FMA presentes no campo tem sido apontado

como alternativa para produção de FMA na propriedade agrícola (Gaur & Adholeya 2005). Elevada esporulação (ca. 80 esporos g⁻¹ solo) de espécies de *Gigaspora*, *Glomus* e *Scutellospora* foi obtida em solo adubado com cerca de 30% de composto de folhas e utilizando-se *Sorghum vulgare* como hospedeiro (Gaur & Adholeya 2002). De modo similar, Douds *et al.* (2005) registraram elevada produção de esporos (ca. 80 cm⁻³ substrato) e de propágulos infectivos de FMA (ca. 530 cm⁻³ substrato) utilizando composto orgânico e vermiculita (1:4 v/v) e *Paspalum notatum* como planta multiplicadora, em condições de campo. No entanto, para o hospedeiro, os benefícios da aplicação de inoculantes produzidos em substratos com resíduos ainda não foram determinados.

4.3. Infectividade e estocagem de inóculo

A infectividade do inóculo refere-se à capacidade dos propágulos em colonizar a raiz de hospedeiro susceptível (Plenchette *et al.* 1989), sendo característica importante na seleção de inoculantes para aplicação na agricultura (Abbott *et al.* 1994). Ensaios (Moorman & Reeves 1979; Sieverding 1991; Feldman & Idzack 1994) para determinar a qualidade do inóculo consistem na utilização de planta altamente micotrófica, geralmente o milho (*Zea mays*), cultivada em substrato com proporções decrescentes do inóculo a ser testado; após 30 dias da emergência das plantas, as raízes são examinadas quanto à formação da micorriza, podendo-se estimar a colonização (INVAM 2001) ou simplesmente assinalar a presença de estruturas características da simbiose micorrízica arbuscular, para posterior determinação do número mais provável de propágulos infectivos de FMA no inóculo. Fatores como tipo de hospedeiro, substrato diluente e condições experimentais podem alterar os resultados obtidos no ensaio (Wilson & Trinick 1982). Além dos bioensaios de infectividade, pode-se fazer uso de corantes vitais, como o INT (iodonitrotetrazolium) para estimar a viabilidade de esporos de FMA (Walley & Germida 1995).

Para validação comercial de inóculo de FMA, cultiva-se o milho em substrato com 10% de inoculante. Trinta dias após o início do experimento, o inóculo que produzir pelo menos 25% de colonização nas raízes do hospedeiro é tido como viável para comercialização (Sylvia 2001; INVAM 2001).

Após o inóculo ter sido produzido, é necessário mantê-lo viável para fins de pesquisa ou aplicação na agricultura. Esse aspecto está relacionado à estocagem de inoculante de FMA, que tem sido pouco documentada (Sylvia 1999), especialmente em sistemas para produção desses fungos sem utilização de solo (INVAM 1994a).

Quando o inóculo é produzido de modo convencional, o solo ou a mistura específica utilizada como substrato para cultivo do fungo servem como veículo para armazenamento (INVAM 1994b). Após secagem, o substrato é comumente acondicionado em sacos de polietileno (Bagyaraj 1994) e armazenado a 8-10 °C (Sieverding 1991). Para eleger o método mais eficaz na preservação da viabilidade dos propágulos contidos no substrato, tanto para fins comerciais quanto na manutenção de bancos de germoplasmas de FMA (Kuszala *et al.* 2001), a umidade do meio e a temperatura de estocagem devem ser levadas em consideração. Por outro lado, o fungo multiplicado *in vitro*, com raízes transformadas, pode ser armazenado a 4 °C (Plenchette *et al.* 1996) ou encapsulado em matriz de alginato de sódio, sem perder a capacidade de colonizar o hospedeiro (Declerck *et al.* 1996a; Jaizme-Veja *et al.* 2003).

Além dos fatores abióticos (temperatura e umidade do substrato) influenciarem na preservação do potencial infectivo (Bendavid-Val *et al.* 1997), o estágio do ciclo de vida do fungo pode afetar a infectividade do inóculo, visto que as hifas de alguns FMA são infectivas se a esporulação não tiver sido iniciada, como observado em *Acaulospora laevis* (Jasper *et al.* 1993). A maturidade e o tamanho dos esporos presentes no inóculo também podem influenciar a infectividade. Gazey *et al.* (1993) consideraram que esporos com maior diâmetro apresentam retardo na germinação e maior produção de hifas germinativas do que aqueles com dimensões menores, que germinam mais rápido, porém com menor comprimento micelial. Estes comportamentos devem ser considerados na certificação comercial de inoculantes.

O tipo de estrutura fúngica presente no inóculo de FMA influencia o potencial infectivo. Staddon & Fitter (2001) registraram que hifas perderam a infectividade após estocagem a 5 °C por três semanas, enquanto a viabilidade das vesículas não foi alterada, indicando que essas estruturas são responsáveis pela infectividade, quando se utiliza raízes colonizadas e estocadas como fonte de inóculo.

Células auxiliares não são hábeis em colonizar o hospedeiro, não atuando como fonte de propagação desses fungos (Bierman & Linderman 1983; Sieverding 1991). Servem, por outro lado, como sítio temporário de estocagem de fontes de carbono (Mehrotra 2005), com o pico de produção dessas estruturas antecedendo a esporulação (INVAM 1993). Declerck *et al.* (2004) verificaram que houve recrescimento de hifas a partir de células auxiliares de *Scutellospora reticulata* (Koske, Miller & Walker) Walker & Sanders; entretanto, o micélio formado não foi hábil em colonizar raízes de alho (*Allium porrum* L.) e cenoura (*Daucus carota*).

Esporos, além de serem a principal fonte de inóculo, são os propágulos com maior durabilidade na ausência de hospedeiro (Gazey *et al.* 1993). Quando presentes e quiescentes, garantem a infectividade do inóculo (Daft *et al.* 1987). Plenchette *et al.* (1996) verificaram que raízes de *D. carota* colonizadas por *G. versiforme in vitro* apresentaram maior infectividade em relação aos esporos.

A umidade do substrato no qual o inóculo foi produzido deve ser adequada para não acentuar a perda da infectividade com a estocagem, como enfatizado por Ruiz-Lozano & Azcón (1996), os quais registraram perda no potencial infectivo de inóculos de *G. deserticola*, *G. fasciculatum* e *G. mosseae* em solo completamente seco após 6 meses de estocagem a 28-32 °C. Afek *et al.* (1994) observaram que não houve perda na infectividade de inóculos secos e armazenados a 24 °C, enquanto aqueles úmidos foram melhor preservados quando armazenados a 9 °C, temperatura que reduz a proliferação de microrganismos. Todavia, Menge (1984) menciona que o inóculo deve estar seco, com umidade de 1-10 %, antes de ser armazenado. Sieverding (1991) sugere que o armazenamento de inoculo úmido (5 % de umidade) favorece a proliferação de microrganismos, mesmo em baixas temperaturas (4-8 °C).

As condições de produção de FMA podem afetar a viabilidade do inóculo (Tommerup 1988) e recomendações para manutenção do fungo nas condições em que foi produzido têm sido feitas (Daft *et al.* 1987; Nadarajah & Nawani 1987). Louis & Lim (1988b) observaram que um isolado de *G. clarum* de região tropical manteve a infectividade quando armazenado em temperaturas características de clima tropical (25-30 °C).

A manutenção de inóculo de FMA em baixas temperaturas (4 °C, por exemplo) é prática comum nos laboratórios de pesquisa com FMA (Filion *et al.* 2001; Plenchette & Strullu 2003; Mehrotra 2005). Esta recomendação tem sido feita devido à redução no metabolismo (Tommerup 1983a), na mortalidade (Juge *et al.* 2002), aumento na sincronização da germinação (Safir *et al.* 1990), quebra de dormência dos esporos (Tommerup 1983b; Gemma & Koske 1988; Kim *et al.* 2002), assim como à ativação de promotores ou inibição de bloqueadores da germinação dos esporos pelo frio (Tommerup 1987). Nemec (1987) registrou que o armazenamento por 175 dias, em baixas temperaturas (1,1 °C, 4 °C e 10 °C), preservou a viabilidade do inóculo de *G. intraradices* em relação à estocagem a 16 ou 21 °C. Por outro lado, Kuszala *et al.* (2001) observaram que inóculos de 20 espécies de FMA dos gêneros *Acaulospora*, *Gigaspora*, *Glomus* e *Scutellospora* mantiveram a capacidade de colonizar o hospedeiro, independentemente da temperatura em que foram armazenados (18-24 °C, +4 °C, -18 °C, -80 °C).

É desejável que o inóculo mantenha a infectividade por longos períodos (Nemec 1987), porém, estocagens prolongadas podem reduzir o potencial infectivo de FMA (Gould & Liberta 1981; Warner 1983; Hardie 1984; Plenchette & Strullu 2003). Tommerup (1984) mencionou que esporos germinados de *A. laevis* e *Glomus caledonium* podem manter a infectividade por até quatro meses de armazenamento.

Além dos métodos tradicionais para manutenção da viabilidade de propágulos de FMA, pode-se fazer uso da criopreservação. Hifas externas de FMA não associadas ao hospedeiro podem manter a infectividade depois de submetidas ao congelamento (Addy *et al.* 1994), sendo este benefício mais pronunciado quando os propágulos passam por pré-condicionamento ao frio antes de serem submetidos a temperaturas abaixo de -12 °C (Addy *et al.* 1998). Douds & Schenck (1990b) obtiveram resultados satisfatórios quando congelaram os esporos de FMA no substrato em que foram propagados. Do mesmo modo, Nemec (1987) não registrou prejuízo na formação de micorriza por *G. intraradices* após o inóculo ter sido congelado por 62 h.

Tommerup (1988) mencionou que a utilização de “L-Drying”, que consiste na dessecação à vácuo ($1,3 \times 10^{-6}$ MPa), é eficiente na preservação do potencial germinativo de *A. laevis*, *G. caledonium*, *G. fasciculatum*, *Glomus monosporum* Gerdemann & Trappe e *Scutellospora calospora* Nicolson & Gerdemann (Walker & Sanders), por 8 anos, podendo ser utilizada na estocagem de FMA em larga escala. Outras técnicas utilizadas são a liofilização (Kuszala *et al.* 2001) e o encapsulamento em alginato (Strullu *et al.* 1991; Strullu & Plenchette 1991).

Conhecimento sobre a estocagem de inóculo de FMA é restrito aos fungos cultivados em solo (Douds & Schenck 1990a, por exemplo), em sistemas aeropônicos (Sylvia 1994) e *in vitro* (Plenchette & Strullu 2003). Não foram determinadas as condições ideais de armazenamento de FMA produzidos em substratos com resíduos orgânicos, que constitui metodologia viável e de baixo custo na produção de inoculante desses fungos (Douds *et al.* 2005).

5. Seleção de inoculantes de FMA para aplicação na agricultura

Em programas de inoculação de FMA, a seleção de inóculo infectivo e efetivo é etapa crítica para o sucesso da tecnologia micorrízica (Sylvia 1998; Calvente *et al.* 2004; Bagyaraj & Reddy 2005). Nesse aspecto, apesar de não existir especificidade hospedeira na micorriza

arbuscular (Bagyaraj 1994), a compatibilidade funcional diferenciada entre os simbioses deve ser considerada (Bâ *et al.* 2000; Sylvia *et al.* 2003).

Para ser classificado como bom inoculante o FMA deve apresentar características especiais, tais como: colonizar rapidamente o córtex radicular, produzir elevada biomassa no solo e ser eficiente em aumentar o crescimento e o teor de nutrientes do hospedeiro (Abbott *et al.* 1994).

De acordo com Wood (1991), vários fatores tais como: dependência micorrízica, competição com FMA nativos e inibição da simbiose pelos elevados níveis de fertilidade do solo podem afetar a eficiência do inóculo de FMA. Nesse sentido, Lambert *et al.* (1980) mencionam que o emprego de FMA adaptados a fatores do solo pode trazer mais benefícios para o hospedeiro, pois os fungos são mais competitivos.

Os FMA apresentam diferenças fisiológicas, inter e intraespecíficas, que se revelam no comportamento diferenciado na fase assimbiótica (Pawlowska & Charvat 2004) e na promoção do crescimento vegetal (Sieverding 1991; Sieverding & Galvez 1988; Stürmer 2004; Munkvold *et al.* 2004). Isolados de *G. intraradices*, oriundos de áreas agrícolas na Suíça, tiveram taxa diferenciada de produção de micélio e esporos (Koch *et al.* 2004). Comprovando este fato, Giovannetti *et al.* (2003) verificaram que isolados de *Glomus mosseae*, de regiões geográficas distintas, apresentaram incompatibilidade vegetativa de hifas (ausência de anastomose), o que não ocorreu entre as hifas do mesmo isolado, indicando que a propagação em condições edáficas distintas pode interferir na fisiologia dos FMA. Diante do comportamento distinto de isolados de FMA, seleção prévia de inoculante deve ser feita antes de recomendação para aplicação na agricultura.

O emprego de FMA nativos promove maior desenvolvimento (Quatrini *et al.* 2003) e taxa de reprodução (Varshney *et al.* 2002) das plantas associadas em relação à inoculação com fungos exóticos. Este comportamento é geralmente atribuído à adaptação genética e fisiológica dos fungos (Caravaca *et al.* 2005a) e tem sido relatado tanto em condições de casa de vegetação (Ananthakrishnan *et al.* 2004) como em campo (Sylvia *et al.* 1993). Medina *et al.* (2004a) verificaram que o uso de fungos nativos favoreceu o crescimento de *Dorycnium pentaphyllum* comparado com a aplicação de FMA exóticos. Similarmente, Calvente *et al.* (2004) observaram maior crescimento de oliveiras (*Olea europaea*) quando fungos nativos foram usados, em relação aos introduzidos. A utilização de inóculo de FMA nativo também pode ser alternativa no estabelecimento de plantas em ambientes desertificados, como registrado por Requena *et al.* (2001). Em contrapartida, Lesuer *et al.* (2001) observaram que o

local de origem dos FMA não afetou a concentração de P na parte aérea de *Calliandra calothyrsus* Meissn.

Isolados fisiologicamente superiores em promover o crescimento vegetal podem ser obtidos quando o fungo é multiplicado na condição edáfica que será usado (Graham *et al.* 1982). Devido a diferenças fisiológicas intraespecíficas observadas entre os FMA (Haas & Krikum, 1985) e da capacidade de adaptação desses fungos às condições edáficas (Drew *et al.* 2003), Bethlenfalvay *et al.* (1989) sugerem a troca do termo “ecotipo” por “edafotipo”, definindo-o como “variantes intraespecíficas de FMA que são de diferentes origens edáficas e apresentam respostas fisiológicas diferenciadas em uma mesma planta cultivada em um mesmo solo”. Nesse sentido, Clark *et al.* (1999a,b) registraram que FMA oriundos de solos ácidos foram mais eficientes em promover o crescimento de *Panicum virgatum* L. em solo ácido (pH_{CaCl2} 4,0), indicando que o pH do meio onde o FMA foi isolado pode interferir na resposta do hospedeiro, devendo esse aspecto ser considerado em programas de inoculação. Contudo, o comportamento diferenciado de isolados da mesma espécie pode ser dependente da variável de crescimento estudada (Munkvold *et al.* 2004).

Em ambientes salinos, Pond *et al.* (1984) registraram que FMA provindos de áreas salinizadas foram mais eficientes em promover o crescimento do tomateiro. De modo similar, a temperatura em que o FMA é multiplicado pode afetar a eficiência simbiótica, como ressaltado por Sieverding (1988) na simbiose *Manihot esculenta* e *Entrophospora colombiana*.

Maximização dos benefícios do FMA para o hospedeiro, em solos contaminados por metais, também já foi evidenciada quando os fungos foram multiplicados em substrato contaminado (Gildon & Tinker 1981; del Val *et al.* 1999). Este comportamento foi registrado para solos impactados por cobre (Gonzalez-Chavez *et al.* 2002), cádmio (Tulio *et al.* 2003; Weissenhorn *et al.* 1993; Vivas *et al.* 2003a; 2003b), zinco (Weissenhorn *et al.* 1994; Joner *et al.* 2000) e manganês (Malcová *et al.* 2003), sendo os isolados adaptados superiores em promover o crescimento vegetal, em relação àqueles não condicionados ao impacto.

A tolerância ao estresse hídrico também pode ser maximizada pela aplicação de FMA adaptados a esta condição, como apontado por Davies Jr. *et al.* (2002) na simbiose *Capsicum annuum* e várias espécies de *Glomus* providas de solo submetido a estresse hídrico. Com resultados semelhantes, Bethlenfalvay *et al.* (1989) relataram que *G. mosseae* oriundo de áreas áridas foi mais eficiente em promover o crescimento de *Glycine max*.

O fósforo é um dos nutrientes que controla o estabelecimento da simbiose micorrízica arbuscular (Graham & Abbott 2000; Sharma *et al.* 2001). Os elevados teores

(> 45 mg P dm⁻³) deste macronutriente em solos cultiváveis e em meios para produção de mudas, decorrentes da aplicação de fertilizantes, é um dos empecilhos para aplicação de FMA na agricultura, pois o benefício da micorrização pode ser minimizado (Freitas *et al.* 2004). Diante disso, é desejável o emprego de FMA adaptados e eficientes em solos férteis (Hayman 1982; Gianinazzi *et al.* 1988; Bagyaraj & Reddy 2005), e que sejam competitivos, infectivos e com habilidade em esporular em tais condições (Davis *et al.* 1984). Esses isolados podem ser obtidos pela multiplicação dos fungos em substratos ricos em P, visto que a fertilização pode atuar na seleção de fungos que colonizam o vegetal em solos com elevado teor de P (Sylvia & Neal 1990). Em contrapartida, FMA isolados de ambientes com 7,87 mg P dm⁻³ podem não trazer benefícios para o vegetal (Johnson 1993).

Henkel *et al.* (1989) verificaram que fungos nativos isolados de solos com 9,9 P mg dm⁻³ foram mais eficientes em favorecer a nutrição fosfatada de *Agropyron smithii* Rydb cultivada em solo com 10 mg P dm⁻³, indicando a adaptação dos fungos nativos à condição de baixa fertilidade. Similarmente, Louis & Lim (1988b) registraram que *G. clarum* isolado de solos com 0,03 mg P dm⁻³ promoveu mais benefícios em soja (*Glycine max*) cultivada em solo com baixos níveis de superfosfato triplo aplicado (0,83 g dm⁻³ solo). Porém, Bohrer *et al.* (2003) indicaram que comunidades de FMA oriundas de solo com baixos teores de P (2,15 mg dm⁻³) foram menos eficientes em promover o crescimento de *Vangueria infausta* Burch.

Johnson (1993) registrou que a comunidade de FMA provinda de áreas submetidas a elevada fertilização (62,2 mg P dm⁻³) foi menos eficaz em promover o crescimento de *Andropogon gerardi* Vitm, em relação aos fungos isolados de áreas com fertilização menos intensa (26,5 mg P dm⁻³). Com isso, a autora sugeriu que a fertilização seleciona fungos menos “mutualistas”. Em contrapartida, Stürmer (2004) registrou maior crescimento da soja quando foram inoculados FMA provenientes de áreas com 24 mg P dm⁻³ em relação a fungos isolados de solos contendo 15 mg P dm⁻³.

Scullion *et al.* (1998) observaram que fungos de áreas com manejo orgânico melhoraram a nutrição fosfatada de *Allium ameloprasum* L. e de *Trifolium repens*, em relação aos FMA de áreas com manejo convencional, destacando o efeito benéfico da aplicação de fertilizantes orgânicos na seleção e manutenção de FMA mais eficientes para o hospedeiro (Muthukumar & Udaiyan 2002). Nesse aspecto, a multiplicação do fungo em substrato com adubos orgânicos pode “adaptar” o fungo a essa condição e assim constituir alternativa no beneficiamento de vegetais sob cultivo orgânico, visto que os benefícios de comunidades adaptadas à fertilização são conhecidos (Eason *et al.* 1999). Todavia, para assegurar a

eficiência dos isolados adaptados é necessário manter o cultivo do fungo no substrato com pressão de seleção (metal ou alto nível de nutrientes, por ex.) (González-Chávez *et al.* 2004).

Apesar de evidências de relação entre condição edáfica de origem do isolado de FMA e expressão da eficiência em condição semelhante, Sanders (2004), mesmo sem suporte experimental, sugere que o inóculo deve ser eficiente em várias condições ambientais.

Apesar dos benefícios comprovados da aplicação de FMA adaptados sobre o crescimento do hospedeiro, não se conhece os mecanismos de como isolados de uma mesma espécie podem produzir respostas diferenciadas no hospedeiro (Giovannetti & Gianinazzi-Pearson 1994); no entanto, o local de adaptação pode explicar as variações intraespecíficas (Monzón & Azcón 1996).

Fisiologicamente, os FMA quando são submetidos às condições edáficas em que foram multiplicados ou isolados, apresentam reduzida fase Lag, trazendo mais benefícios aos hospedeiros (Sainz & Arines 1988). Meharg & Cairney (2000) sugerem que em fungos multiplicados em substratos com elevadas pressões de seleção (metais, salinidade, altos níveis de P) ocorre expressão de genes ligados à tolerância, que são transferidos dentro da população, conferindo ao fungo melhor atuação na planta. Por outro lado, Weissenhorn *et al.* (1994) sugeriram que a plasticidade funcional, decorrente de núcleos geneticamente distintos nos esporos de FMA contribui para a adaptação dos fungos a várias condições edáficas. Possivelmente, a condição heterocariótica (Hijri & Sanders 2005) ou homocariótica com variantes de um mesmo gene (Pawlowska & Taylor 2004) é responsável pela amplitude de respostas fisiológicas obtidas quando FMA adaptados a determinado fator edáfico são empregados.

Devido à plasticidade fenotípica dos FMA (Stahl & Christensen, 1991), em algumas situações não se observa melhor atuação, sobre o hospedeiro, de fungos adaptados a determinada condição edáfica em relação ao uso de isolados exóticos (Enkhtuya *et al.* 2000). Tian *et al.* (2004) enfatizaram que o uso de *G. mosseae* isolado de áreas salinizadas aumentou a absorção de NaCl em algodoeiro (*Gossypium arboreum* L.) cultivado em solo salinizado, o que não ocorreu quando as plantas foram inoculadas com um isolado deste fungo não adaptado ao estresse salino. Ruiz-Lozano & Azcón (2000) observaram que *G. deserticola* foi mais eficiente em absorver nutrientes em condições salinas do que espécies autóctones de *Glomus* de áreas salinizadas. Caravaca *et al.* (2003a) registraram melhor atuação do FMA alóctone *Glomus claroideum* no estabelecimento de *Retama sphaerocarpa* (L.) Boissier, em relação aos FMA nativos, em áreas do semi-árido da Espanha.

Assim, o uso de FMA adaptados pode, em alguns casos, não trazer benefícios adicionais ao hospedeiro. Fidebilus *et al.* (2001) não observaram diferenças no crescimento e uso da água por *Citrus volkameriana* Tan. & Pasq. em relação à micorrização com isolados de *Glomus* oriundos de áreas méxicas, semi-áridas ou áridas. Van der Heidjen & Kuyper (2001) também consideraram que a origem do fungo não teve influência no crescimento de *Salix repens* L.

A amplitude de respostas fisiológicas geradas quando FMA adaptados são empregados (Algualcil *et al.* 2003) sugere a prévia seleção de isolados, tanto em ensaios em casa de vegetação quanto em campo, antes da recomendação em programas de inoculação. Em geral, recomenda-se que o fungo introduzido em sistemas agrícolas seja compatível com as condições de solo (Dodd & Thompson 1994). Estudos são necessários para elucidar se os benefícios da micorriza formada por fungos adaptados é decorrente das maiores taxas de germinação e crescimento micelial assimbiótico.

6. A cultura do maracujazeiro-doce

A América Tropical, que abrange a região Amazônica até o Paraguai, incluindo o Nordeste da Argentina, é o principal centro de diversidade genética da família Passifloraceae (Vasconcellos & Duarte-Filho 2000).

No Brasil, *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* (maracujá-amarelo) e *Passiflora alata* (maracujá-doce) são as principais espécies de *Passiflora* L. cultivadas (Lima & Borges 2002; Donadio *et al.* 2002). Porém, o maracujá roxo (*Passiflora edulis* L.), cultivado principalmente na Austrália, África e Sudeste Asiático, ocupa, juntamente com o maracujazeiro amarelo, mais de 90% das áreas plantadas com maracujá no mundo (Braga & Junqueira 2000).

O maracujá amarelo é cultivado no Brasil em cerca de 35 mil hectares (IBGE 2005), colocando o país como o maior produtor mundial (Ruggiero 2000). No panorama brasileiro, o Nordeste apresenta maior área plantada e colhida (ca. 17 mil hectares), sendo considerada a região com maior volume produzido (aproximadamente 214 mil toneladas) (IBGE 2005).

Passiflora alata é nativa e distribuída por todo o Brasil (Manica 2005). São Paulo, Santa Catarina e o Distrito Federal são conhecidos por deterem as maiores produtividades nacionais (Manica & Oliveira Jr. 2005). *Passiflora alata* é conhecida vulgarmente como maracujá-doce, maracujá-de-refresco, maracujá-grande, maracujá-guaçu e ainda, maracujá-de-comer, entre outras denominações. É apreciado pela polpa doce e levemente ácida,

podendo ser consumido *in natura* ou na forma de sucos; porém, devido ao elevado preço e pequena oferta tem o consumo limitado às classes média e alta (Manica & Oliveira Jr. 2005).

Considerada a segunda espécie de maracujá mais cultivada no Brasil, o maracujá-doce alcança valores mais expressivos no mercado de frutas frescas em relação ao maracujazeiro amarelo (Bernacci *et al.* 2003). Porém, apesar do comércio em mercados nacionais do maracujá-doce no Brasil ter sido iniciado na década de 1970 (Junqueira *et al.* 2005b), faltam informações técnicas para o manejo adequado da cultura (Meletti *et al.* 2003). Além disso, não se dispõe de dados referentes à produção e comercialização, visto que os órgãos de levantamento estatístico não segregam as informações do maracujazeiro doce e do amarelo (Vasconcellos *et al.* 2001a).

Os principais mercados para exportação do maracujá-doce são os europeus, norteamericanos e canadenses (Cançado Júnior *et al.* 2000), constituindo cultura alternativa e rentável, devido ao elevado valor agregado dos frutos, que podem alcançar preços entre US\$ 0,3 a US\$ 1,00 por unidade (Braga & Junqueira 2000). Na Colômbia, outras espécies de maracujazeiro [*Passiflora ligulares* Juss e *Passiflora molissima* (Kunt) Bailey] também são exportadas para o mercado europeu (Ruggiero *et al.* 1996; Vasconcellos *et al.* 2001a).

Esta passiflorácea (*P. alata*) possui potencial ornamental, devido à beleza de sua flores (Ruggiero *et al.* 1996; Braga & Junqueira 2000) e participação na indústria farmacêutica, pois apresenta princípios ativos como a passiflorina (Paris *et al.* 2002), que é encontrada em teores próximos a 0,048% nas folhas (Cunha *et al.* 2002) e atua no tratamento da ansiedade e insônia (Leonel *et al.* 2000). Nesse segmento, mais de 100 t ano⁻¹ de folhas secas são comercializadas para laboratórios que produzem fármacos à base dos princípios ativos do maracujá (Silva & Silva-Almeida 2000).

O maracujazeiro-doce é uma trepadeira com crescimento vigoroso, sistema radicular fasciculado que se estende na profundidade e raio de 30 cm e 60 cm, respectivamente (Maldonado *et al.* 1999). O caule tem secção quadrangular e as folhas são alternadas, com 1-2 pares de glândulas na base foliar (Cunha *et al.* 2002). As flores são hermafroditas, auto-incompatíveis, com ântese por volta das 4-5h e fecham-se às 18:30-20h para não mais se abrirem (Vasconcellos, 1991), sendo o mamangava (*Xylocopa* Latr.) principal agente polinizador (Ruggiero *et al.* 1996), porém quando a eficiência da polinização natural não atinge taxas próximas a 30%, recorre-se à polinização artificial, que resulta em aumento da produtividade (Frutiseries 2002). Após fecundação, são necessários 75 dias para que ocorra mudança na coloração verde para amarela na base dos frutos, estágio considerado ideal para a colheita (Oliveira *et al.* 1980).

Devido à inexistência de cultivares de maracujazeiro-doce, a formação de mudas desta frutífera é feita quase exclusivamente por via sexuada (Osipi & Nakagawa 2005b), gerando desuniformidade dos pomares (Lima & Trindade 2002). Além disso, problemas na perda de viabilidade das sementes têm sido identificados, sendo sugerida a semeadura logo após a retirada das sementes do fruto (Lima *et al.* 1999) ou a manutenção das mesmas em baixas temperaturas (10 °C) (Osipi & Nakagawa 2005a). Outros métodos disponíveis são a enxertia, a estaquia e a cultura de tecidos *in vitro* (Meletti & Nagai 1992; Ferreira 2000; Salomão *et al.* 2002), mas tais alternativas não são amplamente empregadas.

Um dos problemas para instalação, manutenção e renovação de maracujais é a produção de mudas certificadas (Melletti 2001; Leonel & Pedroso 2005). Nesta fase, são requeridos substratos ricos em nutrientes para produção das mudas, como sugerido por Ruggiero *et al.* (1996): solo : esterco : bagaço de cana (2:2:1 v/v) + 1Kg de superfosfato simples + 2Kg de calcário dolomítico por metro cúbico de amostra. Prado *et al.* (2004) alertaram que o substrato deve apresentar saturação por bases em torno de 56% e concentrações de Ca e Mg de 20 e 8 mmol_c dm⁻³, respectivamente. Piza Jr. & Kavati (1995) comentam que apenas a adubação do substrato não supre as necessidades do maracujazeiro na formação de mudas, sendo necessária adubação de cobertura semanal com solução contendo 0,05% de sulfato de amônia, 0,05% de cloreto de potássio e 0,01% de superfosfato simples.

Para o maracujá-doce, Manica (2005) indicou 5,0 Kg de superfosfato simples e 0,5 Kg de cloreto de potássio por metro cúbico de substrato à base de solo e esterco (3:1) como padrão para produção de mudas. Entretanto, Lima *et al.* (1995) conseguiram produzir mudas em substrato à base apenas de solo e esterco bovino, sem suplementação com fertilizantes químicos. Leonel & Pedroso (2005) utilizaram substrato composto por solo, esterco e vermiculita (1:1:1) e pulverizações com ácido giberélico para que as mudas fossem formadas em 96 dias. Por sua vez, Borges *et al.* (1995) verificaram a necessidade de 25% de esterco e 104 dias de cultivo para obtenção de mudas com 6-8 folhas, 15-20 cm de altura e presença de gavinhas, características consideradas ideais para o transplântio ao campo (Ruggiero *et al.* 1996).

Uma das maneiras de reduzir os custos de produção de mudas de maracujazeiro é a aplicação de FMA selecionados, como registrado para *P. edulis* f. *flavicarpa* (Soraes e Martins 2000; Cavalcante *et al.* 2001; 2002a) e *P. ligulares* (Rodríguez *et al.* 1995). Porém, a micorrização com *G. etunicatum*, *S. heterogama* e *Entrophospora colombiana* não trouxe benefícios adicionais no crescimento das mudas de maracujazeiro amarelo (Graça *et al.* 1991; Lima *et al.* 1997). O maracujazeiro-doce também é responsivo à inoculação com FMA

selecionados (Silva *et al.* 2004b), o que resulta no aumento de crescimento e redução do tempo de formação das mudas (Anjos *et al.* 2005).

Para o maracujazeiro-amarelo, as respostas benéficas da aplicação conjunta de FMA e adubos orgânicos não são unânimes, visto que a composição do substrato pode afetar o comportamento simbiótico. Silva *et al.* (2001) registraram benefício da micorrização com *G. etunicatum* em substrato com vermiculita, o que não ocorreu quando se utilizou Plantmax[®]. Lima *et al.* (1997) não registraram benefícios da micorrização de mudas de *P. edulis* f. *flavicarpa* por *E. colombiana* e *G. etunicatum* em substrato composto por 20% de esterco bovino, enquanto sinergismo positivo da aplicação de *Glomus* sp. em solo com 10% de esterco foi registrado por Silveira *et al.* (2003). Em maracujazeiro-doce, tem sido recomendado o uso de fontes orgânicas na composição do substrato de formação de mudas (Borges *et al.* 1995), porém não está determinado se os FMA podem contribuir para o crescimento vegetal nesses substratos.

Na formação de pomares, geralmente se utiliza espaçamento variando de 3m x 5m a 5m x 6m, porém em sistemas mais adensados ocorre maior produtividade. Com isso, pode-se instalar de 330 a 1000 plantas por hectare (Vasconcellos 2000). O local para o cultivo deve ter temperaturas médias entre 25-27°C e fotoperíodo de 11 horas; além disso, deve-se optar por solos profundos (60 cm), arenosos, bem drenados, com alto teor de matéria orgânica e com pH entre 5-6 (Ruggiero *et al.* 1996; Luna 1998; Costa *et al.* 2000; Junqueira *et al.* 2002).

O maracujazeiro-doce produz o ano inteiro (Melletti, 2001), apresentando dois picos de frutificação por safra, um mais expressivo em dezembro/janeiro e outro menor em junho/julho (Vasconcellos *et al.* 2001a), com entressafra de três a quatro meses por ano (Salomão 2002). As maiores produtividades são geralmente registradas no segundo (25-35 Kg/planta/ano) e terceiro (20-25 kg/planta/ano) anos de cultivo, visto que apenas 15-20 Kg/planta/ano são obtidos no primeiro ano do plantio (Junqueira *et al.* 2005b).

Disparidades na produtividade do maracujá-doce são decorrentes da ausência de cultivares, da densidade de plantas na área, assim como das adubações empregadas, entre outros fatores (Lima, 1999). Com isso, pode-se obter plantios com produtividade variando de 0,68 até 33,25 t ha⁻¹ (Martins *et al.* 2003); porém, estudos em campo apontam produtividade geralmente oscilando entre 15-20 t ha⁻¹. Silva *et al.* (2004c) registraram média de produtividade em dois anos de cultivo em torno de 17 t ha⁻¹. Vasconcellos *et al.* (2001b) realizaram caracterização física e do teor de nutrientes em frutos de maracujazeiro-doce de cultivo que apresentava produtividade de 15,70 t ha⁻¹ ao final do primeiro ano de produção. Damatto Júnior *et al.* (2005) obtiveram cerca de 20 t ha⁻¹ de frutos no segundo ano de cultivo.

Na cultura do maracujazeiro são necessárias elevadas quantidades de fertilizantes (Silva & Oliveira 2000) para garantir a produtividade, sendo as recomendações de adubação para o cultivo do maracujazeiro-doce feitas com base nas indicações de fertilização para o maracujazeiro-amarelo (Vasconcellos *et al.* 2001a). O uso de adubo orgânico é indicado e pode-se utilizar várias fontes, como o esterco de galinha (9-18 litros), a torta de mamona (6-13 litros) e o esterco de curral (20-30 litros), sendo este último o mais empregado (Borges 1999).

Na adubação de plantio, emprega-se 20-30 litros de esterco bovino e superfosfato simples, cuja dose aplicada é baseada na quantidade de P disponível no solo; por outro lado, na adubação de formação, que inclui o crescimento inicial do vegetal até o florescimento, que ocorre 150-180 dias após o transplantio (Brancher 2005), faz-se as adubações nitrogenadas e potássicas parceladas em três aplicações e a adubação de produção deve ser conduzida no início do florescimento do maracujazeiro (Silva & Oliveira 2000).

Para o maracujá-doce, Sanzonowicz & Andrade (2005) recomendam no plantio a aplicação por cova de 1Kg de superfosfato simples, 10-30 litros de esterco bovino, enquanto na adubação de formação deve-se usar 135 g de N e 90 g de K₂O; após aparecimento dos frutos, são necessários 700 g de superfosfato simples + 100 g de sulfato de amônia + 100 g de cloreto de potássio. Silva *et al.* (2004c) aplicaram 1Kg de Minercal + 190 g de superfosfato simples e 60 g de K₂O por planta e obtiveram produtividade média, em dois anos de cultivo, de 17 t ha⁻¹. Em sistema com uso de adubo orgânico, Damatto Júnior *et al.* (2005) observaram que para se alcançar produtividade em torno de 20 t ha⁻¹ foram necessários 200 g de termofosfato + 137 g de cloreto de potássio + 2,16 g de calcário e 5 Kg de esterco por planta.

Aguiar *et al.* (2005) estimaram que são necessários R\$ 13.996,64 para a instalação do sistema de produção de maracujá-doce, que inclui preparo da área e montagem dos sistemas de condução e de irrigação; após o segundo ano de cultivo, pode-se obter fluxo líquido de caixa em torno de R\$ 10.000. Os autores obtiveram produção de cerca de 15,3, 31,10 e 24,75 t ha⁻¹ no 1º, 2º e 3º anos de cultivo, respectivamente, empregando por cova 1Kg de superfosfato simples + 4 litros de esterco de galinha + 50 g da mistura de micronutrientes FTE BR-12.

Os frutos comercializados apresentam elevada variação morfológica, devido à recente exploração da cultura, sendo necessária a fixação de características importantes relacionadas à qualidade dos frutos (Vasconcellos *et al.* 2001b). Oliveira *et al.* (1982) registraram frutos que variaram de ovais a piriformes (6,85-10,13 cm de comprimento e 4,75-6,93 cm de largura), com casca espessa (7,10-10,00 mm), peso médio entre 89 e 195g, rendimento em polpa de 14 e 21% e formação de 143-276 sementes/fruto. O suco apresenta pH na faixa ácida (3,48-3,56),

elevado teor de sólidos solúveis totais (SST) (15,28-24,70 °Brix), porém possuem baixa acidez total titulável (ATT) (Ruggiero *et al.* 1996), que pode variar 0,60-1,77 % de ácido cítrico (Vasconcellos *et al.* 1993). Estudando as características de frutos obtidos por polinização aberta, em cinco populações de *P. alata*, Martins *et al.* (2003) observaram frutos com rendimento em polpa de 27,27 %, espessura da casca de 11,22 mm, com cavidade ovariana longitudinal de 5,32 cm e transversal de 7,92 cm, comprimento e largura do fruto de 10,89 cm e 7,47 cm, respectivamente, e tempo decorrido da abertura da flor até a colheita variando de 51-66 dias, entre outros caracteres estudados.

Em São Paulo, a comercialização do maracujá-doce é feita em caixetas que podem variar de 3 até 3,7 Kg de fruto por embalagem (Meletti 2001). Porém, Junqueira *et al.* (2002) comentam que a venda dos frutos pode ser feita também em embalagens individuais ou a granel. Por ser consumido principalmente *in natura*, o aspecto externo é considerado tanto pelos consumidores quanto pelos mercados importadores como parâmetro para se avaliar a qualidade dos frutos (Souza *et al.* 2002).

Dentre as doenças que acometem o maracujá-doce estão a bacteriose, causada pela *Xanthomonas campestris* pv. *Passiflorae* (Pereira) Dye e o vírus do endurecimento do fruto (*Passion fruit woodiness virus* – PWV), transmitido por afídeos (Novaes *et al.* 2000; Junqueira *et al.* 2005a); no entanto, a resistência do maracujazeiro-doce ao *Fusarium* Link pode ser alternativa como porta-enxerto para o maracujazeiro amarelo (Meletti *et al.* 2003). O parasitismo do fitonematóide das galhas [*Meloidogyne* (Goeldi 1892)] também pode acarretar prejuízos na produção dessa fruteira (Ritzinger *et al.* 2002), sendo o uso de mudas pré-inoculadas com FMA selecionados, alternativa para redução da população de nematóides (Anjos 2004). Espécies de *Passiflora* servem como abrigo para diversos insetos e ácaros (Fadini & Santa-Cecília, 2000), podendo algumas espécies constituir pragas e reduzir a produtividade dos pomares. Como principais pragas do maracujazeiro-doce pode-se citar a mosca-das-frutas, mosca-dos-botões-florais, percevejos e cupins (Vasconcellos 2000; Icuma *et al.* 2005). Na fase pós-colheita, destaca-se a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Saec, uma das principais doenças que comprometem a comercialização dos frutos (Junqueira *et al.* 2005a).

O Vale do Submédio São Francisco é um dos maiores pólos de exportação de frutas brasileiras, especialmente da uva e da manga. Atualmente, os produtores da região buscam por culturas alternativas com valor agregado e potencial de exportação, como o maracujazeiro-doce (Silva *et al.* 2004c). Isso resulta na diversificação de culturas,

constituindo fonte adicional de renda, especialmente na entressafra das culturas chave da região.

Em condições irrigadas, o maracujazeiro-doce pode ser produzido no semi-árido nordestino, pois em tais locais o fotoperíodo acima de 11 horas diárias permite a produção durante todo o ano (Lima & Borges 2002); além disso, a condição climática da região (elevada temperatura e baixa precipitação pluviométrica) reduz o tempo decorrido da polinização à colheita dos frutos (Vasconcellos 1991). Tais condições podem favorecer a produção de frutos com qualidade superior. Veras *et al.* (2000) observaram que frutos com maior relação SST/ATT e menor ATT foram produzidos em condições de elevadas temperaturas; no entanto, devido aos poucos estudos com a cultura (Vasconcellos *et al.* 2001a), são necessárias informações técnicas que possibilitem o cultivo mais produtivo desta passiflorácea.

7. Referências Bibliográficas

- van Aarle, I.M.; Olsson, P.A. & Sodestrom, B. 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. **New Phytologist** **155**: 173-182.
- Abbott, L.K.; Robson, A.D. & Gazey, C. 1994. Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Pp.461-481. In: J.R. Norris, D. Read & A.K.Varma (eds.). **Techniques for Mycorrhizal Research**. Great Britain Academic Press.
- Abdel-Fattah, G.M. & Mohamedin, A.H. 2000. Interactions between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of braw scales. **Biology and Fertility of Soils** **32**: 401-409
- Abdelhamid, M.T.; Horuuchi, T. & Oba, S. 2004. Composting of rice straw with oilseed rape cake and poultry manure and its effects on fana bean (*Vicia faba* L.) growth and soil properties. **Bioresource Technology** **93** 183-189.
- Abreu Jr., C.H.; Muraoka, T. & Oliveira, F.C. 2001. Cátions trocáveis, capacidade de troca catiônica e saturação por bases em solos brasileiros adubados com composto de lixo urbano. **Scientia Agricola** **58**: 813-824.
- Adan, G. & Duncan, H. 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology and Biochemistry** **33**: 943-951.
- Addy, H.D.; Boswell, E.P. & Koide, R.T. 1998. Low temperature acclimation and freezing of extraradical resistance VA mycorrhizal hyphae. **Mycological Research** **102**: 582-586.
- Addy, H.D.; Schaffer, G.F.; Miller, M.H. & Peterson, R.L. 1994. Survival of the external mycelium of a VAM fungus in frozen soil over winter. **Mycorrhiza** **5**: 1-5.
- Afek, V.; Lippet, L.A.; Adams, D.; Menge, J.A & Pond, E. 1994. Vesicular-arbuscular mycorrhizae colonization of redwood and incense cedar seedlings following storage. **Hortscience** **29**: 1362-1365.
- Aguiar, J.L.P.; Junqueira, N.T.V. & Azevedo, J.A. 2005. Custos e retornos da produção comercial do maracujá-doce. Pp. 173-189. In: I. Manica (ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre.
- Albiach, R.; Canet, R.; Pomares, F. & Ingelmo, F. 2000. Microbial biomass content and enzymatic to a horticultural soil. **Bioresource Technology** **75**: 43-48.

- Alef, K. 1995a. Estimation on the hydrolysis of fluorescein diacetate. Pp. 232-238. In: K. Alef & P. Nannipieri (eds). **Methods in Applied Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, London.
- Alef, K. 1995b. Soil respiration. Pp. 214-219. In: K. Alef & P. Nannipieri (eds). **Methods in Applied Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, London.
- Alexander, M. 1977. Some aspects of microbial physiology. Pp. 115-127. In: M. Alexander (ed.). **Introduction to Soil Microbiology**. John Wiley & Sons, New York.
- Alguacil, M.M.; Hernández, J.A.; Caravaca, F.; Portillo, B. & Roldán, A. 2003. Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. **Physiologia Plantarum 118**: 562-570.
- Allen, E.B.; Allen, M.F.; Hilm, D.J.; Trappe, J.M.; Molina, R. & Rincon, E. 1995. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. **Plant and Soil 170**: 47-62.
- Alloush, G.A.; Zeto, S.K. & Clark, R.B. 2000. Phosphorus source, organic matter, and arbuscular effects on growth and mineral acquisition of chickpea grown in acidic soil. **Journal of Plant Nutrition 23**: 1351-1369.
- Alves, W.L. & Passoni, A.A. 1997. Composto e vermicomposto de lixo urbano na produção de mudas de oiti [*Liconia tomentosa* (Benth)] para arborização. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 32**: 1053-1058.
- Ananthakrishnan, G.; Ravikumar, R.; Girija, S. & Ganapathi, A. 2004. Selection of efficient arbuscular mycorrhizal fungi in rhizosphere of cashew and their application in the cashew nursery. **Scientia Horticulturae 100**: 369-375.
- Angel, J.S. & Heckman, J.R. 1986. Effect of soil pH and sewage sludge on VA mycorrhizal infection of soybeans. **Plant and Soil 93**: 437-441.
- Anjos, E.C.T. 2004 **Dependência micorrízica do maracujazeiro doce (*Passiflora alata*) e comportamento de mudas micorrizadas ao parasitismo do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* raça 1**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Anjos, E.C.T.; Cavalcante, U.M.T.; Santos, V.F. & Maia, L.C. 2005. Produção de mudas de maracujazeiro-doce micorrizado em solo desinfestado e adubado com fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 40**: 345-351.
- Antolín, M.C.; Pascual, I.; García, C.; Polo, A. & Sánchez-Díaz, M. 2005. Growth, yield and solute content of barley in soils treated with sewage sludge under semiarid Mediterranean. **Field Crops Research 94**: 124-237.

- Aon, M.A.; Cabello, M.N.; Sarena, D.E.; Colaner, A.C.; Franco, M.G.; Burgos, J.L. & Cortassa, S. 2001. I- Spatio-temporal patterns of soil microbial and enzymatic activities in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology 18**: 239-254.
- Aon, M.A. & Colaneri, A.C. 2001. II-Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology 18**: 255-270.
- Arancon, N.Q.; Edwards, C.A.; Bierman, P. & Meltzger, J.D. 2003a. Effects of vermicomposts on growth and marketable fruits on field-grown tomatoes, peppers and strawberries. **Pedobiologia 47**: 731-735.
- Arancon, N.Q.; Edwards, C.A.; Bierman, P.; Meltzger, J.D. & Lucht, C. 2005. Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of pepers in the field. **Pedobiologia 49**: 297-306.
- Arancon, N.Q.; Lee, S.; Edwards, C.A. & Atiyeh, R. 2003b. Effects of humic acids derived from cattle, food and paper-waste vermicompost on growth of greenhouse plants. **Pedobiologia 47**: 741-744.
- Arancon, N.Q.; Edwards, C.A.; Bierman, P.; Welch, C. & Meltzger, J.D. 2004. Influences of vermicompost on field strawberries. 1.Effects on growth and yields. **Bioresource Technology 93**: 145-153.
- Araújo, A.S.F.; Monteiro, R.T.R. & Abarkeli, R.B. 2003. Effect of glyphosate on the microbial activity of two brazilian soils. **Chemosphere 52**: 799-804.
- Araújo, A.P.; Silva, E.M.R. & Almeida, D.L. 1994. Efetividade de fungos endomicorrízicos em tomateiro em diferentes níveis de fósforo no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo 18**: 193-199.
- Arden-Clarke, C. & Hodges, R.D. 1988. The environmental effects of conventional and organic/biological farming systems. II. Soil ecology, soil fertility and nutrient cycles. **Biological Agriculture and Horticulture 5**: 223-287.
- Atiyeh, R.M.; Arancon, N.Q.; Edwards, C.A. & Metzger, J.D. 2000. Influence of earthworm-processed pig manure on the growth and yield of greenhouse tomatoes. **Bioresource Technology 75**: 175-180.
- Atiyeh, R.M.; Arancon, N.Q.; Edwards, C.A. & Metzger, J.D. 2002a. The influence of eartworm-processed pig manure on the growth and productivity of marigolds. **Bioresource Technology 81**: 103-108.

- Atiyeh, R.M.; Lee, C.A.; Edwards, C.A.; Arancon, N.Q.; & Metzger, J.D. 2002b. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Bioresource Technology** **84**: 7-14.
- Avio, L. & Giovannetti, M. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of leucerne roots in a cellulose-amended soil. **Plant and Soil** **112**: 99-104.
- Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae** **68**: 1-24.
- Azcón-Aguilar, C.; Diaz-Rodriguez, R.M. & Barea, J.M. 1986. Effect of soil microorganisms on spore germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Transactions of the British Mycological Society** **86**: 337-340.
- Bâ, A.M.; Plenchette, C.; Danthu, P.; Duponnois, R. & Guissou, T. 2000. Functional compatibility of two arbuscular mycorrhizae with thirteen fruit in Senegal. **Agroforestry Systems** **50**: 95-105.
- Baby, U.I. & Manibhushanrao, K. 1996. Influence of organic amendment on arbuscular mycorrhizal fungi in relation to rice sheath blight disease. **Mycorrhiza** **6**: 201-206.
- Bago, B. 2000. Putative sites for nutriende uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** **226**: 263-274.
- Bago, B.; Pfeffer, P.E.; Douds, D.D.; Brouillette, J.; Bécard, G. & Shachar-Hill, Y. 1999. Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Plant Physiology** **121**: 263-271.
- Bagyaraj, D.J. 1994. Vesicular-arbuscular mycorrhiza: application in agriculture. Pp. 819-833. In: J.R. Norris; D. Read & A.K. Varma (eds.). **Techniques for Mycorrhizal Research**. Academic Press, London.
- Bagyaraj, D.J. & Manjunath, A. 1980. Selection of a suitable host for mass production of VA mycorrhizal inoculum. **Plant and Soil** **55**: 495-498.
- Bagyaraj, D.J. & Reddy, B.J.D. 2005. Application of arbuscular mycorrhizal fungi in horticulture. Pp. 237-254. In: V.S. Mehrotra (ed.). **Mycorrhiza: Role and Applications**. Allied Publishers Pvt. Limited, New Dehli.
- Baláz, M. & Vosátka, M. 1997. Vesicular-arbuscular mycorrhizal of *Calamagrostis villosa* supplied with organic and inorganic phosphorus. **Biologia Plantarum** **39**: 281-288.
- Balota, E.L.; Kanashiro, M.; Colozzi-Filho, A.; Andrade, D.S. & Dick, R.P. 2004. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agroecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology** **35**: 300-306.

- Baltruschat, H. & Dehne, H.W. 1988. The occurrence of vesicular-arbuscular mycorrhiza in agro-ecosystems. I- Influence of nitrogen fertilization and green manure in continuous monoculture crop rotation on the inoculum potential of winter wheat. **Plant and Soil** **107**: 279-284.
- Bandick, A.K. & Dick, R.P. 1999. Field management effects on soil enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry** **31**: 1471-1479.
- Barea, J.M. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. **Advances in Soil Science** **15**: 1-40.
- Barea, J.M.; Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C. 2002. Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. **Antoni van Leeuwenhoek** **81** 343-351.
- Barker, S.J.; Tagu, D. & Delp, G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology** **116**: 1201-1207.
- Bartolome-Esteban, H. & Schenck, N.C. 1994. Spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil aluminium saturation. **Mycologia** **86**: 217-226.
- Battin, T.J. 1997. Assessment of fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total esterase activity natural stream sediments biofilm. **The Science of the Total Environment** **198**: 51-60.
- Bayer, C. & Mielniczuk, J. 1999. Dinâmica e função da matéria orgânica. Pp. 9-26. In: G.A. Santos & F.A.O. Camargo (eds.). **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Genesis, Porto Alegre,
- Bécard, G.; Douds, D.D. & Pfeffer, P.E. 1992. Extensive in vitro hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. **Applied and Environmental Microbiology** **58**: 821-825.
- Bécard, G.; Kosuta, S.; Tamasloukht, M.; Séjalon-Delmas, N. & Roux, C. 2004. Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. **Canadian Journal of Botany** **82**: 1186-1197.
- Bécard, G. & Piché, Y. 1989a. New aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist** **112**: 77-83.
- Bécard, G. & Piché, Y. 1989b. Physiological factors determining vesicular-arbuscular mycorrhizal formation in host and nonhost Ri T-DNA transformed roots. **Canadian Journal of Botany** **68**: 1260-1264.

- Becárd, G.; Piché, Y. & Fortin, J.A. 1989. Some aspects on the biotrophy of VAM fungi. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **29**: 29-33.
- Beilby, J.P. & Kidby, D.K. 1980. Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonius*: changes in neutral and polar lipids. **Journal of Lipid Research** **21**: 739-750.
- Bendavid-Val, R.; Rabinowitch, H.D.; Katan, J. & Kapulnik, Y. 1997. Viability of VA-mycorrhizal fungi following soil solarization and fumigation. **Plant and Soil** **195**: 185-193.
- Bending, G.D.; Turner, M.K. & Jones, J.E. 2002 Interactions between crop residue and soil organic matter quality and the functional diversity of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry** **34**: 1073-1082.
- Bending, G.B.; Turner, M.K.; Rayns, F.; Marx, M.C. & Wood, M. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology and Biochemistry** **36**: 1785-1792.
- Bengtsson, J.; Ahnström, J. & Weibull, A-C. 2005. The effects of organic agriculture on biodiversity and abundance: a meta-analysis. **Journal of Applied Ecology** **42**: 261-269.
- Benítez, E.; Melgar, R.; Sainz, H.; Gómez, M. & Nogales, R. 2000. Enzyme activities in the rhizosphere of pepper (*Capsicum annum* L.) grown with olive cake mulches. **Soil Biology and Biochemistry** **32**: 1829-1835.
- Bernacci, L.C.; Meletti, L.M.M. & Soares-Scotti, M.D. 2003. Maracujá-doce: o autor, a obra e a data da publicação de *Passiflora alata* (Passifloraceae). **Revista Brasileira de Fruticultura** **25**: 355-356.
- Bethlenfalvay, G.J.; Cantre, I.C.; Mihara, K.L. & Schreiner, R.P. 1999. Relationships between soil aggregation and influence by soil biota and nitrogen nutrition. **Biology and Fertility of Soils** **28**: 356-363.
- Bethlenfalvay, G.J.; Franson, R.L.; Brown, M.S. & Mihara, K.L. 1989. The *Glycine-Glomus-Bradyrhizobium* symbiosis. IX. Nutritional, morphological and physiological responses of nodulated soybean to geographic isolates of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Physiologia Plantarum** **76**: 226-232.
- Bethlenfalvay, G.J.; Pacovsky, R.S.; Brown, M.S. & Fuller, G. 1982. Mycotrophic growth and mutualistic development of host plant and fungal endophyte in an endomycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil** **68**: 43-54.

- Bettiol, W. & Ghini, R. 2003. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. Pp. 79-94. In: C. Campanhola & W. Bettiol. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Bettiol, W.; Ghini, R.; Galvão, J.A.H.; Ligo, M.A.V. & Mineiro, J.L.C. 2002. Soil organisms in organic and conventional cropping systems. **Scientia Agricola** **59**: 565-572.
- Bhadalung, N.N.; Suwamarit, A.; Dell, B.; Nopamornbodi, O.; Thamchaipenet, A. & Rungchuang, J. 2005. Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. **Plant and Soil** **270**: 371-382.
- Bhattacharyya, P.; Pal, R.; Chakraborty, A. & Chakrabarti, K. 2001. Microbial biomass and activity in a laterite soil amended with municipal solid waste compost. **Journal of Agronomy and Crop Science** **187**: 207-211.
- Bierman, B. & Linderman, R.G. 1983. Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. **New Phytologist** **95**: 97-105.
- Bird, S.B.; Herrick, J.E.; Wander, M.M. & Wright, S.F. 2002. Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. **Environmental Pollution** **116**: 445-455.
- Boddington, C.L. & Dodd, J.C. 2000. The effect of agricultural practices on the development of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi. II- Studies in experimental microcosms. **Plant and Soil** **218**: 145-157.
- Böhme, L.; Langer, V. & Böhme, F. 2005. Microbial enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **109**: 141-152.
- Bohrer, G.; Kagan-Zur, V.; Roth-Bejerano, N.; Ward, D.; Beck, G. & Bonifacio, E. 2003. Effects of different Kalahari-desert VA mycorrhizal communities on mineral acquisition and depletion from the soil by host plants. **Journal of Arid Environments** **55**: 193-208.
- Borges, A.L. 1999. Calagem e adubação em maracujá amarelo. **Maracujá em foco** **10**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura – CNPMF, Cruz das Almas.
- Borges, A.L.; Lima, A.A. & Caldas, R.C. 1995. Adubação orgânica e química na formação de mudas de maracujazeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura** **17**: 17-22.
- Borie, F.; Redel, Y.; Rubio, R.; Rouanet, J.L. & Barea, J.M. 2002. Interactions between crop residues application and mycorrhizal developments and some root interface properties and mineral acquisition by plants in an acidic soil. **Biology and Fertility of Soils** **36**: 151-160.

- Borkowska, B. 2002. Growth and photosynthetic activity of micropropagated strawberry plants inoculated with endomycorrhizal fungi (AMF) and growing under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum** **24 (4)**: 365- 370.
- Boyle, M. & Paul, E.A. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal association with barley on sewage-amended plots. **Soil Biology and Biochemistry** **20**: 945-948.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** **72**: 248-254.
- Brady, N.C. 1990. Soil organic matter and organic soils. Pp. 279-313. In: N. C. Brady (ed.). **The Nature and Properties of Soils**. Macmillan Publishing Company, New York.
- Braga, M.F. & Junqueira, N.T.V. 2000. Uso potencial de outras espécies do gênero *Passiflora*. **Informe Agropecuário** **21**: 72-75.
- Brancher, A. 2005. Instalação da cultura. Pp. 65-76. In: I. manica (ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre.
- Bratek, Z.; Vörös, I.; Takács, T.; Parádi, I.; Rundnóy, S. & Halász, K. 2002. Advantages of application of mycorrhizated plants in environment-friendly agriculture and forestations. **Acta Biologica Szegediensis** **46**: 187-188.
- Brechelt, A. 1989. Effect of different organic manures on the VA mycorrhiza. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **29**: 55-58.
- Brechelt, A. 1987. Effect of different organic manures on the efficiency of VA-mycorrhiza. **Journal of Agronomy and Crop Science** **158**: 280-286.
- Bressan, W. 2002. Factors affecting *in vitro* plant development and root colonization of sweet potato by *Glomus etunicatum* Becker & Hall. **Brazilian Journal of Microbiology** **33**: 31-34.
- Bressan, W. 2001. The interactive effect of phosphorus and nitrogen on *in vitro* spore germination of *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann, root growth and mycorrhizal colonization. **Brazilian Journal of Microbiology** **32**: 276-280.
- Brohon, B.; Delolme, C. & Gourdon, R. 2001. Complementarity of biomass and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soil quality. **Soil Biology and Biochemistry** **33**: 883-891.
- Brundrett, M. & Juniper, S. 1995. Non-destructive assessment of spore germination of VAM fungi and production of pot cultures from single spores. **Soil Biology and Biochemistry** **27**: 85-91.

- Brunnius, G. 1980. Technical aspects of the use of 3', 6'- diacetyl fluorescein for vital fluorescent stain of bacteria. **Current Microbiology** **4**: 321-323.
- Bulluck, L.R.; Brosius, M.; Evanylo, G.K. & Ristaino, J.B. 2002. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. **Applied Soil Ecology** **19**: 147-160.
- Burns, R.G. 1982. Enzyme activity in soil: location and possible role in microbial ecology. **Soil Biology and Biochemistry** **14**: 423-427.
- Burns, R.G. 1978. Interactions between agrochemichals and soil enzymes. Pp. 295-340. In: R. G. Burns (Ed.). **Soil Enzymes**. Academic Press, London.
- Burns, R.G. 1986. Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. Pp. 429-451. In: P.M. Huang & M. Schnitzer (eds.). **Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes**. Soil Science Society of America, Inc., Wisconsin.
- Calvente, R.; Cano, C.; Ferrol, N.; Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M. 2004. Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculant for commercial cultivar of olive plantlets. **Applied Soil Ecology** **26**: 11-19.
- Calvet, C.; Estaun, V. & Camprubi, A. 1992. Germination, early mycelial growth and infectivity of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in organic substrates. **Symbiosis** **14**: 405-411.
- Calvo, M.S. 1999. Enmiendas y fertilización. Pp. 41-45. In: Calvo, M.S.; Auge, A.J.C.; Ojesto, A.G. & Aguado, I.A. (Eds). **Contaminación del suelo: Estudios, tratamientos y gestión**. Ediciones Mudi-Prensa, Madrid.
- Cançado Júnior, F.L.; Estanislau, M.L.L. & Paiva, B.M. 2000. Aspectos econômicos da cultura do maracujá. **Informe Agropecuário** **21**: 10-17.
- Canet, R.; Albiach, R. & Pomares, F. 2000. Indexes of biological activity as tools for diagnosing soil fertility in organic farming. Pp. 25-39. In: C. García-Izquierdo & M.T. Hernández (eds.). **Research and Perspective of Soil Enzimology in Spain**. Topografía San Francisco, Madrid.
- Caravaca, F. Alguacil, M.M.; Azcón, R.; Díaz, G. & Roldán, A. 2004. Comparing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and *Aspergillus niger* to enhance field performance of the leguminous shrub *Dorycnium pentaphyllum* L. **Applied Soil Ecology** **25**: 169-180.

- Caravaca, F.; Alguacil, M.M.; Barea, J.M. & Roldán, A. 2005a. Survival of inocula and native AMF fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry** **37**: 227-233.
- Caravaca, F.; Barea, J.M.; Figueroa, D. & Roldán, A. 2002a. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. *Sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. **Applied Soil Ecology** **20**: 107-118.
- Caravaca, F.; Barea, J.M.; Palenzuela, J.; Figueroa, D.; Alguacil, M.M. & Roldán, A. 2003a. Establishment of shrub species in a degraded semiarid site after inoculation with native or allochthonous arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology** **22**: 103-111.
- Caravaca, F.; Barea, J.M. & Roldán, A. 2002b. Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and organic amendment on *Pistacia lentiscus* L. seedlings afforested in a degraded semiarid soil. **Soil Biology and Biochemistry** **34**: 1139-1145.
- Caravaca, F.; Figueroa, D.; Azcón-Aguilar, C.; Barea, J.M. & Roldán, A. 2003b. Medium-term effects of mycorrhizal inoculation and composted municipal waste addition on the establishment of two Mediterranean shrubs species under semiarid field conditions. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **97**: 95-105.
- Caravaca, F.; Hernández, T.; García, C. & Roldán, A. 2002c. Improvement of rhizosphere aggregate stability of afforested semiarid plant species subjected to mycorrhizal inoculation and compost addition. **Geoderma** **108**: 133-144.
- Caravaca, F.; Masciandaro, G. & Ceccanti, B. 2002d. Land use in relation to soil chemical and biochemical properties in a semiarid Mediterranean environment. **Soil and Tillage Research** **68**: 13-30.
- Caravaca, F.; Pera, A.; Masciandro, G.; Ceccanti, B. & Roldán, A. 2005b. A microcosm approach to assessing the effects of earthworm inoculation and oat over cropping on CO₂ fluxes and biological properties in an amended semiarid soil. **Chemosphere** **59**: 1625-1631.
- Cardoso, E.J.B.N. & Sanhueza, R.M.V.S. 1985. Problemas fitossanitários na produção de inoculante de fungo micorrízico vesículo-arbuscular. **Fitopatologia Brasileira** **10**: 671-675.
- Carpenter-Boggs, L.; Kennedy, A.C. & Reganold, J.R. 2000. Organic and biodynamic management: effects on soil biology. **Soil Science Society American Journal** **64**: 1651-1659.

- Carpenter-Boggs, L.; Loynachan, T.E. & Stahl, P.P. 1995. Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. **Soil Biology and Biochemistry** **27**: 1445-1451.
- Carr, G.R. 1991. Use of zwitterionic hydrogen ion buffers in media for growth test of *Glomus caledonium*. **Soil Biology and Biochemistry** **23**: 205-206.
- Carrenho, R.; Silva, E.S.; Trufem, S.F.B. & Bononi, V.L.R. 2001. Sucessive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. **Brazilian Journal of Microbiology** **32**: 262-270.
- Cavalcante, U.M.T.; Maia, L.C.; Costa, C.M.C.; Cavalcante, A.T. & Santos, V.F. 2002a. Efeito de fungos micorrízicos, da adubação fosfatada e da esterilização do solo no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **26**: 1099-1106.
- Cavalcante, U.M.T.; Maia, L.C.; Costa, C.M.C. & Santos, V.F. 2001. Mycorrhizal dependency of passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Fruit** **56**: 317-324.
- Cavalcante, U.M.T.; Maia, L.C.; Melo, A.M.M. & Santos, V.F. 2002b. Influência da densidade de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-doce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **37**: 643-649.
- Cavender, N.D.; Atiyeh, R.H. & Knee, M. 2003. Vermicompost stimulates mycorrhizal colonization of roots of *Sorghum bicolor* at the expense of plant growth. **Pedobiologia** **47**: 85-89.
- Celik, J.; Ortas, J. & Kilis, S. 2004. Effects of compost, mycorrhiza, manure and fertilizer on some physical properties of a Chromoxerert soil. **Soil & Tillage Research** **78**:59-67.
- Cepeda, C.T.; Peña, M.C.L. & Sotres, F.G. 2003. Consideraciones generales sobre la determinación de las actividades enzimáticas del suelo. Pp. 26-50. In: C.G. Izquierdo; F.C. Sotres; T.H. Fernández & C.T. Cepeda (eds.). **Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana**. Ediciones Mudi-Prensa, Madrid.
- Cerri, C.C.; Andreux, F. & Eduardo, B.P. 1992. O ciclo do carbono no solo. Pp. 73-90. In: E.J.B.N. Cardoso; S.M. Tsai & M.C.P. Neves (coords.). **Microbiologia do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas.
- Cervelli, S.; Nannipieri, P. & Sequi, P. 1978. Interactions between agrochemicals and soil enzymes. Pp. 251-293. In: R. G. Burns (ed.). **Soil Enzymes**. Academic Press, London.
- Chabot, S.; Bécard, G. & Piché, Y. 1992. Life cycle of *Glomus intraradix* in root organ culture. **Mycologia** **84**: 315-321.

- Chabot, S.; Belrhid, R.; Chenevert, R. & Piché, Y. 1992. Hyphal growth promotion *in vitro* of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker & Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂ enriched conditions. **New Phytologist** **122**: 461-467.
- Chakrabarti, K.; Sarkar, B.; Chakraborty, A.; Banik, P. & Bagchi, D.K. 2000. Organic recycling for soil quality conservation in a Sub-tropical plateau region. **Journal of Agronomy and Crop Science** **184**: 137-142.
- Chaoui, H.I.; Zibilske, L.M. & Ohno, T. 2003. Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. **Soil Biology and Biochemistry** **35**: 295-302.
- Chen, B.; Christie, P. & Li, X. 2001. A modified glass bead compartment cultivation system for studies on nutrient and trace metal uptake by arbuscular mycorrhiza. **Chemosphere** **42**: 185-192.
- Christie, P. & Kilpatrick, D.J. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhiza infection in cut grassland following long-term slurry application. **Soil Biology and Biochemistry** **24**: 325-330.
- Chu, E.Y. 1999. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi inoculation on *Euterpe oleracea* Mart. (açai) seedlings. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **34**: 1019-1024.
- Chu, E.Y.; Möller, M.R.F. & Carvalho, J.G. 2001. Efeitos da inoculação micorrízica em mudas de graviola em solo fumigado ou não fumigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **36**: 671-680.
- Clark, R.B.; Zeto, S.K.; Zobel, R.W. 1999a. Arbuscular mycorrhizal fungal isolate effectiveness on growth and root colonization of *Panicum virgatum* in acid soil. **Soil Biology and Biochemistry** **31**: 1757-1763.
- Clark, R.B.; Zobel, R.W. & Zeto, S.K. 1999b. Effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by *Panicum virgatum* in acid soil. **Mycorrhiza** **9**: 167-176.
- Clarke, J.M.; Gillings, M.R.; Altavilla, N. & Beattie, A.J. 2001. Potential problems with fluorescein diacetate assays of cell viability when testing material products for antimicrobial activity. **Journal of Microbiological Methods** **46**: 261-267.
- Costa, C.M.C.; Cavalcante, U.M.T.; Lima, M.R. & Maia, L.C. 2003. Inoculum density of arbuscular mycorrhizal fungi needed to promote growth of *Hancornia speciosa* Gomes seedlings. **Fruits** **58**: 247-254.

- Costa, C.M.C.; Maia, L.C.; Cavalcante, U.M.T. & Nogueira, R.J.M.C. 2001. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Malpighia emarginata* D.C.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **36**: 893-901.
- Costa, E.L.; Sousa, V.F.; Nogueira, L.C. & Saturnino, H.M. 2000. Irrigação da cultura do maracujazeiro. **Informe Agropecuário** **21**: 59-66.
- Crecchio, C.; Curci, M.; Mininni, R.; Ricciuti, P. & Ruggiero, P. 2001. Short-term effects of municipal solid waste compost amendments on soil carbon and nitrogen content some enzyme activities and genetic diversity. **Biology and Fertility of Soils** **34**: 311-318.
- Cunha, M.A.P.; Barbosa, L.V. & Junqueira, N.T.V. 2002. Espécies de maracujazeiro. Pp.15-24. In: A.A. Lima (ed.). **Maracujá produção: Aspectos Técnicos**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Daft, M.T.; Spencer, D. & Thomas, G.E. 1987. Infectivity of vesicular-arbuscular mycorrhizal inocula after storage under various environmental conditions. **Transactions of the British Mycological Society** **88**: 21-27.
- Damatto Júnior, E.R.; Leonel, S. & Pedroso, C.J. 2005. Adubação orgânica na produção e qualidade de frutos de maracujá-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura** **27**: 188-190.
- Daniels, B.A. & Graham, S.O. 1976. Effects of nutrition and soil extracts on germination of *Glomus mosseae* spores. **Mycologia** **68**: 108-116.
- Daniels, B.A. & Trappe, J.M. 1980. Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. **Mycologia** **72**: 457-471.
- Dann, P.R.; Derrick, J.W.; Dumaresk, D.C. & Ryan, M.H. 1996. The response of organic and conventionally wheat to superphosphate and reactive phosphate rock. **Australian Journal of Experimental Agriculture** **36**: 71-78.
- Davies Jr., F.T.; Olalde-Portugal, V.; Aguilera-Gomez, L.; Alvarado, M.J.; Ferrera-Cerrato, R.C. & Boutton, T.W. 2002. Alleviation of drought stress of chile ancho pepper (*Capsicum annuum* L. cv. San Luis) with arbuscular mycorrhiza indigenous to Mexico. **Scientia Horticulturae** **92**: 347-359.
- Davis, E.A.; Young, J.L. & Rose, S.L. 1984. Detection of high-phosphorus tolerant VAM-fungi colonizing hops and peppermint. **Plant and Soil** **81**: 29-36.
- Debosz, K.; Pettersen, S.O.; Kure, L.K. & Ambus, P. 2002. Evaluating effects of sewage sludge and household compost on soil physical, chemical and microbiological properties. **Applied Soil Ecology** **19**: 237-248.

- Declerck, S.; D'Or, D.; Bivort, C. & Souza, F.A. 2004. Development of extraradical mycelium of *Scutellospora reticulata* under root-organ culture: spore production and function of auxilial cells. **Mycological Research** **108**: 84-92.
- Declerck, S.; Strullu, D.G.; Plenchette, C. & Guillemette, T. 1996a. Entrapment of *in vitro* produced spores of *Glomus versiforme* in alginate beads: *in vitro* and *in vivo* potentials. **Journal of Biotechnology** **48**: 51-57.
- Declerck, S.; Strullu, D.G. & Plenchette, C. 1996b. *In vitro* mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots. **Mycological Research** **100**: 1237-1242.
- Declerck, S.; Strullu, D.G. & Plenchette, C. 1998. Monoxenic culture of the intraradical forms of *Glomus* sp. isolated from a tropical ecosystem: a proposed methodology for germoplasm collection. **Mycologia** **90**: 579-585.
- Díaz, E.; Roldán, A.; Lax, A. & Albadalejo, J. 1994. Formation of stable aggregates in degraded soil by amendment with urban refuse and peat. **Geoderma** **63**: 277-288.
- Díaz-Raviña, M.; Bueno, J.; González-Prieto, S.J. & Caballas, T. 2005. Cultivation effects on biochemical properties, C storage and ¹⁵N natural abundance in the 0-5 cm layer of an acidic soil from temperate humid zone. **Soil and Tillage Research** **84**: 216-221.
- Diop, T.A.; Plenchette, C. & Strullu, D.G. 1994a. Dual axenic culture of sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with tomato roots. **Mycorrhiza** **5**: 17-22.
- Diop, T.A.; Plenchette, C. & Strullu, D.G. 1994b. *In vitro* culture of sheared mycorrhizal roots. **Symbiosis** **17**: 217-227.
- Ditzler, C.A. & Tugel, A.J. 2002. Soil quality field tools: experiences of USDA-NRCS Soil Quality Institute. **Agronomy Journal** **94**: 33-38.
- Dodd, J.C.; Boddington, C.L.; Rodriguez, A.; Gonzalez-Chavez, C. & Irdika, M. 2000. Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi from different genera: form, function and detection. **Plant and Soil** **226**: 131-151.
- Dodd, J.C. & Thompson, B.D. 1994. The screening and selection of inoculant arbuscular-mycorrhizal and ectomycorrhizal fungi. **Plant and Soil** **159**: 149-158.
- Donadio, L.C.; Môro, F.V. & Servidone, A.A. 2002. **Frutas Brasileiras**. Editora Novos talentos, Jaboticabal, São Paulo. 288p.
- Doran, J.W.; Stamatiadis, S.I. & Haberm, J. 2002. Soil health as an indicator of sustainable management. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **88**: 107-110.

- Douds, D.D. 1997. A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri T-DNA transformed carrot roots. **Mycorrhiza** **7**: 57-61.
- Douds, D.D. 2002. Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. **Mycorrhiza** **12**: 163-167.
- Douds, D.D.; Galvez, L.; Franke-Snyder, M.; Reiders, C. & Drinkwater, L. E. 1997. Effect of compost addition and crop rotation point upon VAM fungi. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **65**: 257-266.
- Douds, D.D.; Galvéz, L.; Janke, R.R. & Wagoner, P.M. 1995. Effect of tillage and farming system upon population and distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **52**: 111-118.
- Douds, D.D.; Janke, R.R. & Peters, S.E. 1993. VAM fungus spore populations and colonization of roots of maize and soybean under conventional and low-input sustainable agriculture. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **43**: 325-335.
- Douds, D.D.; Nagahashi, G.; Pfeffer, P.E.; Reider, C. & Kayser, W.M. 2005. On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Bioresource Technology** (*in press*).
- Douds, D.D. & Schenck, N. 1990a. Cryopreservation of spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist** **115**: 667-679.
- Douds, D.D. & Schenck, N. 1990b. Relation of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. **New Phytologist** **116**: 621-627.
- Drew, E.A.; Murray, R.S.; Smith, S.E. & Jakobsen, I. 2003. Beyond the rhizosphere growth and function of arbuscular mycorrhizal external hyphae in sands and varying pore sizes. **Plant and Soil** **251**: 105-114.
- Driver, J.D.; Holben, W.E. & Rillig, M. 2005. Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry** **37**: 101-106.
- Dugassa, D.G.; Grunewaldtstocker, G. & Schonbeck, F. 1995. Growth of *Glomus intraradices* and its effect on linseed (*Linum usitatissimum* L.) in hydroponic culture. **Mycorrhiza** **5**: 279-282.
- Duponnois, R.; Colombet, A.; Hien, V. & Thioulouse, J. 2005. The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holoserica*. **Soil Biology and Biochemistry** **37**: 1460-1468.

- Eason, W.R.; Scullion, J. & Scott, E.P. 1999. Soil parameters and plant response associated with arbuscular mycorrhizas from contrasting grassland management regimes. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **73**: 245-255.
- Eghball, B. 2002. Soil properties as influence by phosphorus and nitrogen based manure and compost applications. **Agronomy Journal** **94**: 128-135.
- El-Atrach, F.; Vierheilig, H. & Ocampo, J.A. 1989. Influence of non-hosts plants on vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of host plants and on spore germination. **Soil Biology and Biochemistry** **21**: 161-163.
- Ellis, J.R.; Roder, W. & Mason, S.C. 1992. Grain sorghum-soybean rotation and fertilization influence on vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science Society American Journal** **56**: 789-794.
- Elmes, R.P. & Mosse, B. 1984. Vesicular-arbuscular endomycorrhizal inoculum production. I. Experiments with maize (*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture. **Canadian Journal of Botany** **62**: 1531-1536.
- Elorrieta, M.A.; Suárez-Estrella, F.; López, M.J.; Vargas-García, M.C. & Moreno, J. 2003. Survival of phytopathogenic bacteria during waste composting. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **96**: 141-146.
- Elsgaard, L.; Pojama, G.; Miraval, T.; Eriksen, J. & Marcomini, A. 2003. Biodegradation of linear alkylbenzene sulfonates in sulfate-leached soil mesocosms. **Chemosphere** **50**: 929-937.
- Enkhtuya, B.; Rydlová, J. & Vosátka, M. 2000. Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. **Applied Soil Ecology** **14**: 201-211.
- Estaun, M.V. 1989. Effect of sodium chloride and material on germination and hyphal growth of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **29**: 123-129.
- Estaún, V.; Calvet, C.; Camprubí, A. & Pinochet, J. 1999. Long-term effects of nursery starter substrate and AM inoculation of micropropagated peach x almond hybrid rootstock GF 677. **Agronomie** **19**: 483-489.
- Fadini, M.A.M. & Santa-Cecília, L.V.C. 2000. Manejo integrado de pragas do maracujazeiro. **Informe Agropecuário** **21**: 29-33.
- Feigl, B.J.; Cerri, G.C. & Bernoux, M. 1998. Balanço de carbono e biomassa microbiana em solos da Amazônia. Pp. 423-441. In: I.S. Melo & J.L. Azevedo. **Ecologia Microbiana**. Embrapa CNPMA. Jaguariúna.

- Feldmann, F & Idczak, E. 1994. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. Pp.799-817. In: J.R. Norris; D. Read & A.K. Varma (eds.). **Techniques for Mycorrhizal Research. Methods in Microbiology**. Academic Press, Great Britain.
- Feng, G.; Song, Y.C.; Li, X.L. & Christie, P. 2003. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. **Applied Soil Ecology 22**: 139-148.
- Fernandes, S.A.P.; Bettiol, W. & Cerri, C.C. 2005. Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. **Applied Soil Ecology 30**: 65-77.
- Ferreira, G. 2000. Propagação do maracujazeiro. **Informe Agropecuário 21**: 18-24.
- Fidelibus, M.W.; Waring, C.A. & Stutz, J.C. 2001. Geographic isolates of *Glomus* increase root growth and whole plant transpiration of *Citrus* seedlings grown high phosphorus. **Mycorrhiza 10**: 231-236.
- Fillion, M.; St-Arnaud, M.; Guillon, C.; Hamel, C. & Jabaji-Hare, S.H. 2001. Suitability of *Glomus intraradices* *in vitro* produced spores and root segment inoculum for the establishment of a mycorrhizosphere in an experimental microcosm. **Canadian Journal of Botany 79**: 879-885.
- Fillip, Z. 2002. International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters. **Agriculture, Ecosystems and Environment 88**: 169-174.
- Focchi, S.S.; Soglio, F.K.D.; Carrenho, R.; Souza, P.V.D. & Lovato, P.E. 2004. Fungos micorrízicos arbusculares em cultivos de citros sob manejo convencional e orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 39**: 469-476.
- Fontvieille, E.D.A.; Outaguerouine, A. & Thevenot, D.R. 1992. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of microbial activity in aquatic systems: application to activated sludges. **Environmental Technology 13**: 531-540.
- Foster, R.C. 1981. Polysaccharides in soil fabrics. **Science 214**: 665-667.
- Fracchia, S.; Menendez, A.; Godeas, A. & Ocampo, J.A. 2001. A method to obtain monosporic cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry 33**: 1283-1285.
- Frankenberger, W.T. & Dick, W.A. 1983. Relationship between activities and microbial growth and activity in soil. **Soil Science Society American Journal 47**: 945-951.
- Franke-Snyder, M.; Douds Jr., D.D.; Galvez, L.; Phillips, J.G.; Wagoner, P.; Drinkwater, L. & Morton, J.B. 2001. Diversity of communities of arbuscular (AM) fungi present in

- conventional versus low-input agricultural sites in eastern Pennsylvania, USA. **Applied Soil Ecology 16**: 35-48.
- Franzluebbers, A.J.; Wright, S.F. & Stuedemann, J.A. 2000. Soil aggregation and glomalin under pastures in the southern piedmont USA. **Soil Science Society American Journal 64**: 1018-1026.
- Freitas, M.S.M.; Martins, M.A. & Vieira, I.J.C. 2004. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 39**: 887-894.
- Freitas, M.H. & Siqueira, J.O. 1994. Crescimento micelial de esporos pré-germinados do fungo endomicorrízico *Gigaspora gigantea* em meio líquido suplementado com compostos orgânicos nitrogenados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 29**: 751-756.
- Frey, J.R. & Ellis, J.R. 1997. Relationship of soil properties and soil amendments to response of *Glomus intraradices* and soybeans. **Canadian Journal of Botany 75**: 483-491.
- Frighetto, R.T.S. 2000. Determinação de polissacarídeos de origem microbiana e sua importância na estruturação do solo. Pp. 167-190. In: R.S. Frighetto & P.J. Valarini (coords.) **Indicadores Bioquímicos e Biológicos da Qualidade do Solo** (Manual técnico). Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Frutiseries. 2002. Maracujá Amarelo. Nº 4, Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal-MMA, Secretaria de Recursos Hídricos-SRH, Brasília.
- Gadkar, V. & Adholeya, A. 2000. Intraradical sporulation of AM *Gigaspora margarita* in a long-term axenic cultivation in Ri T-DNA carrot root. **Mycological Research 104**: 716-724.
- Galvéz, L.; Douds Jr., D.D.; Drinkwater, L.E. & Wagoner, P. 2001. Effect of tillage and farming system upon VAM fungus populations and mycorrhizas and nutrient uptake of maize. **Plant and Soil 228**: 299-308.
- Gama-Rodrigues, E.F. 1999. Biomassa microbiana e ciclagem de nutrientes. Pp. 227-243. In: G.A. Santos & F.A.O. Camargo (eds.). **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Genesis, Porto Alegre.
- García, C. Hernandez, T.; Albaladejo, J.; Castillo, V. & Roldán, A. 1998. Revegetation in semiarid zones: influence of terracing and organic refuse on microbial activity. **Soil Science Society of American Journal 62**: 670-676.
- García, C.; Hernández, T. & Costa, F. 1991. Changes in carbon fractions during composting and maturation of organic wastes. **Environmental Management 15**: 433-439.

- García, C.; Hernández, T. & Costa, F. 1992. Variation in some chemical parameters and organic matter in soils regenerated by the addition of municipal solid waste. **Environmental Management** **16**: 763-768.
- García, C.; Hernández, T.; Costa, F. & Ceccanti, B. 1994. Biochemical parameters in soils regenerated by addition of organic wastes. **Waste Management and Research** **12**: 457-466.
- García, C.; Hernández, T.; Pascual, J.A.; Moreno, J.L. & Ros, M. 2000a. Microbial activity in soils of SE Spain exposed to degradation and desertification processes. Strategies for their rehabilitation. Pp. 93-142. In: C. García-Izquierdo & M.T. Hernández (Eds). **Research and Perspective of Soil Enzimology in Spain**. Topografia San Francisco, Madrid.
- García, C.; Hernández, T.; Roldán, A.; Albaladejo, J. & Castillo, V. 2000b. Organic amendment and mycorrhizal inoculation as a practice in afforestation of soils with *Pinus halepensis* Miller: effect on theirs microbial activity. **Soil Biology and Biochemistry** **32**: 1173-1181.
- García, C.; Hernández, T.; Roldán, A. & Martín, A. 2002. Effect of plant cover decline on chemical and microbiological parameters under Mediterranean climate. **Soil Biology and Biochemistry** **34**: 635-642.
- García, C.; Roldán, A. & Hernández, T. 2005. Ability of different plant species to promote microbiological proceses in semiarid soil. **Geoderma** **124**: 193-202.
- García-Gil, J.C.; Plaza, C.; Brinetti, G. & Polo, A. 2004. Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. **Biology and Fertility of Soils** **39**: 320-328.
- García-Gil, J.C.; Plaza, C.; Soler-Rovira, P. & Polo, A. 2000. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry** **32**: 1907-1913.
- Gaur, A. & Adholeya, A. 2002. 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.
- Gaur, A. & Adholeya, A. 2005. Diverse response of five ornamental plant species to mixed indigenous and single isolate arbuscular mycorrhizal inocula in marginal soil amended with organic matter. **Journal of Plant Nutrition** **28**: 707-723.
- Gaur, A. & Adholeya, A. 2000. Response of three vegetable crops to VAM fungal inoculation in nutrient different soils amended with organic matter. **Symbiosis** **29**: 19-31.

- Gaur, A.; Adholeya, A. & Mukerji, K.G. 1998. A comparison of AM fungi inoculants using *Capsicum* and *Polianthes* in marginal soil amended with organic matter. **Mycorrhiza** **7**: 307-312.
- Gaur, A.; Gaur, A. & Adholeya, A. 2000. Growth and flowering in *Petunia hybrida*, *Callistephus chinensis* and *Inpatiens balsamina* inoculated with mixed AM inocula or chemical fertilizers in a soil of low P fertility. **Scientia Horticulturae** **84**: 151-162.
- Gavito, M.E.; Olsson, P.A.; Rouhier, H.; Medina-Peñafiel, A.; Jacobsen, I.; Bago, A. & Azcón-Aguilar, C. 2005. Temperature constrains on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist** **168**: 179-188.
- Gazey, C.; Abbott, L.K. & Robson, A.D. 1992. The rate of development of mycorrhizas affects the onset of sporulation and production of external hyphae by two species of *Acaulospora*. **Mycological Research** **96**: 643-650.
- Gazey, C.; Abbott, L.K. & Robson, A.D. 1993. VA mycorrhizal spores from three species of *Acaulospora*: germination, longevity and hyphal growth. **Mycological Research** **97**: 785-790.
- Gemma, J.N. & Koske, R.E. 1988. Seasonal variation in spore abundance and dormancy of *Gigaspora gigantea* and in mycorrhizal inoculum potential of a dune soil. **Mycologia** **80**: 211-216.
- Ghini, R.; Mendes, M.D.L. & Bettiol, W. 1998. Método de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador da atividade microbiana no solo e supressividade a *Rhizoctonia solani*. **Summa Phytopatologica** **24**: 239-242.
- Ghini, R.; Schoenmaker, I.A.S. & Bettiol, W. 2002. Solarização do solo e incorporação de fontes de matéria orgânica no controle de *Pythium* ssp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **37**: 1253-1261.
- Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V. & Trouvelot, A. 1988. Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. Pp. 41-54. In: J.M. Whipps & R.D. Lumsden (eds.). **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. Cambridge University Press, New York.
- Gianinazzi-Pearson, V.; Branzanti, B. & Gianinazzi, S. 1989. *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by root exsudates and plant flavonoids. **Symbiosis** **7**: 243-255.
- Gianinazzi-Pearson, V.; Gianinazzi, S. & Trouvelot, A. 1984. Evaluation of the infectivity and effectiveness of indigenous vesicular-arbuscular fungal populations in some agricultural soils in Burgundy. **Canadian Journal of Botany** **63**: 1521-1524.

- Gildon, A. & Tinker, P.B. 1981. A heavy metal-tolerant strain of a mycorrhizal fungus. **Transactions of the British Mycological Society** **77**: 648-649.
- Giovannetti, M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. Pp 47-68. In: Y. Kapulnik & D.D. Douds (eds.). **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Giovannetti, M. & Gianinazzi-Pearson, V. 1994. Biodiversity in arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycological Research** **98**: 705-715.
- Giovannetti, M.; Sbrama, C.; Strani, P.; Agnolucci, M.; Rinaudo, V. & Avio, L. 2003. Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. **Applied Environmental Microbiology** **69**: 616-624.
- Gleissman, S.R.; Swezey, S.L.; Allison, J.; Cochran, J.; Farrel, J.; Kluson, R.; Rosado-May, F. & Werner, M. 1990. Strawberry production systems during conversion to organic matter. **California Agriculture** **44**: 5-7.
- Gleissman, S.R.; Werner, M.; Swezey, S.L.; Caswell, E.; Cochran, J. & Rosado-May, F. 1996. Conversion to organic strawberry management changes ecological processes. **California Agriculture** **50**: 24-31.
- González-Chávez, M.C.; Carrillo-González, R.; Wright, S.F. & Nichols, K.A. 2004. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environmental Pollution** **130**: 317-323.
- Gonzalez-Chavez, C.; D'haen, J.; Vangronsveld, J. & Dodd, J.C. 2002. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil** **240**: 287-297.
- Gould, A.B. & Liberta, A.E. 1981. Effects of topsoil storage during surface mining on the vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Mycologia** **73**: 914-922.
- Gouveia, L.C. & Pereira Neto, J.T. 2000. Análises de amostras de compostos orgânicos de origem urbana e agrícola sob diferentes estágios de degradação. Pp. 329-332. In: **IV Seminário Nacional sobre Resíduos Sólidos**, Recife.
- Goyal, S.; Chander, K.; Mundra, M.C. & Kapoor, K.K. 1999. Influence of inorganic fertilizers and organic amendments on soil organic and soil microbial properties under tropical conditions. **Biology and Fertility of Soils** **29**: 196-200.
- Graça, E.; Machado, J.O.; Rugiero, C. & Andrioli, J.L. 1991. Influência de fungos endomicorrízicos e da bactéria *Azospirillum brasiliense* sobre o desenvolvimento de

- mudas do maracujazeiro (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). **Revista Brasileira de Fruticultura 13**: 125-130.
- Graham, J.H. 1982. Effect of citrus root exsudates on germination of chlamydospores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus epigaeum*. **Mycologia 74**: 831-835.
- Graham, J.H. & Abbott, L.K. 2000. Wheat responses to aggressive and non aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil 220**: 207-218.
- Graham, M.H.; Haynes, R.J. & Meyer, J.H. 2002. Soil organic matter content and quality: effects of fertilizer applications burning and trash retention on a long-term sugarcane experiment in South Africa. **Soil Biology and Biochemistry 34**: 93-102.
- Graham, J.H.; Linderman, R.G. & Menge, J.A. 1982. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of troyer citrange. **New Phytologist 91**: 183-189.
- Green, N.E.; Graham, S.O. & Schenck, N.C. 1976. The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. **Mycologia 68**: 929-934.
- Grisi, B.M. 1978. Método químico de medição da respiração edáfica: alguns aspectos técnicos. **Ciência e Cultura 30**: 82-88.
- Gryndler, M.; Hrselová, H.; Sudová, R.; Gryndlerová, H.; Rezacová, V. & Merhautová, V. 2005. Hyphal growth and mycorrhiza formation by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus calaroideum* BEG23 is stimulated by humic substances. **Mycorrhiza 15**: 483-488.
- Gryndler, M.; Jansa, J.; Hrselová, H; Chvátalová, I. & Vosátka, M. 2003. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology 22**: 283-287.
- Gryndler, M; Lestina, J.; Moravec, V.; Prikrl, Z. & Lipavsky, J. 1989. Colonization of maize by VAM-fungi under conditions of long-term fertilization of varying intensity. **Agriculture, Ecosystems and Environment 29**: 183-186.
- Gryndler, M.; Vosátka, M. Hrselová, H; Chvátalová, I. & Jansa, J. 2002. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and cellulose in growth substrate. **Applied Soil Ecology 19**: 279-288.
- Guerrero, G.; Gómez, I.; Mataix Solera, J.; Moral, R.; Mataix Beneyto, J. & Hernández, M.T. 2000. Effect of solid waste of solid waste compost on microbiological and physical properties of a burnt forest soil in field experiemts. **Biology and Fertility of Soils 32**: 410-414.

- Gupta, M.L.; Prasad, A.; Ram, M. & Kumar, S. 2002. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. **Bioresource Technology** **81**: 77-79.
- Haas, J. & Krikum, J. 1985. Efficacy of endomycorrhizal-fungus isolates and inoculum quantities required for growth response.. **New Phytologist** **100**: 613-621.
- Hardie, K. 1984. Germination of *Glomus mosseae* spores isolated from stock pots of different ages. **Transactions of British Mycological Society** **83**: 693-696.
- Harinikumar, K.M. & Bagyaraj, D.J. 1989. Effect of cropping sequence, fertilizers and farmyard manure on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in different crops over three consecutive seasons. **Biology and Fertility of Soils** **7**: 173-175.
- Harner, M.J.; Ramsey, P.W. & Rillig, M.C. 2005. Protein accumulation and distribution in floodplain and river foam. **Ecology Letters** **7**: 829-836.
- Hart, M.M. & Reader, R.J. 2002a. Does percent root length colonization and soil hyphal length reflect the extent of colonization of all AMF? **Mycorrhiza** **12**: 297-301.
- Hart, M.M. & Reader, R.J. 2002b. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist** **153**: 335-344.
- Hayes, M.H.B. & Clapp, C.E. 2001. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. **Soil Science** **166**: 723-737.
- Hayman, D.S. 1982. Influence of soils and fertility and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Phytopathology** **72**: 1119-1124.
- Hawkins, H.J. & George, E. 1997. 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.
- van der Heidjen, M.G.A.; Boller, T.; Wiemken, A. & Sanders, I. 1998. Differential arbuscular mycorrhizal fungal species are potential determinants of plant community structure. **Ecology** **79**: 2082-2091.
- van der Heidjen, E.W. & Kuyper, T.W. 2001. Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence the effectiveness of the mycorrhizal symbiosis? **Plant and Soil** **230**: 161-174.
- Henkel, T.W.; Smith, W.K. & Christensen, M. 1989. Infectivity and effectivity of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi from contiguous soils in southwestern Wyoming, USA. **New Phytologist** **112**: 205-214.

- Hepper, C.M. 1983a. Effect of phosphate on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Transactions of the British Mycological Society** **80**: 487-490.
- Hepper, C.M. 1984b. Inorganic sulphur nutrition of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium*. **Soil Biology and Biochemistry** **16**: 669-671.
- Hepper, C.M. 1983c. Limited independent growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *in vitro*. **New Phytologist** **93**: 537-542.
- Hepper, C.M. 1984d. Regulation of spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora laevis* by soil pH. **Transactions of the British Mycological Society** **83**: 154-156.
- Hepper, C.M. & Warner, A. 1983. Role of organic matter in growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil. **Transactions of the British Mycological Society** **81**: 155-156.
- Hernández, T. & García, C. 2003. Estimación de la respiración microbiana del suelo. Pp. 313-346. In: C.G. Izquierdo; F.G. Sotres; T.H. Fernández & C.T. Cepeda (eds.). **Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medidas de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana**. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Hetrick, B.A.D. & Bloom, J. 1986. The influence of host on production and colonization ability of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. **Mycologia** **78**: 32-36.
- Hildebrandt, V.; Janetta, K. & Bothie, H. 2002. Towards growth of arbuscular mycorrhizal independent of a plant host. **Applied and Environmental Microbiology** **68**: 1919-1924.
- Hill, G.T.; Mitkowski, N.A.; Aldrich-wolfe, L.; Emele, L.R.; Jurkonie, D.D.; Ficke, A.; Maldonado-Ramirez, S.; Lynch, S.T. & Nelson, E.B. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology** **15**: 25-36.
- Hiriji, M. & Sanders, I. 2005. Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. **Nature** **433**: 160-163.
- Hirrel, M.C. 1981. The effect of sodium and chloride salts on the germination of the *Gigaspora margarita*. **Mycologia** **73**: 610-617.
- Hodge, A.; Campbell, C.D. & Fitter, A.H. 2001. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. **Nature** **413**: 297-299.
- Höflich, G.; Tauschke, M.; Kühn, G. & Rogasik, J. 2000. Influence of agricultural crops and fertilization in microbial activity and microorganisms in the rhizosphere. **Journal of Agronomy and Crop Science** **184**: 49-54.

- Huang, R.S. & Tang, C.S. 1988. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal sporocarps *Glomus aggregatum* fiberglass screens. **Plant and Soil** **108**: 233-235.
- Icuma, I.M.; Oliveira, M.A.S.; Alves, R.T. & Junqueira, N.T. 2005. Pragas. Pp. 145-152. In: I Manica (ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre, RS.
- IBGE. 2005. <http://www.ibge.gov.br>.
- Ilbas, A.I. & Sahin, S. 2005. *Glomus fasciculatum* inoculation improves soybean production. **Acta Agriculture Scandinavica Section B- Soil and Plant Sciences** **12**: 1-6.
- INVAM, 1994a. Culture methods and inoculum production: a reality check. **Invam Newsletter** **4**.
- INVAM. 2001. <http://www.invam.caf.wvu.edu/methods/assays/MIP.htm>.
- INVAM, 1995. Impact of host species on the culture of arbuscular fungi. **Invam newsletter** **5**.
- INVAM, 1993. Properties of infective propagules at the suborder level (Glomineae versus Gigasporinae). **Invam Newsletter** **3**.
- INVAM, 1994b. Storage of fungal propagules, dead or alive. **Invam Newsletter** **4**.
- Ishac, Y.Z.; El-Haddad, M.E.; Daft, M.J.; Ramadan, E.M. & El-Demerdash, M.E. 1986. Effect of seed inoculation, mycorrhizal infection and organic amendment on wheat growth. **Plant and Soil** **90**: 373-382.
- Ishii, T.; Narutaki, A.; Sawada, K.; Aikawa, J.; Matsumoto, I. & Kadoya, K. 1997. Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in bahia grass (*Paspalum notatum* Flüggé) roots. **Plant and Soil** **196**: 301-304.
- Izquierdo, I.; Caravaca, F.; Algualcil, M.M.; Hernández, G. & Roldán, A. 2005. Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. **Applied Soil Ecology** **30**: 3-10.
- Izquierdo, C.G.; Sotres, F.G.; Fernández, T.H. & Cepeda, C.T. 2003. Introducción. Pp. 9-21. In: C.G. Izquierdo; F.G. Sotres; T.H. Fernández & C.T. Cepeda (eds.). **Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos em Suelos: Medidas de Actividades Enzimáticas e Biomassa Microbiana**. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Jahnel, M.C.; Melloni, R. & Cardoso, E.J.B.N. 1999. Maturidade de composto de lixo urbano. **Scientia Agricola** **46**: 301-304.
- Jaizme-Vega, M.C.; Rodríguez-Romero, A.S.; Marín Hermoso, C. & Declerck, S. 2003. Growth of micropropagated banana by root-organ culture produced arbuscular mycorrhizal fungi entrapped in Ca-alginate beads. **Plant and Soil** **254**: 329-335.

- Jarstfer, A.G.; Farmer-Koppenol, P. & Sylvia, D.M. 1998. Tissue magnesium and calcium affect arbuscular mycorrhiza development and fungal reproduction. **Mycorrhiza** **7**: 237-242.
- Jarstfer, A. G. & Sylvia, D.M. 1992. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Pp. 349-377. In: B. Metting (ed.). **Soil Microbial Technologies: Applications in Agriculture, Forestry and Environmental Management**. Marcel Dekker, New York.
- Jasper, D.A.; Abbott, L.K. & Robson, A.D. 1993. The survival of infective hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in dry soil: an interaction with sporulation. **New Phytologist** **124**: 473-479.
- Jeffries, P.; Gianninazzi, S.; Perotto, S.; Turnau, K. & Barea, J.M. 2003. The contribution of arbuscular mycorrhizal in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. **Biology and Fertility of Soils** **37**: 1-16.
- Johnson, N.C. 1993. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? **Ecological Applications** **3**: 749-757.
- Johnson, D.; Ijdo, M.; Gennet, D.R.; Anderson, I.C. & Alexander, I.J. 2005. How do plants regulate the function, community structure, and diversity of mycorrhizal fungi? **Journal of Experimental Botany** **56**: 1751-1760.
- Joner, E.J. 2000. The effect of long-term organic or inorganic fertilizers on mycorrhiza-mediated phosphorus uptake in subterranean clover. **Biology and Fertility of Soils** **32**: 435-440.
- Joner, E.J.; Briones, R. & Leyval, C. 2000. Metal-binding capacity of arbuscular mycorrhizal mycelium. **Plant and Soil** **226**: 227-234.
- Joner, E.J. & Jakobsen, I. 1994. Contribution by two arbuscular mycorrhizal fungi to P uptake by cucumber (*Cucumis sativus* L.) from ³²P-labelled organic matter during mineralization in soil. **Plant and Soil** **163**: 203-209.
- Joner, E.J. & Jakobsen. 1992. Enhanced growth of external VA mycorrhizal hyphae in soil amended with straw. P. 387. In: D. J. Read; D.H. Lewis; A.H. Fitter & I.J. Alexander. **Mycorrhizas in Ecosystems**. CAB International, Wallingford.
- Joner, E.J. & Jakobsen, I. 1995a. Growth and extra-cellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. **Soil Biology and Biochemistry** **27**: 1153-1159.

- Joner, E.J. & Jakobsen, I. 1995b. Uptake of ^{32}P from labeled organic matter by mycorrhizal and non-mycorrhizal subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). **Plant and Soil** **172**: 221-227.
- Juge, C.; Samson, J.; Bastien, C.; Vierheilig, H.; Coughlan, A. & Piché, Y. 2002. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. **Mycorrhiza** **13**: 37-42.
- Junqueira, N.T.V.; Anjos, J.R.N.; Junqueira, L.P. & Sharma, R.D. 2005a. Principais doenças e pragas Pp. 113-152. In: I. Manica (ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre.
- Junqueira, N.T.V.; Lima, M.M.; Rangel, L.E.P.; Marinelli, J.B.; Resende, H.T. & Amaral, J.P. 2002. Maracujá. **FrutiSéries 2**. Ministério da Integração Nacional – MI, Secretaria de Infra-Estrutura Hídrica – SIH, Departamento de Desenvolvimento Hidroagrícola – DDH, Brasília.
- Junqueira, N.T.V.; Peixoto, J.R.; Brancher, A.; Junqueira, K.P. & Fialho, J.F. 2005b. Melhoramento genético do maracujá-doce. Pp. 39-46. In: I. Manica (ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre.
- Kahiluoto, H.; Ketoja, E.; Vestberg, M. & Saarela, I. 2001. Promotion of AM utilization through reduced P fertilization. 2. Field studies. **Plant and Soil** **231**: 65-79.
- Kapoor, R.R.; Giri, B. & Mukerji, K.G. 2002. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculante to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). **World Journal of Microbiology & Biotechnology** **18**: 459-463.
- Kapoor, R.R.; Giri, B. & Mukerji, K.G. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. **Bioresource Technology** **93**: 307-311.
- Karandashov, V. & Bucher, M. 2005. Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. **Trend in Plant Science** **10**: 22-29.
- Karandashov, V.; Kuzovkina, I.; Hawkin, H.-J. & George, E. 2000. Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. **Mycorrhiza** **10**: 23-28.

- Kaushik, A.; Nisha, R.; Jagjeeta, K.; Kaushik, C.P. 2005. Impact of long-term and short-term irrigation of a sodic soil with distillery effluent in combination with bioamendments. **Bioresource Technology** **96**: 1860-1866.
- Kennedy, A.C. 1998. The rhizosphere and spermophere. In: Pp.389-407. Eds.D.M. Sylvia; J.J. Fuhrmann; P.G. Hartel & D.A. Zuberer. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. Prentice Hall, New Jersey.
- Kiehl, E. J. 1985. **Fertilizantes orgânicos**. Ed. Agronômica Ceres, São Paulo, 492 p.
- Kiehl, E.J. 1998. **Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto**. Editado pelo autor, Piracicaba, 171p.
- Kim, K.Y.; Cho, Y.S.; Sohn, B.K.; Park, R.D.; Shim, J.H.; Jung, S.J.; Kim, Y.W. & Seong, K.Y. 2002. Cold-storage of mixed inoculum of *Glomus intraradices* enhances root colonization, phosphorus status and growth of hot pepper. **Plant and Soil** **238**: 267-272.
- Kirk, J.L.; Moutoglis, P.; Klironomos, J.; Lee, H. & Trevors, J.T. 2005. Toxicity of diesel fuel to germination growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and *in vitro* transformed carrot root cultures. **Plant and Soil** **270**: 23-30.
- Kiss, S.; Pragan-Bularda, M. & Radulescu, D. 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil. **Advances in Agronomy** **27**: 25-87.
- Kizilkaya, R. & Baybakli, B. 2005. Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. **Applied Soil Ecology** **30**: 192-202.
- Knorr, M.A.; Boerner, R.E.J. & Rillig, M.C. 2003. Glomalin content forest soils in relation to fire frequency and landscape position. **Mycorrhiza** **13**: 205-210.
- Koch, A.L.; Kuhn, G.; Fontanillas, P.; Fumagalli, L.; Goudet, J. & Sanders, I.R. 2004. High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. **PNAS** **101**: 2369-2374.
- Koide, R.T. & Kabir, Z. 2000. Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. **New Phytologist** **148**: 511-517.
- Koske, R.E. 1982. Evidence for a volatile attractant from plant roots affecting germ tubes of a mycorrhizal fungus. **Transactions of the British Mycological Society** **79**: 305-310.
- Koske, R.E. 1981a. *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of a VA-mycorrhizal fungus. **Mycologia** **73**: 288-300.
- Koske, R.E. 1981b. Multiple germination by spores of *Gigaspora gigantea*. **Transactions of the British Mycological Society** **76**: 328-330.
- Kramer, D.N. & Guilbault, G.G. 1963. A substrate for the fluorometric determination of lipase activity. **Analytical Chemistry** **35**: 588-589.

- Kurle, J.E. & Pflieger, F.L. 1994. Arbuscular mycorrhizal fungus spore populations to conversions between low-input and conventional management practices in a corn-soybeans rotation. **Agronomy Journal** **86**: 467-475.
- Kuszala, C.; Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. 2001. Storage condition for the long-term survival of AM fungal propagules in wet sieved soil fractions. **Symbiosis** **30**: 287-299.
- Lalander, R.; Gagnon, B.; Simard, R.P. & Côté, D. 2000. Soil microbial biomass and enzyme activity following liquid hog manure application in a long-term field trial. **Canadian Journal of Soil Science** **80**: 263-269.
- Lambert, D.H.; Cole Jr., H. & Baker, D.E. 1980. Adaptation of vesicular-arbuscular mycorrhizae to edaphic factors. **New Phytologist** **85**: 513-520.
- Larkin, R.P. 2003. Characterization of soil microbial community under different potato systems by microbial populations dynamics, substrate utilization and fatty acid profiles. **Soil Biology and Biochemistry** **35**: 1451-1466.
- Leal, P.L.; Martins, M.A.; Rodrigues, L.A. & Schiavo, J.A. 2005. Crescimento de mudas micropropagadas de bananeira micorrizadas em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura** **27**: 84-87.
- Lee, J.J.; Park, R.D.; Kim, Y.W.; Shim, J.H.; Chae, D.H.; Rim, Y.S.; Sohn, B.K.; Kim, T.H. & Kim, K.Y. 2004. Effect of food waste compost on microbial population, soil enzyme activity and lettuce growth. **Bioresource Technology** **93**: 21-28.
- Leonel, S.; Leonel, M. & Duarte Filho, J. 2000. Principais produtos e subprodutos obtidos do maracujazeiro. **Informe Agropecuário** **21**: 81-85.
- Leonel, S. & Pedroso, C.J. 2005. Produção de mudas de maracujazeiro-doce com o uso de biorregulador. **Revista Brasileira de Fruticultura** **27**: 107-109.
- Leopoldino, F.S. & Pereira Neto, J.T. 2000. Recuperação de áreas degradadas por meio da aplicação de composto sobre malhas de taboa (*Thypha* sp.). Pp. 333-336. In: **IV Seminário Nacional sobre Resíduos Sólidos**, Recife.
- Lesuer, D.; Ingleby, K.; Odee, D.; Chamberlain, J.; Wilson, J.; Manga, T.T.; Sarrailh, J.M. & Pottinger, A. 2001. Improvement of forage production in *Calliandra calothyrsus*: methodology for identification of and effective inoculum containing *Rhizobium* strains and arbuscular mycorrhizal isolates. **Journal of Biotechnology** **91**: 269-282.
- Lima, A.A. 1999. Informações sobre a cultura do maracujá amarelo. **Maracujá em foco 2**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura – CNPMF, Cruz das Almas.

- Lima, A.A. & Borges, A.L. 2002. Solo e clima. Pp.25-28. In: A. A. Lima (ed.). **Maracujá produção: Aspectos Técnicos**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Lima, A.A.; Borges, A.L. & Caldas, R.C. 1995. Substratos para produção de mudas de maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura 17**: 127-129.
- Lima, A.A.; Borges, A.L.; Caldas, R.C. & Trindade, A.V. 1997. Substratos e inoculação de fungos micorrízicos em mudas de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Fruticultura 19**: 353-358.
- Lima, A.A.; Borges, A.L.; Cardoso, C.E.L.; Barbosa, C.J.; Costa, D.C.; Santos Filho, H.P.; Fancelli, M. & Sanches, N.F. 1999. **A cultura do maracujá**. Coleção Plantar. Embrapa Mandioca e fruticultura – Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 107p.
- Lima, A.A. & Trindade, A.V. 2002. Propagação. Pp.29-33. In: **Maracujá produção: Aspectos Técnicos**. A. A. Lima (ed.). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Linderman, R.G. & Davis, E.A. 2001. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth response to soil amendment with composted grape pomace or its water extract. **Hortechology 11**: 446-450.
- Lins, C.E.L.; Aguiar, R.L.F.; Cavalcante, U.M.T. & Maia, L.C. 1999. Influência da adubação com esterco bovino e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Carica papaya* L. (var. formosa). **Acta Botânica Brasílica 13**: 257-261.
- Lins, G.M.L.; Trindade, A.V. & Rocha, H.S. 2003. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estádios de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura 25**: 143-147.
- Locatelli, L. M. & Lovato, P.E. 2002. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira 37**: 177- 184.
- Loth, F. & Hofner, W. 1995. Influence of sewage sludge treated soils on the infectivity of VA-mycorrhizal fungi isolates in different plants. **Agrobiological Research 48**: 275-279.
- Louis, I. & Lim, G. 1988a. Differential response in growth and mycorrhizal colonisation of soybean to inoculation with two isolates of *Glomus clarum* in soils of different P availability. **Plant and Soil 112**: 37-43.
- Louis, I & Lim, G. 1988b. Effect of storage of inoculum on spore germination of a tropical isolate of *Glomus clarum*. **Mycologia 80**: 157-161.

- Lovelock, C.E.; Wright, S.F.; Clarck, D.A. & Ruess, R.W. 2004a. Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. **Journal of Ecology** **92**: 278-287.
- Lovelock, C.E.; Wright, S.F. & Nichols, K.A. 2004b. Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphae growth: an example from a tropical rain forest soil. **Soil Biology and Biochemistry** **36**: 1009-1012.
- Luedders, V.D.; Carling, D.E. & Brown, M.F. 1979. Effect of soybean plant growth on spore production by *Glomus mosseae*. **Plant and Soil** **53**: 393-397.
- Luna, J.V.U. 1998. Instruções técnicas para a cultura do maracujá. **Circular Técnica** **6**, Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA, Salvador. 33p.
- Lundgren, B. 1981. Fluorescein diacetate as a stain metabolically active bacteria in soil. **Oikos** **36**: 17-22.
- Lundquist, E.J.; Jackson, L.E.; Scow, K.W. & Hsu, C. 1999. Change in microbial biomass and community composition and soil carbon and nitrogen pool after incorporation of rye into three California agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry** **31**: 221-236.
- Lutgen, E.R.; Muir-Clairmont, D.; Graham, J. & Rillig, M.C. 2003. Seasonality of arbuscular mycorrhizal hyphae and glomalin in a western Montana grassland. **Plant and Soil** **257**: 71-83.
- MacDonald, R.M. 1981. Routine production of axenic vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist** **89**: 87-93.
- Mäder, P.; Edenhofer, S.; Boller, T; Wiemken, A. & Niggli, V. 2000. Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. **Biology and Fertility of Soils** **31**: 150-156.
- Mäder, P.; Fließbach, A.; Dubois, D.; Gunst, L.; Fried, P. & Niggli, V. 2002. Soil fertility and biochemistry in organic farming. **Science** **296**: 1694-1697.
- Maia, L.C.; Kimbrough, J.W. & Benny, G.L. 1994. Ultrastructure of spore germination in *Gigaspora albida* (Glomales). **Mycologia** **86**: 343-349.
- Maia, L.C. & Yano-Melo, A.M. 2001. Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. **Brazilian Journal of Microbiology** **32**: 281-285.
- Malcová, R.; Albrechtová, J. & Vosátka, M. 2001. The role of the extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi on the establishment and growth of *Calamagrostis epigejos* in industrial waste substrate. **Applied Soil Ecology** **18**: 129-142.

- Malcová, R.; Rydlová, J. & Vosátka, M. 2003. Metal-free cultivation of *Glomus* sp. BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. **Mycorrhiza** **13**: 151-157.
- Maldonado, J.F.M.; Cruz e Silva, J.A.; Fernandes, S.G.; Carvalho, S.M.P.; Costa, R.A.; Oliveira, L.A.A.; Sarmiento, W.R.M. & Cunha, H. 1999. **A cultura do maracujá: perspectivas, tecnologias e viabilidade**. Documentos, 49. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro – PESAGRO-RIO, Niterói. 34p.
- Manica, I. 2005. Produção das mudas. Pp. 47-63. In: I. Manica (ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre.
- Manica, I. & Oliveira Jr., M.E. 2005. Maracujá no Brasil. Pp. 11-26. In: I. Manica (ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre.
- Marcote, I.; Hernández, T.; García, C. & Polo, A. 2001. Influence of one or two successive applications of organic fertilizers on the enzyme activity of a soil under barley cultivation. **Bioresource Technology** **79**: 147-154.
- Marinari, S.; Masciandro, G.; Ceccanti, B. & Grego, S. 2000. Influence of organic and municipal fertilizers on soil biological and physical properties. **Bioresource Technology** **72**: 9-17.
- Marschner, P.; Kandeler, E. & Marschner, B. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. **Soil Biology and Biochemistry** **35**: 453-461.
- Martín, T.; Sampedro, I.; García-Romera, I.; García-Garrido, J.M. & Ocampo, J.A. 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effect of olive mill residues. **Soil Biology and Biochemistry** **34**: 1769-1775.
- Martins, M.R.; Oliveira, J.C.; Dimauro, A.O. & Silva, P.C. 2003. Avaliação de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) obtidas de polinização aberta. **Revista Brasileira de Fruticultura** **25**: 111-114.
- Masciandaro, G.; Ceccanti, B. & García, C. 2000. "In situ" vermicomposting of biological sludges and impacts on soil quality. **Soil Biology and Biochemistry** **32**: 1015-1024.
- Mayo, K.; Davis, R.E. & Motta, J. 1986. Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. **Mycologia** **78**: 426-431.
- Medina, A.; Vassilev, N.; Alguacil, M.M.; Roldán, A. & Azcón, R. 2004a. Increased plant growth, nutrient uptake, and soil enzymatic activities in a desertified mediterranean soil

- amended with treated residues and inoculated with native mycorrhizal fungi and a plant growth-promoting yeast. **Soil Science 169**: 260-270.
- Medina, A.; Vassilev, M.; Caravaca, F.; Roldán, A. & Azcón, R. 2004b. Improvement of soil characteristics and growth of *Dorycnium pentaphyllum* by amendment with agrowastes and inoculation with AM fungi and/or the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Chemosphere 56**: 449-456.
- Meharg, A.A. & Cairney, J.W.G. 2000. Co-evolution of mycorrhizal and their hosts to metal-contamination environments. **Advances in Ecological Research 30**: 69-112.
- Mehrotra, V.S. 2005. Mycorrhiza: a premier biological tool for managing soil fertility. Pp. 1-65. In: V.S. Mehrotra (ed.). **Mycorrhiza: Role and Applications**. Allied Publishers Pvt. Limited, New Dehli.
- Meletti, L.M.M. 2001. A cultura do maracujazeiro em São Paulo. **O Agrônomo 53**: 18-20.
- Meletti, L.M.M.; Bernacci, L.C.; Soares-Scotti, M.D.; Fillio, J.A.A. & Martins, A.L.M. 2003. Variabilidade genética em caracteres morfológicos, agronômicos e citogenéticos de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis). **Revista Brasileira de Fruticultura 25**: 275-278.
- Meletti, L.M.M. & Nagai, V. 1992. Enraizamento de sete espécies de maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura 14**: 163-168.
- Menge, J.A. 1984. Inoculum Production. Pp. 187-203. In: C. L. Powell & D.J. Bagyaraj. **VA mycorrhiza**, CRC Press, Florida.
- Mielniczuk, J. 1999. Matéria orgânica e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Pp. 1-8. In: G.A. Santos & F.A.O. Camargo (eds.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. Editora Genesis. Porto Alegre.
- Miller, R.L. & Jackson, L.E. 1998. Survey of vesicular-arbuscular mycorrhizae in lettuce production in relation to management and soil factors. **Journal of Agricultural Science 130**: 173-182.
- Miller, R.M. & Jastrow, J.D. 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. Pp. 3-18. In: Y. Kapulnik & D.D. Douds (eds.). **Arbuscular mycorrhizas: physiology and function**. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Miller-Wideman, M.A. & Watrud, L.S. 1984. Sporulation of *Gigaspora margarita* on root cultures of tomato. **Canadian Journal of Microbiology 30**: 642-646.
- Millner, P.D. & Kitt, D.G. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza 2**: 9-15.

- Millner, P.D. & Wright, S.F. 2002. Tools for support of ecological research on arbuscular mycorrhizal fungi. **Symbiosis** **33**: 101-123.
- Mohammad, M.J.; Hamad, S.R. & Malkawi, H.I. 2003. Populations of arbuscular mycorrhizal fungi in semi-arid environment of Jordan as influenced by biotic and abiotic factors. **Journal of Arid Environments** **53**: 409-417.
- Mohammad, A.; Khan, A.G. & Kuek, C. 2000. Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza** **9**: 337-339.
- Mohammad, A.; Mitra, B. & Khan, A.G. 2004. Effects of sheared-root inoculum of *Glomus intraradices* on wheat grown at different phosphorus level in the field. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **103**: 245-249.
- Monteiro, R.T.R. 2000. Estimativa da atividade microbiana: método de hidrólise do diacetato de fluoresceína. Pp. 133-137. R.T.S. Frigheto & P.J. Valarini (Coords.) **Indicadores Biológicos e Bioquímicos da qualidade do solo: Manual Técnico**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.
- Monzon, A. & Azcón, R. 1996. Relevance of mycorrhizal fungal origin and host plant genotype to inducing growth and nutrient uptake in *Medicago* species. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **60**: 9-15.
- Moorman, T. & Reeves, F.B. 1979. The role of endomycorrhizal in revegetation practices in the semi-arid west. II. A bioassay to determine the effect of land disturbance on endomycorrhizal populations. **American Journal of Botany** **66**: 14-18.
- Moreira, F.M.S. & Siqueira, J.O. 2002. Micorrizas. Pp. 473-539. In: F.M.S. Moreira & J.O. Siqueira (eds.). **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. UFLA, Lavras.
- Morgan, J.A.W.; Bending, G.D. & White, P.J. 2005. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany** **56**: 1729-1739.
- Morton, J.B. & Benny, G.L. 1990. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with and emendation of Glomaceae. **Mycotaxon** **37**: 471-491.
- Mosse, B. 1987. Some studies relating to “independent” growth of vesicular-arbuscular endophytes. **Canadian Journal of Botany** **66**: 2533-2540.
- Munkvold, L.; Kjøller, R.; Vesteborg, M. Rosendahl, S. & Jakobsen, I. 2004. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist** **164**: 357-364.

- Munyanzya, E.; Kehri, H.K. & Bagyaraj, D.J. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agro-ecosystems functions in the tropics: the role of mycorrhiza in crops and trees. **Applied Soil Ecology** **6**: 77-85.
- Murase, A.; Yoneda, M.; Ueno, R. & Yonebayashi, K. 2003. Isolation of extracellular protein from greenhouse soil. **Soil Biology and Biochemistry** **35**: 733-736.
- Murphy, J.G.; Rafferty, S.M. & Cassells, A.C. 2000. Stimulation of wild strawberry (*Fragaria vesca*) arbuscular mycorrhizas by addition of shellfish waste to the growth substrate: interaction between mycorrhization, substrate amendment and susceptibility to red core (*Phytophthora fragariae*). **Applied Soil Ecology** **15**: 153-158.
- Muthukumar, T. & Udaiyan, K. 2002. Growth and yield of cowpea as influenced by changes in arbuscular mycorrhiza in response to organic manuring. **Journal of Agronomy & Crop Science** **188**: 123-132.
- Muthukumar, T. & Udaiyan, K. 2000. Influence of organic manures on arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. in relation to tissue nutrients and soluble carbohydrate in roots under field condition. **Biology and Fertility of Soils** **31**: 114-120.
- Nadarajah, P. & Nawawi, A. 1987. Effect of temperature on germination and growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. P. 214. In: D.M. Sylvia; L.L. Hung & S.H. Graham. **Proceedings of the 7th NACOM**. Gainesville, Florida.
- Nagahashi, G. & Douds, D.D. 2000. Partial separation of root exudate components and their effects upon the growth of germinated spore of AM fungi. **Mycological Research** **104**: 1453-1464.
- Nagahashi, G.; Douds, D. & Buee, M. 2000. Light-induced hyphae branching of germinated AM fungal spores. **Plant and Soil** **219**: 71-79.
- Nannipieri, P.; Ascher, J.; Ceccherini, M.T.; Landi, L.; Pietramellara, G. & Renella, G. 2003. Microbial diversity and soil functions. **European Journal and Soil Science** **54**: 655-670.
- Nannipieri, P.; Kandeler, E. & Ruggiero, P. 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. Pp. 1-33. In: R.G. Burns & P.P. Dick (eds.). **Enzyme in the Environment: Activity, Ecology and Applications**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Nsabimana, D.; Haynes, R.J. & Wallis, F.M. 2004. Size, activity and catabolic diversity of the microbial biomass as affected by land use. **Applied Soil Ecology** **26**: 81-92.
- Nemec, S. 1987. Effect of storage temperature and moisture on *Glomus* species and their subsequent effect on citrus rootstock growth and mycorrhiza development. **Transactions of the British Mycological Society** **89**: 205-211.

- Newsham, K.K.; Fitter, A.H. & Watkinson, A.R. 1995. Multi-functionality and biodiversity in arbuscular mycorrhizas. **Tree** **10**: 407-411.
- Nichols, K.A. 2003. **Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi**. PhD Thesis, University of Maryland, USA.
- Nogueira, M.A. & Cardoso, E.J.B.N. 2000. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento da soja em função de doses de fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **24**: 329-338.
- Novaes, Q.S.; Rezende, J.A.M. & Kitajima, E.W. 2000. Doenças causadas por vírus e fitoplasma em maracujazeiro. **Informe Agropecuário** **21**: 49-51.
- Novotny, E. & Martin-Neto, L. 1999. Propriedades coloidais da matéria orgânica. Pp. 41-67. In: G.A. Santos & F.A.O. Camargo (eds.). **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Genesis, Porto Alegre.
- Noyd, R.K.; Pfleger, F.L. & Norland, M.R. 1996. Field responses to added organic matter, arbuscular mycorrhizal fungi and fertilizer in reclamation of talconite iron one tailing. **Plant and Soil** **179**: 89-97.
- Oehl, F.; Sieverding, E.; Ineichen, K.; Mäder, P.; Boller, T. & Wiemken, A. 2003. Impact of land-use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. **Applied and Environmental Microbiology** **69**: 2816-2824.
- Oehl, F.; Sieverding, E.; Mader, P.; Dubois, D.; Ineichen, K.; Boller, T. & Wiemken, A. 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. **Oecologia** **138**: 574-583.
- Oliveira, J.C.; Ruggiero, C. & Nakamura, K. 1982. Variações observadas em frutos de *Passiflora alata* Ait. **Proceedings of the Tropical Region-American Society for Horticultural Science** **25**: 343-345.
- Oliveira, J.C.; Salomão, T.A. & Ruggiero, C. 1980. Observações sobre o cultivo de *Passiflora alata* Ait. (maracujá-guaçu). **Revista Brasileira de Fruticultura** **2**: 59-63.
- Ortega-Larrocea, M.P.; Siebe, C.; Becárd, G.; Méndez, I. & Webster, R. 2001. Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. **Applied Soil Ecology** **16**: 149-157.
- Osipi, E.A.F. & Nakagawa, J. 2005a. Avaliação da potencialidade fisiológica de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) submetidas ao armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura** **27**: 52-54.

- Osipi, E.A.F. & Nakagawa, J. 2005b. Efeito da temperatura na avaliação da qualidade fisiológica de sementes do maracujazeiro-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura** **27**: 179-181.
- Paiva, L.M.; Silva, M.A.; Silva, P.C. & Maia, L.C. 2003. *Glomus clarum* e *G. etunicatum*: cultivo em solo e aeroponia. **Revista Brasileira de Botânica** **26**: 257-262.
- Palenzuela, J.; Azcón-Aguilar, C.; Figueroa, D.; Caravaca, F.; Roldán, A. & Barea, J.M. 2002. Effects of mycorrhizal inoculation of shrubs from Mediterranean ecosystems and composted residue application on transplant performance and mycorrhizal developments in a desertified soil. **Biology and Fertility of Soils** **36**: 170-175.
- Pandey, R.; Gupta, M.L.; Singh, H.B. & Kumar, S. 1999. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi alone or in combination with *Meloidogyne incognita* on *Hyoscyamus niger* L. **Bioresource Technology** **69**: 275-278.
- Pankhurst, C.E.; Blair, B.L.; Magary, R.C.; Stirling, G.R.; Bell, M.J. & Garside, A.L. 2005. Effect of rotation breaks and organic matter amendments on the capacity of soils to develop biological suppression towards soil organisms associated with yield decline of sugarcane. **Applied Soil Ecology** **28**: 271-282.
- Paris, F.; Petry, R.D.; Reginatto, F.H.; Gosmann, G.; Quevedo, J.; Salgueiro, J.B.; Kapczynski, F.; González, O.G. & Schenkel, E.P. 2002. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense** **21**: 5-8.
- Parmiske, M. 2005. Cue for the branching connection. **Nature** **435**: 750-751.
- Pascual, J.A.; García, C. & Hernandez, T. 1999a. Comparison of fresh and composted organic waste in their efficacy for the improvement of arid soil quality. **Biosource Technology** **68**: 255-264.
- Pascual, J.A.; García, C. & Hernandez, T. 1999b. Lasting microbiological and biochemical effects of the municipal waste to an arid soil. **Biology and Fertility of Soils** **30**: 1-6.
- Pascual, J.A.; Hernández, T.; García, C. & Ayuso, M. 1998. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experiment. **Bioresource Technology** **64**: 131-138. -6.
- Pascual, J.A.; Moreno, J.L.; Hernández, T. & García, C. 2002. Persistence of immobilized and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. **Bioresource Technology** **82**: 73-78.

- Paul, E.A. & Clark, F.E. 1989. Carbon cycling and soil organic matter. Pp. 91-114. In: E.A. Paul & F.E. Clark (eds.). **Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press, Inc., San Diego.
- Paula, M.A. & Siqueira, J.O. 1990. Stimulation of hyphal growth of the VA mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* by suspension-cultured *Pueraria phaseoloides* cells and cell products. **New Phytologist** **115**: 69-75.
- Paula, M.A.; Siqueira, J.O.; Pinto, J.E.B.P. & Pascual, M. 1991. Efeitos de calos e suspensões de células vegetais na germinação e crescimento micelial do fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Scutellospora heterogama*. **Revista Brasileira de Biologia** **51**: 127-132.
- Pavan, M.A. & Chaves, J.C.D. 1998. **A importância da matéria orgânica nos sistemas agrícolas**. Circular Nº 98, Governo do Paraná, IPAR, Londrina. 36 p.
- Pawlowska, T. & Charvat, I. 2004. Heavy-metal stress and development patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied and Environmental Microbiology** **70**: 6643-6649.
- Pawlowska, T.E.; Douds, D.D. & Charvat, I. 1999. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. **Mycological Research** **103**: 1549-1556.
- Pawlowska, T.E. & Taylor, J.W. 2004 Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature** **427**: 733-737.
- Pereira, S.V.; Martinez, C.R.; Porto, E.R.; Oliveira, B.R. & Maia, L.C. 2004. Atividade microbiana em solo do semi-árido sob cultivo de *Atriplex numularia*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **39**: 757-762.
- Pereira-Neto, J.T. 1996. **Manual de compostagem**. UNICEF, Belo Horizonte. 56p.
- Perez-Murcia, M.D.; Moral, B.; Moreno-Vasselles, J.; Perez-Espinosa, A. & Paredes, C. 2006. Use of composted sewage sludge in the growth media for brocoli. **Bioresource Technology** **97**: 123-130.
- Pérez Sarmantero, J.; Molina, A. & Colmenares, R. 1994. Influencia del abonado com compost y fertilizantes solubles sobre la actividad enzimática Del suelo y la cualidad del cultivo avena-veza em una finca de la alta montaña madrileña. Pp. 47-56. In: **Prácticas Agrícolas para una Agricultura de Calidad, I Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica**, Toledo.
- Pinzari, F.; Trinchera, A.; Benedetti, A. & Sequi, P. 1999. Use of biochemical indices in the mediterranean environment: comparison among soils under different forest vegetation. **Journal of Microbiological Methods** **36**: 21-28.

- Piotrowski, J.S.; Denich, T.; Klironomos, J.N.; Graham, J.M. & Rillig, M.C. 2004. The effect of arbuscular mycorrhizas on soil aggregation depends on the interaction between plant and fungal species. **New Phytologist** **164**: 365-373.
- Piza Jr., C.T. & Kavati, R. 1995. 7º Ciclo de debates sobre a cultura do maracujá. **Comunicado Técnico 124**: 1-6, Secretaria de Agricultura e Abastecimento, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral – CATI, Departamento de Extensão Rural – DEXTRU.
- Plenchette, C.; Declerck, S.; Diop, T.A. & Strullu, D.G. 1996. Infectivity of monoaxenic subcultures of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* associated with Ri-T-DNA-transformed carrot root. **Applied Microbiology and Biotechnology** **46**: 545-548.
- Plenchette, C.; Perrin, R. & Duvert, P. 1989. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. **Canadian Journal of Botany** **67**: 112-115.
- Plenchette, C. & Strullu, D.G. 2003. Long-term viability and infectivity of intraradical forms of *Glomus intraradices* vesicles encapsulated in alginate beads. **Mycological Research** **107**: 614-616.
- Poll, C.; Thiede, A.; Wermbter, N.; Sessitsch, A. & Kandeler, E. 2003. Micro-scale distribution of microorganisms and microbial enzyme activities in a soil with long-term organic amendment. **European Journal of Soil Science** **54**: 715-724.
- Pond, E.C.; Menge, J. A. & Jarrell, W.M. 1984. Improved growth of tomato in salinized soil by vesicular arbuscular mycorrhizal fungi collected from saline soils. **Mycologia** **76**: 74-84.
- Potty, V.P. 1985. Cassava as an alternative host for multiplication of VAM fungi. **Plant and Soil** **88**: 135-137.
- Poulin, M.J.; Belrhilid, R.; Piché, Y. & Chenevert, R. 1993. Flavonoids released by carrot (*Daucus carota*) seedling stimulate hyphal development of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of optimal CO₂ enrichment. **Journal of Chemical Ecology** **19**: 2317-2327.
- Prado, R.M.; Natale, W.; Corrêa, M.C. & Braghirolli, L.F. 2004. Efeitos da aplicação de calcário no desenvolvimento, no estado nutricional e na produção de matéria seca de mudas de maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura** **26**: 145-149.
- Quatrini, P.; Gentile, M.; Carimi, F.; Pasquale, F. & Puglia, A.M. 2003. Effect of native arbuscular mycorrhizal fungi and *Glomus mosseae* on acclimatization and development of

- micropropagated *Citrus limon* (L.) Burn. **Journal of Horticultural Science & Biotechnology** **78**: 39-45.
- Quintero-Ramos, M.; Espinoza-Victoria, D.; Ferrera-Cerrato, R. & Bethlenfalvay, G.J. 1993. Fitting plants to soil through mycorrhizal fungi: mycorrhiza effects on plant growth and soil organic matter. **Biology and Fertility of Soils** **15**: 103-106.
- Raju, P.S.; Clarck, R.B.; Ellis, J.R. & Maranville, J.W. 1990. Effects of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. **Plant and Soil** **121**: 165-170.
- Redecker, D.; Kodner, R. & Graham, L.E. 2000. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science** **289**: 1920-1921.
- Requena, N.; Perez-Solis, E.; Azcón-Aguilar, C.; Jeffries, P. & Barea, J.M. 2001. Management of indigenous plant-microbe symbiosis aids restoration of desertified ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology** **67**: 495-498.
- Rillig, M.C. 2005. A connection between fungal hydrophobins and soil water repellency? **Pedobiologia** **49**: 395-399.
- Rillig, M.C. 2004a. Arbuscular mycorrhizal and terrestrial ecosystem processes. **Ecology Letters** **7**: 740-754.
- Rillig, M.C. 2004b. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science** **84**: 355-363.
- Rillig, M.C. & Allen, M.F. 1999. What is the role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant-to-ecosystem response to elevated atmosphere CO₂? **Mycorrhiza** **9**: 1-8.
- Rillig, M.C.; Hernández, G.Y. & Newton, P.C.D. 2000. Arbuscular mycorrhizae responde to elevated atmospheric CO₂ after long-term exposure: evidence from a CO₂ spring in New Zealand supports to resource balance model. **Ecology Letters** **3**: 475-478.
- Rillig, M.C.; Lutgen, E.R.; Ramsey, P.W.; Klironomos, J.N. & Gannnon, J.E. 2005. Microbiota to accompanying different arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence soil aggregation. **Pedobiologia** **49**: 251-259.
- Rillig, M.C.; Maestre, F.T. & Lamit, L.J. 2003a. Microsite differences in fungal hyphal lenght, glomalin and soil aggregate stability in semiarid Mediterranean steppes. **Soil Biology and Biochemistry** **35**: 1257-1260.
- Rillig, M.C.; Ramsey, P.W.; Morris, S. & Paul, E.A. 2003b. Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. **Plant and Soil** **253**: 293-299.

- Rillig, M.C & Steinberg, P.D. 2002. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? **Soil Biology and Biochemistry** **34**: 1371-1374.
- Rillig, M.C.; Wright, S.F.; Allen, M.F. & Field, C.B. 1999. Rise in carbon dioxide changes soil structure. **Nature** **400**: 628.
- Rillig, M.C.; Wright, S.F. & Eviner, V.T. 2002a. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin in soil aggregation: comparing effects of five plant species. **Plant and Soil** **238**: 325-333.
- Rillig, M.C.; Wright, S.F.; Kimball, B.A.; Pinter, P.J.; Wall, G.W.; Ottman, M.J. & Leavitt, S.W. 2001a. Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a *Sorghum* field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. **Global Change Biology** **7**: 333-337.
- Rillig, M.C.; Wright, S.F.; Nichols, K.A.; Schmidt, W.F. & Torn, M.S. 2001b. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. **Plant and Soil** **233**: 167-177.
- Rillig, M.C.; Wright, S.F.; Shaw, R. & Field, C.B. 2002b. Artificial climate warming affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. **Oikos** **97**: 52-58.
- Ritzinger, C.H.S.P.; Sharma, R.D. & Junqueira, N.T.V. 2002. Nematóides e seu controle. Pp.69-75. In: A. A. Lima (ed.). **Maracujá produção: Aspectos Técnicos**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Rodríguez, A.M.; Hurtado, M. & Prager, M.S. 1995. Inoculacion de granadilla *Passiflora ligulares* L. con MVA. **Acta Agronomica** **45**: 89-98.
- Roldán, A. & Albaladejo, J. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhiza (VAM) fungal populations in a xeric torriorthent receiving urban refuse. **Soil Biology and Biochemistry** **25**: 451-456.
- Roldán, A.; Caravaca, F.; Hernández, M.T.; García, C.; Sánchez-Brito, C.; Velásquez, M. & Tiscareño, M. 2003. No tillage crop residue rotations, and legume cover cropping effects on soil quality characteristics under maize in Patzcuaro watershed (Mexico). **Soil and Tillage Research** **72**: 65-73.
- Roldán, A.; Salinas-García, J.R.; Alguacil, M.M. & Caravaca, F. 2005. Changes in soil enzyme activity, fertility, aggregation and C sequestration mediated by conservation tillage practices and water regime in a maize field. **Applied Soil Ecology** **30**: 11-20.

- Romero, A.G.F. & Siqueira, J.O. 1996. Activity of flavonoids on spore of the mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea* in vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **31**: 517-522.
- Ros, M.; Hernadéz, M.T. & García, C. 2003. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. **Soil Biology and Biochemistry** **35**: 463-469.
- de Rosa, S.; Sconza, F. & Volterra, L. 1998. Biofilm amount estimation by fluorescein diacetate. **Water Research** **32**: 2621-2626.
- Ruggiero, C. 2000. Situação da cultura do maracujazeiro no Brasil. **Informe Agropecuário** **21**: 5-9.
- Ruggiero, C.; São José, A.R.; Volpe, C.A.; Oliveira, J.C.; Durigan, J.F.; Baumgartner, J.G.; Silva, J.R.; Nakamura, K.; Ferreira, M.E.; Kavati, R. & Pereira, V.P. 1996. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Flores e Plantas Ornamentais. Embrapa – SPI, Brasília. 64p.
- Ruiz-Lozano, J.M. & Azcón, R. 2000. Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. **Mycorrhiza** **10**: 137-143.
- Ruiz-Lozano, J.M. & Azcón, R. 1996. Viability and infectivity of mycorrhizal spores after long-term storage in soils with different water potentials. **Applied Soil Ecology** **3**: 183-186.
- Ryan, M & Ash, J. 1999. Effects of phosphorus and nitrogen on growth of pasture plants and VAM fungi in SE Australian soils with contrasting fertilizers histories (conventional and biodynamic). **Agriculture, Ecosystems and Environment** **73**: 51-62.
- Ryan, M.H.; Chilvers, G.A. & Dumaresq, D.C. 1994. 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.
- Ryan, M.H. & Graham, J.H. 2002. Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? **Plant and Soil** **244**: 263-271.
- Ryan, M.H.; Small, D.R. & Ash, J.E. 2000. Phosphorus controls the level of colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in conventional and biodynamic irrigated dairy pastures. **Australian Journal of Experimental Agriculture** **40**: 663-670.
- Safir, G.R.; Coley, S.C.; Siqueira, J.O. & Carlson, P.S. 1990. Improvement and synchronization of VA mycorrhiza fungal spore germination by short-term cold storage. **Soil Biology and Biochemistry** **22**: 109-111.

- Saggin-Junior, O. J. & Lovato, P. E. 1999. Aplicação de micorrizas na produção de mudas e plantas micropropagadas. Pp. 725-773. In: J.O. Siqueira; F.M.S. Moreira; A.S. Lopes; L.R.G. Guilherme; V. Faquin; A.E. Furtini Neto & J.G. Carvalho. **Inter-Relação Fertilidade, Biologia do solo e Nutrição de plantas**. SBCS, UFLA, DCS, Lavras.
- Sainz, M.J. & Arines, J. 1988. Effect of indigenous and introduced vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on growth and phosphorus uptake of *Trifolium pratense* and on inorganic phosphorus fractions in a cambisol. **Biology and Fertility of Soils** **6**: 55-60.
- Sáinz, M.J.; Taboada-Castro, M.T. & Vilariño, A. 1998. Growth, mineral nutrition and mycorrhizal colonization of red clover and cucumber plants grown in a soil amended with composted urban wastes. **Plant and Soil** **205**: 85-92.
- Salami, A.O. & Osonubi, O. 2002. Improving the traditional landuse system through agro-biotechnology: a case study of adoption of vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) by response poor farmers in Nigeria. **Technovation** **22**: 725-730.
- Salomão, L.C.C. 2002. Colheita. Pp.16-19. In: F.C.A.U Matsuura & M.I.S. Folegatti (eds.). **Maracujá Pós-colheita**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Salomão, L.C.C.; Pereira, W.E.; Duarte, R.C.C. & Siqueira, D.L. 2002. Propagação por estaquia dos maracujazeiros doce (*Passiflora alata* Dryand.) e amarelo (*P. edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Revista Brasileira de Fruticultura** **24**: 163-167.
- Sanders, I.R. 2004. Intraespecific genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi and its consequences for molecular biology, ecology, and development of inoculum. **Canadian Journal of Botany** **82**: 1057-1062.
- Sannazzaro, A.I.; Álvarez, C.L.; Menéndez, A.B.; Pieckenstain, F.L.; Albertó, E.O. & Ruiz, O.A. 2004. Ornithine and arginine decarboxylase activities and effect of some polyamine biosynthesis inhibitors on *Gigaspora rosea* germinating spores. **FEMS Microbiology Letters** **230**: 115-121.
- Santos, I.C.; Casali, V.W.D. & Miranda, G.V. 1998. Comportamento de dez cultivares de alface adubadas com composto de lixo urbano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **23**: 157-161.
- Santos, R.H.S.; Silva, F.; Casali, V.V.D. & Conde, A.R. 2001. Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **36**: 1395-1398.
- Sanzonowicz, C. & Andrade, L.M. 2005. Nutrição, adubação e irrigação. Pp. 77-80. In: I. Manica (ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Editora Cinco Continentes, Porto Alegre.

- Sarangi, P.K.; Mahakur, D. & Mishra, P.C. 2001. Soil biochemical activity and growth response of rice *Oryza sativa* in flyash amended soil. **Bioresource Tcehnology** **76**: 199-205.
- Sattelmacher, B.; Reinhard, S. & Pomikalko, A. 1991. Differences in mycorrhizal colonization of rye (*Secale cereale* L.) in conventional or organic (Biological-dynamic) farming systems. **Journal of Agronomy & Crop Science** **167**: 350-355.
- Sbrana, C. & Giovannetti, M. 2005. Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Mycorrhiza** **15**: 539-545.
- Schiavo, J.A. & Martins, M.A. 2002. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum* em substrato agro-industrial. **Revista Brasileira de Fruticultura** **24**: 519-523.
- Schnüner, J. & Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied and Environmental Microbiology** **43**: 1256-1261.
- Schubert, A. & Lubraco, G. 2000. Mycorrhizal inoculation enhances growth and nutrient uptake of micropropagated apple rootstock during weaning in commercial substrates of high nutrient availability. **Applied Soil Ecology** **15**: 113-118.
- Schussler, A.; Schwarzott, D. & Walker, C. 2001. A new fungal phylum *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research** **105**: 1413-1421.
- Scullion, J.; Eason, W.R. & Scott, E.P. 1998. The effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi high input conventional and organic grassland and grass-arable rotation. **Plant and Soil** **204**: 243-254.
- Sharma, M.P.; Bhatia, N.P. & Adholeya, A. 2001. Mycorrhizal dependency and growth responses of *Acacia nilotica* e *Albizzia lebbeck* by indigenous AM fungi as influenced by available soil P levels in semi-arid Alfisol wasteland. **New Forest** **21**: 89-104.
- Sieverding, E. 1988. Effect of soil temperature on performance of diferent VA mycorrhizal isolates with cassava. **Angewandte Botanik** **62**: 295-300.
- Sieverding, E. 1991. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ), Eschborn, Germany.
- Sieverding, E. & Galvez, A. 1988. Performance of different cassava clones with various VA mycorrhizal fungi. **Angewandte Botanik** **62**: 273-282.
- Silva, L.S.; Camargo, F.A.O. & Ceretta, C.A. 2004a. Composição da fase sólida do solo. Pp. 73-99. **Fundamentos de química do solo**. Editora Genesis, Porto Alegre.

- Silva, M.A.; Cavalcante, U.M.T.; Silva, F.S.B.; Soares, S.A.G. & Maia, L.C. 2004b. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) associadas a fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota). **Acta Botânica Brasílica** **18**: 981-985.
- Silva, H.A.; Corrêa, L.S. & Boliani, A.C. 2004c. Efeitos do sistema de condução, poda e irrigação na produção do maracujazeiro doce. **Revista Brasileira de Fruticultura** **26**: 450-453.
- Silva, J.R. & Oliveira, H.J. 2000. Nutrição e adubação do maracujazeiro. **Informe Agropecuário** **21**: 52-58.
- Silva, R.P.; Peixoto, J.R. & Junqueira, N.T.V. 2001. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* DEG). **Revista Brasileira de Fruticultura** **23**: 377-381.
- Silva, C.P. & Silva-Almeida, M.F. 2000. O uso medicinal do maracujá. **Informe Agropecuário** **21**: 86-88.
- Silva, L.C.R. & Siqueira, J.O. 1991. Efeitos de carboidratos e ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial do fungo endomicorrízico *Gigaspora gigantea* “in vitro”. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **26**: 2007-2014.
- Silveira, A.P.D.; Silva, L.R.; Azevedo, I.C.; Oliveira, E. & Meletti, L.M.M. 2003. Desempenho de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo em diferentes substratos. **Bragantia** **62**: 1-12.
- Simpson, D. & Daft, M.J. 1990. Spore production and mycorrhizal development in various tropical hosts infected with *Glomus clarum*. **Plant and Soil** **121**: 171-178.
- Siqueira, J.O. & Klauber-Filho, O. 2000. Micorrizas arbusculares: A pesquisa brasileira em perspectiva. Pp. 235-264. In: E.F. Novais; V.H. Alvarez; C.E.G.R. Schaefer. **Tópicos em Ciência do Solo**. SBCS, Viçosa.
- Siqueira, J.O.; Hubbell, D.H. & Mahmud, A.W. 1984. Effect of liming on the spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** **76**: 115-124.
- Siqueira, J.O.; Hubbell, D.H. & Schenck, N.C. 1982. Spore germination and germ tube growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus “in vitro”. **Mycologia** **74**: 952-959.
- Siqueira, J.O.; Saggin-Júnior, O.J.; Flores-Aylas, W.W.; Guimarães, P.T.G. 1998. Arbuscular mycorrhizal inoculation and superphosphate application influence plant development and yield of coffee in Brazil. **Mycorrhiza** **7**: 293-300.

- Siqueira, J.O.; Sylvia, D.M.; Gibson, J. & Hubbel, D.H. 1985. Spores, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Microbiology** **31**: 965-972.
- Smith, S.E. & Read, D.J. 1997. **Mycorrhizal Symbiosis**. Second edition. Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers. 605p.
- Soares, A.C.F. & Martins, M.A. 2000. Influência de fungos micorrízicos arbusculares, associada à adição de compostos fenólicos, no crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpus*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **24**: 731-740.
- Söderström, B.E. 1977. Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. **Soil Biology and Biochemistry** **9**: 59-63.
- Soedarjo, M. & Habte, M. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhizal effectiveness in an acid soil amended with fresh organic matter. **Plant and Soil** **149**: 197-203.
- Sossai, M.F.; Pereira Neto, J.T. & Paiva, H.N. 2000. Composto orgânico de resíduos sólidos urbanos como substrato para a produção de espécies florestais. Pp. 324-328. In: **IV Seminário Nacional sobre Resíduos Sólidos**, Recife.
- Souza, F.A. & Berbara, R.L.L. 1999. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri-T-DNA transformed roots. **Mycologia** **91**: 343-350.
- Souza, E.S.; Burity, H.A.; Espírito-Santo, A.C.D. & Silva, M.L.R.B. 1996. Alternative for arbuscular mycorrhizal fungi inoculum production in aeroponic culture. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **31**: 153-158.
- Souza, J.S.; Cardoso, C.E.L.; Lima, A.A. & Coelho, E.F. 2002. Comercialização. Pp.91-96. In: **Maracujá produção: Aspectos Técnicos**. A. A. Lima (ed.). Embrapa Informação Tecnológica, Brasília.
- Souza, P.V.D.; Carniel, E.; Schmitz, J.A. & Silveira, S.V. 2005. Influência de substratos e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento vegetativo do porta-enxerto Flying Dragon (*Poncirus trifoliolata* var. montruosa Swing.). **Revista Brasileira de Fruticultura** **27**: 285-287.
- Souza, C.A.S.; Siqueira, J.O.; Oliveira, E. & Carvalho, J.G. 1991. Crescimento e nutrição de mudas de cafeeiro micorrizadas: efeito da matéria orgânica e superfosfato simples. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **26**: 1989-2005.
- Staddon, P.L. & Fitter, A.H. 1998. Does elevated atmospheric carbon dioxide affect arbuscular mycorrhizas? **Tree** **13**: 455-458.

- Staddon, P.L. & Fitter, A.H. 2001. The differential vitality of intraradical mycorrhizal structures and its implications. **Soil Biology and Biochemistry** **33**: 129-132.
- Staddon, P.L.; Ramsey, C.B.; Ostle, N.; Ineson, P. & Fitter, A.H. 2003. Rapid turnover of hyphae of mycorrhizal fungi determined by AMS microanalysis of ^{14}C . **Science** **16**: 1138-1140.
- Stahl, P.D. & Chritensen, M. 1991. Population variation in the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: breadth of environment tolerance. **Mycological Research** **95**: 300-307.
- Stenberg, B. 1999. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Acta Agriculturae Scandinavica** **49**: 1-24.
- Steinberg, P.D. & Rillig, M.C. 2003. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. **Soil Biology and Biochemistry** **35**: 191-194.
- St-Arnaud, M.; Hamel, C.; Vimard, B.; Caron, M. & Fortin, J.A. 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. **Mycological Research** **100**: 328-332.
- St. John, T.V.; Coleman, D.C. & Reid, P.P. 1983. Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae with soil organic particles. **Ecology** **64**: 957-959.
- Struble, J.E. & Skipper, H.D. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spore production as influenced by plant species. **Plant and Soil** **109**: 277-280.
- Strullu, D.G. & Plenchette, C. 1991. The entrapment of *Glomus* sp. In alginate beads and their use as root inoculum. **Mycological Research** **95**: 1194-1196.
- Strullu, D.G.; Romand, C. & Plenchette, C. 1991. Axenic culture and encapsulation of the intraradical forms of *Glomus* spp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **7**: 292-297.
- Stubberfield, L.C.F. & Shaw, P.J.A. 1990. A comparison of tetrazolium reduction and FDA hydrolysis with other measures of microbial activity. **Journal of Microbiological Methods** **12**: 151-162.
- Stürmer, S.L. 2004. Efeito de diferentes isolados fúngicos da mesma comunidade micorrízica no crescimento e absorção de fósforo em soja e trevo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do solo** **28**: 611-622.
- Swisher, R. & Carroll, G.C. 1980. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial Ecology** **6**: 217-226.
- Sylvia, D.M. 1988. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry** **20**: 39-43.

- Sylvia, D.M. 1990. Distribution, structure and function of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Pp. 144-167. In: J.E. Box & L.H. Hammond (eds.). **Rhizosphere Dynamics**. Westview Press, Boulder.
- Sylvia, D.M. 1999. Fundamentals and application of arbuscular mycorrhizae: A “biofertilizer” perspective. Pp. 705-723. In: J.O. Siqueira, F.M.S. Moreira, A.S. Lopes, L.R.G. Guilherme, V. Faquin, A.E. Furtini Neto, J.G. Carvalho (eds.). **Inter-Relação Fertilidade, Biologia de solo e Nutrição de plantas**. SBCS, UFLA, DCS, Lavras.
- Sylvia, D.M. 2001. <http://www.dmsylvia.ifas.ufl.edu/commercial.htm>.
- Sylvia, D.M. 1998. Mycorrhizal Symbiosis. In: Pp. 408-426. In: D.M. Sylvia; J.J. Fuhrmann; P.G. Hartel & D.A. Zubeber (eds.). **Principles and applications of Soil Microbiology**. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- Sylvia, D.M. 1994. **Methods of Soil Analysis, part 2. Microbiological and Biochemical Properties**-SSSA Book Series, nº 5.
- Sylvia, D.M.; Alagely, A.K.; Kane, M.E. & Philman, N.L. 2003. Comparative host/mycorrhizal fungus combinations for micropropagated sea oats. I. Field sampling and greenhouse evaluations. **Mycorrhiza** **13**: 177-183.
- Sylvia, D.M. & Hubbel, D.H. 1986. Growth and sporulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in aeroponic and membrane systems. **Symbiosis** **1**: 259-267.
- Sylvia, D.M. & Jarstfer, A.G. 1994. Production of inoculum and inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi. Pp. 231-238. In: A.P. Robson; L.K. Abbott & N. Malajczek (eds.). **Management of Mycorrhizas in Agriculture, Horticulture and Forestry**. Kluwer Academic Press, The Netherlands.
- Sylvia, D.M.; Jarstfer, A.G. & Vosátka, M. 1993. Comparisons of vesicular-arbuscular mycorrhizal species and inocula formulations in a nursery and on diverse Florida beaches. **Biology and Fertility of Soils** **16**: 139-144.
- Sylvia, D.M. & Neal, L.H. 1990. Nitrogen affects the phosphorus response of VA mycorrhiza. **New Phytologist** **115**: 303-310.
- Sylvia, D.M. & Schenck, N.C. 1983. Germination of chlamydospores of three *Glomus* species as affected by soil matric potential and fungal contamination. **Mycologia** **71**: 30-35.
- Tanu; Prakash, A. & Adholeya, A. 2004. Effect of different organic manures/composts on the herbage and essential oil yield of *Cymbopogon winterianus* and their influence on the native AM population in a marginal alfisol. **Bioresource Technology** **92**: 311-319.

- Tarafdar, J.C. 2005. Pratical aspects of arbuscular mycorrhizal technology in arid region. Pp. 255-281. In: V.S. Mehrotra (ed.). **Mycorrhiza: Role and Applications**. Allied Publishers Pvt. Limited, New Dehli.
- Tarafdar, J.C. & Marschner, H. 1994. Efficiency of VAM hyphae in utilization of organic phosphorus by wheat plants. **Soil Science of Plant Nutrition** **40**: 593-600.
- Taylor, J.P.; Wilson, B.; Mills, M.S. & Burns, R.G. 2002. Comparision of microbial members and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques. **Soil Biology and Biochemistry** **34**: 387-401.
- Tedesco, M.J.; Selbach, P.A.; Gianello, C. & Camargo, F.A.O. 1999. Resíduos orgânicos no solo e os impactos no ambiente. Pp. 159-196. In: G.A. Santos & F.A.O. Camargo (ed.). **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo: Ecossistemas Tropicais e Subtropicais**. Gênese, Porto Alegre.
- Texeira, C. E. & Mandelli, S. M. C. 1991. Avaliação do processo de compostagem dos resíduos sólidos domésticos de Caxias do Sul. Pp. 35-67. In: S. M. C. Manadalli; L. M. Q. Lima & M. K. Ojima (eds.). **Tratamento de resíduos sólidos: compêndio de publicações**.
- Thompson, J.P. 1986. Soiless culture of vesicular-arbuscular mycorrhizae of cereals: effect of nutrient concentration and nitrogen source. **Canadian Journal of Botany** **64**: 2282-2294.
- Tiquia, S.M. 2005. Microbiological parameters as indicators of compost maturity. **Journal of Applied Microbiology** **99**: 816-828.
- Tian, Y.; Feng, G.; Li, X.L. & Zhang, F.S. 2004. Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline soil on salinity tolerance of plants. **Applied Soil Ecology** **26**: 143-148.
- Tisdall, J.M. 1994. Possible role of soil microorganisms in aggregation in soils. **Plant and Soil** **159**: 115-121.
- Tisdall, J.M. & Oades, J.M. 1982. Organic matter and water stable aggregate in soils. **Journal of Soil Science** **3**: 141-163.
- Tommerup, I.C. 1988. Long-Term preservation by L-drying and storage of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **Transactions of the British Mycological Society** **90**: 585-591.
- Tommerup, I.C. 1984. Persistence of infectivity by germinated spores of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Trasactions of the British Mycological Society** **82**: 275-282.

- Tommerup, I.C. 1987. Physiology and ecology of VAM spore germination and dormancy in soil. Pp. 175-177. In: D.M. Sylvia; L.L. Hung & S.H. Graham. **Proceedings of the 7th NACOM**. Gainesville, Florida.
- Tommerup, I.C. 1983a. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Transactions of the British Mycological Society** **81**: 37-45.
- Tommerup, I.C. 1983b. Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Transactions of the British Mycological Society** **81**: 381-387.
- Treseder, K.K.; Mack, M.C. & Cross, A. 2004. Relationships among fires, fungi, and soil dynamics in Alaskan boreal forests. **Ecological Applications** **14**: 1826-1838.
- Trindade, A.V.; Faria, N.G. & Almeida, F.P. 2000. Uso de esterco no desenvolvimento de mudas de mamoeiros colonizados com fungos micorrízicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **35**: 1389-1394.
- Trindade, A.V.; Lins, G.M.L. & Maia, I.C.S. 2003. Substrato e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura** **25**: 137-142.
- Trindade, A.V.; Vildoso, C.I.A.; Muchovej, R.M.C. & Costa, L.M. 1996. Interação de composto de lixo urbano e fungos micorrízicos na nutrição e crescimento do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** **20**: 199-208.
- Tulio, M.; Pierandrei, A.; Salermo, A. & Rea, E. 2003. Tolerance to cadmium of vesicular arbuscular mycorrhiza spores isolated from a cadmium-polluted and unpolluted soil. **Biology and Fertility of Soils** **37**: 211-214.
- del Val, C.; Barea, J.M. & Azcón-Aguilar, C. 1999. Assessing the tolerance to heavy metals of arbuscular mycorrhizal fungi isolated from sewage sludge-contaminated soils. **Applied Soil Ecology** **11**: 261-269.
- Vallinni, G.; Pera, A.; Avio, L.; Valdrighi, M. & Giovannetti, M. 1993. Influence of humic acids on laurel growth, associated rhizospheric microorganisms, and mycorrhizal fungi. **Biology and Fertility of Soils** **16**: 1-4.
- Van Cleve, K.; Coiné, P.I.; Goodwin, E.; Johnson, C. & Kelley, M. 1979. A comparison of four methods for measuring respiration in organic material. **Soil Biology and Biochemistry** **11**: 237-246.
- Van der Heidjen, E.W. & Kuyper, T.W. 2001. Does origin of mycorrhizal fungus or mycorrhizal plant influence effectiveness of the mycorrhizal symbiosis? **Plant and Soil** **230**: 161-174.

- Varela-Castejón, C.; González-Penalta, B.; Vilarinho, A. & Sainz, M.J. 1998. Fluorescent light inhibits the germination of propagules on the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum*. **Soil Biology and Biochemistry** **30**: 1845-1847.
- Varshney, A.; Sharma, M.P.; Adholeya, A.; Dhawan, V. & Srivastava, P.S. 2002. Enhanced growth of micropropagated bulblets of *Lilium* sp. inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi at different P fertility levels in an alfisol. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology** **77**: 258-263.
- Vasconcelos, C.A.; Figueiredo, A.P.H.D.; Franca, G.E.; Coelho, A.M. & Bressan, W. 1998. Manejo do solo e a atividade microbiana em latossolo vermelho-escuro da Região de Sete Lagoas, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **32**: 1897-1905.
- Vasconcellos, M.A.S. 1991. **Biologia Floral do maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand.) nas condições de Botucatu-SP**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Vasconcellos, M.A.S. 2000. Maracujazeiro doce: sistema de produção. **Informe Agropecuário** **21**: 76-80.
- Vasconcellos, M.A.S.; Brandão Filho, J.U.T. & Vieites, R.L. 2001a. Maracujá-doce. Pp.33-49. In: C.H. Bruckner; M.C. Picanço (eds.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agro-indústria, mercado**. Editora Conco Continentes, Porto Alegre.
- Vasconcellos, M.A.S.; Cereda, E.; Andrade, J.M.B. & Brandão Filho, J.V.T. 1993. Desenvolvimento de frutos do maracujazeiro 'doce' (*Passiflora alata* Dryand) nas condições de Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura** **15**: 153-158.
- Vasconcellos, M.A.S. & Duarte Filho, J. 2000. Ecofisiologia do maracujazeiro. **Informe Agropecuário** **21**: 25-28.
- Vasconcellos, M.A.S.; Savazaki, E.T.; Grassi Filho, H.; Busquet, R.N.B. & Mosca, J.L. 2001b. Caracterização física e quantidade de nutrientes em frutos de maracujazeiro-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura** **23**: 690-694.
- Vassilev, N.; Vassileva, M.; Azcon, R.; Fenice, M.; Federici, F. & Barea, J.M. 1998. Fertilizing effect of microbially treated olive wastewater on *Trifolium* plants. **Bioresource Technology** **66**: 133-137.
- Vejsadová, H. 1992. The influence of organic and inorganic fertilization on development of indigenous VA fungi in roots of red clover. Pp. 406-407. In: D. J. Read; D.H. Lewis; A.H. Fitter & I.J. Alexander (eds.). **Mycorrhizas in Ecosystems**. CAB International, Wallingford.

- Veras, M.C.M.; Pinto, A.C.Q. & Meneses, J.B. 2000. Influência da época de produção e dos estádios de maturação nos maracujás doce e ácido nas condições de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **35**: 959-966.
- Verma, R.K. & Arya, I.D. 1998. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates and organic matter on growth and mycorrhization of micropropagated *Dendrocalamus asper* plantlets and on spore production in their rhizosphere. **Mycorrhiza** **8**: 113-116.
- Vestberg, M. 1992. The effect of growth substrate and fertilizer in the growth and vesicular-arbuscular mycorrhizal infection of three hosts. **Agriculture Science in Finland** **1**: 95-105.
- Vilariño, A.; Frei, B. & Shüepp, H. 1997. MES [2-(N-morphiline)-ethanesuphonic acid] buffer promotes the growth of external hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in alkaline sand. **Biology and Fertility of Soils** **25**: 79-81.
- Vilariño, A. & Sainz, M.J. 1997. Treatment of *Glomus mosseae* propagules with sucrose increases spore germination and inoculum potential. **Soil Biology and Biochemistry** **29**: 1571-1573.
- Vivas, A.; Vöros, A.; Biró, B.; Barea, J.M.; Ruiz-Lozano, J.M. & Azcón, R. 2003a. Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp. in improving plant tolerance to Cd contamination. **Applied Soil Ecology** **24**: 177-186.
- Vivas, A.; Vöros, A.; Biró, B.; Campos, E J.M.; Barea, J.M. & Azcón, R. 2003b. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. **Environmental Pollution** **126**: 179-189.
- Voet, D.; Voet, J.G. & Pratt, C.W. 2002. **Fundamentos de Bioquímica**. Ed. Artmed, Porto Alegre, 931p.
- Vosatka, M.; Gryndler, M. & Prikryl, Z. 1992. Effect of the rhizosphere bacterium *Pseudomonas putida*, arbuscular mycorrhizal fungi and substrate composition on the growth of strawberry. **Agronomie** **12**: 859-863.
- Wagner, G.H. & Wolf, D.C. 1998. Carbon transformation and soil organic matter formation. Pp. 218-258. In: D. M. Sylvia; J. J. Fuhrmann; P. G. Hartel & D. A. Zubeber (eds.). **Principles and applications of soil microbiology**. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- Walley, F.L. & Germida, J.J. 1995. Estimating the viability of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal species using tetrazolium salts as vital salt. **Mycologia** **87**: 273-279.

- Wamberg, C.; Christensen, S.; Jakobsen, J.; Müller, A.K. & Sørensen, S.J. 2003. the mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). **Soil Biology and Biochemistry** **35**: 1349-1357.
- Wander, M. 2004. Soil organic matter fractions and their relevance to soil function. Pp. 67-102. In: F. Magdoff & E.R. Weil (eds.). **Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture**. CRC Press, Florida.
- Wang, C.L. & Tschen, J.S.M. 1994. Production of mycorrhizal inoculum by soilless culture. **Journal of the Agricultural Association of China** **167**: 50-60.
- Warner, A. 1984. Colonization of organic matter by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Transactions of the British Mycological Society** **82**: 352-354.
- Warner, A. 1983. Re-establishment of indigenous vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after topsoil storage. **Plant and Soil** **73**: 387-394.
- Watrud, L.S.; Heithacus, J.J. & Jaworski, E.G. 1978. Evidence for production of inhibitor by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Mycologia** **70**: 821-828.
- Weissenhorn, I.; Leyval, C. & Berthelin, J. 1993. Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. **Plant and Soil** **157**: 247-256.
- Weissenhorn, I.; Glashoff, A.; Leyval, C. & Berthelin, B. 1994. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soil. **Plant and Soil** **167**: 189-196.
- Werner, M.R. 1997. Soil quality characteristics during conversion to organic orchard mangement. **Applied Soil Ecology** **5**: 151-167.
- Werner, M.R.; Kluson, R.A. & Gleissman, S.R. 1990. Colonization of strawberry root by VA mycorrhizal fungi in agroecosystems under conventional a trasitional organic management. **Biological Agriculture and Horticulture** **7**: 139-151.
- Wilson, G.W.T.; Hetrick, B.A.D. & Kitt, D.G. 1989. Supression of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spore germination by nonsterile soil. **Canadian Journal of Botany** **67**: 18-23.
- Wilson, J.M. & Trinick, M.J. 1982. Factors affecting the estimation of numbers of infective propagules of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi by the most probable number method. **Australian Journal of Soil Research** **21**: 73-81.
- Wood, T. 1991. VA mycorrhizal fungi: challenges for commercialization. Pp. 823-847. In: D.K. Arora; B.Rai; K.G. Mukerji; G.R. Knudsen (eds.). **Handbook of Applied Mycology**. Marcel Dekker, Inc. New York.

- Wright, S.F. 2000. A fluorescent antibody assay for hyphae and glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** **226**: 171-177.
- Wright, S.F. & Anderson, R.L. 2000. Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the Central Great Planus. **Biology and Fertility of Soils** **31**: 249-253.
- Wright, S.F.; Franke-Snyder, M.; Morton, J.B. & Upadhyaya, A. 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. **Plant and Soil** **181**: 193-203.
- Wright, S.F. & Jawson, L. 2001. A pressure cooker method to extract glomalin from soils. **Soil Science Society American Journal** **65**: 1734-1735.
- Wright, S.F. & Nichols, K.A. 2002. Glomalin: hiding place for a third of the world's stored soil carbon. **Agriculture Research** **50**: 4-7.
- Wright, S.F.; Starr, J.L. & Paltineanu, I.C. 2000. Change in aggregate stability and concentration of glomalin during tillage management transition. **Soil Science Society American Journal** **63**: 1825-1829.
- Wright, S.F. & Upadhyaya, A. 1998. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil** **198**: 97-107.
- Wright, S.F. & Upadhyaya, A. 1996. Extraction of an abundant and unusual protein from soil and comparision with hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science** **161**: 575-586.
- Wright, S.F. & Upadhyaya, A. 1999. Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. **Mycorrhiza** **8**: 283-285.
- Wright, S.f.; Upadhyaya, A. & Buyer, J.S. 1998. Comparision of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis. **Soil Biology and Biochemistry** **30**: 1853-1857.
- Wu, C.G.; Liu, Y.S. & Hung, L.L. 1995. Spore development of *Entrophospora kentinensis* in an aeroponic system. **Mycologia** **87**: 582-587.
- Wuest, S.B.; Caesar-TonThat, T.C.; Wright, S.F. & Williams, J.D. 2005. Organic matter additon, N, and residue burning effects on infiltration biological and physical properties of an intensively tilled silt-loam soil. **Soil and Tillage Research** **84**: 154-167.
- Yano-Melo, A.M.; Sággin-Júnior, O.J.; Lima-Filho, J.M.; Melo, N.F. & Maia, L.C. 1999. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the acclimatization of micropropagated banana plantlets. **Mycorrhiza** **9**: 119-123.

- Yano-Melo, A.M.; Saggin-Júnior, O.J. & Maia, L.C. 2003. Tolerance of mycorrhized banana (*Musa* sp. cv. Pacovan) plantlets to saline stress. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **95**: 343-348.
- Zabir, Z. & Koide, R.T. 2000. The effect of dandelion or a cover crop on mycorrhiza inoculum potential soil agregation and yield of maize. **Agriculture, Ecosystems and Environment** **78**: 167-174.
- Zambolim, L.; Reis, M.A. & Costa, L.M. 1992. Substratos para multiplicação do fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Glomus etunicatum*. **Fitopatologia Brasileira** **17**: 28-31.
- Zenke, J.M.; Pereira, F.; Lovato, P.E. & Silva, A.L. 2003. Avaliação de substratos para inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de videira micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** **11**: 1309-1315.
- Zibilske, L. M. 1998. Composting of organic wastes. Pp. 218-258. In: D. M. Sylvia; J. J. Fuhrmann; P. G. Hartel & D. A. Zubeber. **Principles and Applications of Soil Microbiology**. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- Zhu, Y-C. & Miller, R.M. 2003. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil systems. **Trends in Plant Science** **8**: 407-409.

Capítulo 2

*Production and infectivity of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi multiplied
in a substrate supplemented with Tris-HCl buffer*

Artigo enviado para publicação no periódico Mycorrhiza

Production and infectivity of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi multiplied in a substrate supplemented with Tris-HCl buffer

Fábio Sérgio Barbosa da Silva, Adriana Mayumi Yano-Melo, Leonor Costa Maia*

Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia,
50670-420, Recife, PE, Brasil

*Corresponding author – Tel.: 55-81-21268865; Fax: 55-81-21268482; e-mail address:
leonorcmaia@yahoo.com.br. Proofs should be sent to: L.C.Maia, Depto. de Micologia, CCB,
UFPE, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Production and infectivity of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi supplemented with Tris HCl buffer

Abstract

The organic buffers, by maintaining stable the hydrogenionic concentration, as well as by its stimulatory capability, constitute an alternative for increasing the production of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). The effect of adding Tris-HCl buffer on production and infectivity of AMF inoculum was investigated in a greenhouse experiment using separately 50 spores of *Glomus etunicatum*, *Gigaspora albida*, *Scutellospora heterogama* and *Acaulospora longula* which were inoculated in containers with sand and vermiculite (1:1 v:v) and *Panicum miliaceum*. The containers were irrigated with nutrient solution supplemented with 0, 10, 25, 50 and 75 mM of Tris-HCl (pH 6.5). After 85 days, production of spores was evaluated and the increment compared with the initial inoculum. Infectivity of the inoculum that presented higher production of spores was evaluated by the method of mean percentage of infection, using corn as the host, on two occasions: a) soon after being produced; and b) after 120 days of storage at 4 °C and 28 °C. Responses to buffer solutions differed: *S. heterogama* was not benefited, while sporulation of *G. etunicatum* was improved in solution with 10 mM buffer. Solution with 75 mM HCl buffer increased significantly sporulation of *G. albida* (65.10 spores g⁻¹ substrate), when comparing with that of the control (33.09 spores g⁻¹ substrate). Maximum production of spores of *A. longula* was obtained in the treatments receiving 50 mM (43.80 spores g⁻¹ substrate) and 75 mM (35 spores g⁻¹ substrate) of buffer. The infective potential of *G. albida* was not affected by storage, while that of *A. longula* decreased when the inoculum was maintained at 28 °C. The infectivity of *G. etunicatum* increased after storage, mainly at 4 °C, what suggests that the inoculum of this species is benefited by storage at low temperature.

Key words: mycorrhiza, organic buffer, storage, sporulation, viability.

Introduction

The mycorrhizal association favours growth of the host plant by improving its nutritional status, being relevant for economically important crops and for the general maintenance of the terrestrial ecosystems, contributing for the carbon and phosphorus cycles (Sanders et al. 1996).

Due to the obligate biotrophism, the production of inoculant is one of the obstacles for application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to benefit plant crops of economic importance. Among the methods for inoculum production, one is cultivation in sand and vermiculite, supplemented with nutrient solutions containing organic buffers in its formulation; this allows for high production of spores (Millner and Kitt 1992).

The presence of H^+ ions alters the enzymatic activity (Lowenstein 1993), and can reduce the rhizospheric pH by about 0.5 units (Bagshaw et al. 1972) by the secretion or absorption of cations in the growth medium (Griffin 1994), as well as by the reaction of CO_2 with water (Taiz and Zeiger 1998). Organic buffers have the property of minimizing the alterations of the H^+ ion concentration and are used for maintaining the pH of the growth media for AMF (Gryndler et al. 1998; Pawlowska et al. 1999). The effect of a buffer on the growth of AMF depends on its constitution (Carr 1991; Pawlowska et al. 1999) and concentration in the growth medium (Masoro and Siegel 1979).

Research related with utilization of organic buffers for maintenance of pH and for stimulating mycelial growth are restricted to a few species of AMF, mostly *Glomus* Tulasne & Tulasne (Douds Jr. 1997; Pawlowska et al. 1999). Vilariño et al. (1997) related the efficiency of the MES buffer with the presence of soil microorganisms that solubilize the sulfur present in the structure of this buffer, favouring, in that way, the growth of the external mycelium of *Glomus intraradices* Schenck & Smith. Low concentrations of the MES (0.9 mM) and Bis-tris (1 mM) buffers allowed higher mycelial growth of *Glomus fistulosum* Skou & Jakobsen, cultivated together with corn transformed roots (Gryndler et al. 1998).

The AMF inoculum should be produced in high density, and maintain the infectivity and effectivity for a long period of time. Although not much information regarding storage of AMF is available (Sylvia 1999), it is recommended the maintenance of the inoculum in the conditions under which it was produced (INVAM 2001). It has also been mentioned that maintenance of AMF inoculum at low temperature stimulates germination and spore development (Talukdar and Germida 2001; Wagner et al. 2001); however, the ideal temperature for storage of each AMF isolate should be determined.

In this work the most suitable concentrations of Tris-HCl buffer for production of spores of AMF and for maintenance of the infectivity of the inoculum, under different temperatures, were investigated.

Material and methods

Experiment 1. Effect of addition of Tris-HCl buffer on production of spores of AMF.

Seeds of *Panicum miliaceum* L. (50 per pot) were disinfected with Sodium Hypochlorite (0.5% / 10 min) and washed with distilled water before being planted. The substrate used was washed river sand (pH_{H2O} 7.1) and vermiculite of medium granulation (1:1 v/v). Both were autoclaved (30 min. / 1 atm / 120 °C), in two consecutive days, and used 15 days after sterilized. The experimental design was entirely at random in a factorial arrangement of 4 species of AMF × 5 concentrations of Tris-HCl buffer, with 5 replicates (100 experimental units). Spores of *Glomus etunicatum* Becker and Gerd. (UFPE 06), *Gigaspora albida* Schenck and Smith (UFPE 01), *Scutellospora heterogama* (Nicol. and Gerd.) Walker and Sanders (UFPE19) and *Acaulospora longula* Spain and Schenck (UFPE 21) were inoculated as suspensions (50 spores of each AMF), in plastic pots (400 mL) with 300 g of substrate, below the host seeds. The pots were maintained in a greenhouse for 85 days; temperature (T_{min.} 22.81 °C; T_{max.} 32.39 °C), humidity (RH_{min.} 45.62 %; RH_{max.} 81.13 %) and light were not controlled. The pots were irrigated every other day with nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950 modified by Jarstfer and Sylvia 1992) supplemented with 0, 10, 25, 50 or 75 mM of Tris – HCl buffer (pH 6.5), and every seven days received deionized water to avoid salt accumulation. The experiment was evaluated 85 days after the inoculation, due to the flowering time of the host plant. The AMF spores were extracted from the soil by wet sieving (Gerdemann and Nicolson 1963) and sucrose centrifugation (Jenkins 1964), placed on Petri dishes and quantified using a stereomicroscope.

Experiment 2. Evaluation of the infectivity of the AMF inoculum produced in a substrate irrigated with nutrient solution supplemented with Tris-HCl buffer.

The infectivity potential of the inoculum produced in the first experiment was evaluated by the MIP method – mean percentage of infection (<http://invam.caf.wvu.edu/Myc-info/Methods/Assays/Mip.htm> 2001). The inocula with higher density of spores per gram of substrate, were chosen for this assay (inoculum of *G. albida* produced in 75 mM, *A. longula* in 50 mM and *G. etunicatum* in 10 mM of the Tris-HCl). The inoculum consisted of spores, hypha and colonized roots. The experimental design was entirely at random in a factorial arrangement of 3 sources of inoculum × 3 treatments of storage and 4 replicates (36

experimental units). The infectivity of each inoculum was estimated before and after storage for 120 days, at 28 °C (room temperature) and at 4 °C (refrigerator). Samples of the material produced in the first experiment were diluted (1:10 v/v) with sand, and cultivated with corn (*Zea mays* L. cv Assum preto). After 30 days, roots were clarified and stained with Trypan blue (0.05%) in lactoglycerol (Phillips and Hayman 1970); the percentage of colonization was estimated by the intersect method (Giovannetti and Mosse 1980). The pots were maintained in a greenhouse for 30 days after seedling emergence. The inoculum was considered viable, from the commercial point of view, when roots of the host presented at least 25% of mycorrhizal colonization (INVAM 2001; Sylvia 2001). For both experiments the data were transformed ($\sqrt{x + 0.5}$) for variance analysis and the means compared by Tukey (for sporulation) and LSD at 5% probability (for infectivity), using the Statistica Program (Statsoft 1997).

Results

Experiment 1 - Different responses on sporulation of the AMF were found in relation to buffer concentrations (Table 1), except for *S. heterogama*. The incorporation of >10 mM of Tris-HCl to the substrate favoured the sporulation of *G. etunicatum*. *Gigaspora albida* presented significant increase on sporulation when the substrate received concentrations higher than 25 mM of buffer. Maximum production of spores of *A. longula* was obtained in substrate receiving concentrations ≥ 50 mM of buffer.

Table 1. Production of spores (spores g⁻¹ substrate) of *Acaulospora longula*, *Gigaspora albida*, *Glomus etunicatum* and *Scutellospora heterogama* after 85 days associated with *Panicum miliaceum*, irrigated with nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950), modified by Jarstfer and Sylvia (1992) and supplemented with Tris-HCl

AMF	Concentrations de Tris-HCl (mM)				
	0	10	25	50	75
<i>A. longula</i>	11,72 bB	17,53 bB	14,23 cB	43,80 bA	35,00 bcAB
<i>G. albida</i>	33,09 bC	42,30 bBC	56,34 bAB	53,56 bAB	65,10 bA
<i>G. etunicatum</i>	104,73 aB	161,28 aA	198,44 aA	175,69 aA	292,01 aA
<i>S. heterogama</i>	4,62 bA	9,94 bA	10,80 cA	14,37 cA	15,05 cA
CV (%)	59,46				

Means followed by the same small letter (column) and capital letter (line) do not differ (P< 0.05).

The sporulation of *G. etunicatum* increased in all treatments with Tris-HCl comparing with the control (without buffer). Differently from the observed with *A. longula*, sporulation of *G. albida* was positively correlated with the increase of buffer concentrations in the nutrient solution ($P < 0.05$; $r = 0.90$). Higher production of spores was attained by *G. etunicatum*, differing from those reached by the other species in all treatments, with and without buffer. Conversely, *S. heterogama* did not multiply well, in comparison with the other fungi, independently of presence of buffer in the growth medium.

Experiment 2 – In general, the storage at 4 °C preserved the infective potential of the AMF inocula in relation to the treatment maintained at 28 °C (Table 2). The preservation of *A. longula* under environmental conditions significantly reduced the infectivity in relation to the treatment without storage. The infective potential of *G. etunicatum* increased when the inoculum was stored at 4 °C, while that of *G. albida* was not affected by the storage treatments. Although *G. albida* produced less number of spores than *G. etunicatum*, the infectivity of its inoculum was five times higher than that of the isolate of this fungus (Tables 1 and 2).

Table 2. Infectivity (%) of the inocula of AMF produced in a sand vermiculite substrate irrigated with Hoagland and Arnon nutrient solution modified and supplemented with Tris-HCl buffer, calculated at time 0 (without storage) and after maintenance for 120 days at 4 °C and at room temperature (28 °C)

Treatments	Inocula		
	GA	AL	GE
	75 mM	50 mM	10 mM
Without storage	63,14a	23,24a	11,36b
4 °C	61,82a	18,81ab	27,58a
28 °C	63,35a	7,31b	14,61b
CV (%) 38,10			

Discussion

The benefit of adding low concentrations of buffers in the medium, for sporulation of AMF was mentioned for some *Glomus* species. Douds Jr. (1997) observed that 10 mM of Tris favoured the germination and the mycelial growth of *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerdemann) Gerdemann & Trappe. Similarly, Karandashov et al. (2000) obtained high

production of extraradical mycelium and spores of *Glomus caledonium* (Nicolson & Gerdemann) Trappe & Gerdemann by adding 10 mM of MES buffer in a medium with transformed carrot roots. Using a concentration of 51 mM of the same buffer, Vilariño et al. (1997) obtained high production of infective propagules of *Glomus intraradices* in relation to the control treatment; however, the authors did not test other concentrations.

The production of spores of *G. etunicatum* using 10 mM of Tris-HCl buffer was higher than that mentioned in other methods. Millner and Kitt (1992) obtained approximately 235 spores g⁻¹, using soil inoculum with 2000 spores and irrigating the culture with nutrient solution + 0.5 mM of MES. This treatment resulted in an increment of 17.05×10^3 %. In the present work 161 spores g⁻¹ were obtained; however, the efficiency of the system was superior than those obtained by the other authors, considering that the increment was up to 96.6×10^3 % in relation to the initial inoculum. Although the concentration of the MES buffer applied in the experiment of Millner and Kitt (1992) was lower than the concentration of the Tris-HCl buffer in this experiment, the cost for spore production was higher, due to the price of MES buffer relative to Tris-HCl.

The addition of Tris-HCl to the nutrient solution neither inhibit or stimulated the sporulation of *Scutellospora heterogama*. On the other hand, a high amount of auxiliary cells was observed in the pots irrigated with solution receiving buffer. The benefits of adding buffer would probably be more evident with the continuity of the experiments, once that the values of density of spores are numerically superior than that of the control and considering also that the maximum production of auxiliary cells comes before sporulation (Morton 1993).

Species of *Gigaspora* Gerdemann & Trappe emend. Walker & Sanders form a high amount of soil biomass, when compared to other AMF (Hart and Reader 2002). This may result in high amounts of CO₂ (from respiration); the reaction of CO₂ with water reduce the pH of the rhizosphere (Taiz and Zeiger 1998). This could justify the efficiency of the buffer in higher concentrations, once that it would be needed high amounts of the buffer to make the pH stable. Conversely, *G. etunicatum* develops hypha that are thinner than those of *G. albida*, presenting lower respiration values; thus, the concentration of 10 mM would be sufficient to stabilize the alterations on [H⁺].

Species of *Gigaspora* were not successfully cultivated in aeroponic systems. The supply of nutrient solution with Tris-HCl may constitute an alternative for large scale production of this fungus. Millner and Kitt (1992) obtained high production of spores of *G. margarita* using 0.5 mM of MES in the nutrient solution; in the same way, Silva et al. (2005 “in press”) observed

high sporulation of *Gigaspora margarita* Becker & Hall when adding 50 mM of Tris-HCl to the nutrient solution.

The addition of high concentrations of the Tris-HCl buffer benefited sporulation of *A. longula*. However, this effect cannot be attributed to the stabilizing capacity of the buffer, considering that species of *Acaulospora* Gerdemann & Trappe emend. Buch usually “prefer” acidic pH (Clark 1997); *A. longula* was first described from a soil with pH 4.4 (Schenck et al. 1984). The increase on sporulation of the *A. longula* isolate can be due to the stimulatory capacity of the molecule, once that some buffers (Carr 1991), as well as some other substances (Ishii et al. 1997), may stimulate the development of the AMF. It is possible that the stimulatory effect had enhanced fast spore germination and root colonization, allowing high sporulation of the fungus in the period of the experiment. Assays to study germination and root colonization, under these conditions, are needed to prove this hypothesis.

There are recommendations for preservation of the inoculum in the conditions under which it was produced (Louis and Lim 1988; Morton 1994). However, for inoculum produced in tropical conditions, as in this work, the maintenance at 4 °C was better for preserving the infective potential of the tested AMF, in comparison with storage at environmental temperature (28 °C). This can be due to the uniformity of germination (Safir et al. 1990), as well as to higher longevity of the structures at low temperatures, when metabolism is reduced. The results obtained agree with those that recommend maintenance of AMF inoculum at low temperatures (Gemma and Koske 1988; Talukdar and Germida 2001). Juge et al. (2002) mentioned that low temperatures can reduce the mortality of spores.

The only infective unit of Gigasporaceae is the spore (Bierman and Linderman 1983), which is more resistant than the hypha (Tommerup 1988; Staddon and Fitter 2001). This may explain why spores of *G. albida* maintained its infectivity after storage. Decrease of colonization by *A. longula* after 120 days at room temperature could be explained by loss of hyphal viability as well as to the dormancy of the spores, a characteristic of the genus *Acaulospora* (Tommerup 1983; Douds and Schenck 1991).

Wagner et al. (2001) observed increase in number of infective propagules of *Glomus claroideum* Schenck & Smith when stored at 4 °C in comparison with maintenance at room temperature (24 °C). In this work, the increase on infectivity of *G. etunicatum* maintained at 4 °C might be related to inactivation of inhibitors or activation of germination promoters as suggested by Tommerup (1987) and Louis and Lim (1988).

The higher infectivity of *G. albida* may be related to the high number of germinative hypha that are formed by its spores, as already observed (Maia et al. 1994). Another fact that could

be considered is the intrinsic infective potential of the isolate of *G. etunicatum* which can be low in comparison with that of *G. albida*. The reason for the results obtained in this work cannot be clearly defined considering the differences between the isolates, but it is possible to suggest that *G. etunicatum* is investing more in spore production, in order to ensure the dispersion of the species while *G. albida*, by forming bigger spores in lower number, is investing mostly on germination and root colonization, to ensure survival of the species. Similar results were mentioned by Gazey et al. (1992), comparing the sporulation of *Acaulospora* species: *Acaulospora laevis* Gerdemann & Trappe, characterized by its big spores, produced lower number of spores than *Acaulospora* sp. (VUM18), which formed smaller spores. Different life strategies among genera of AMF were observed by Hart and Reader (2002), in studies of the intraradicular and extraradicular mycelium formed by species of *Acaulospora*, *Gigaspora* and *Glomus*, that would be related with the success in the propagation of each one of the species. Future research should be done in order to clarify general aspects related to the biology of species of AMF.

Only *G. albida* and *G. etunicatum* attained the quality control patterns for production of commercial inoculum, forming at least 25% of mycorrhizal colonization (INVAM 2001; Sylvia 2001). Production in large scale of inoculum of these isolates can be obtained by using the methods here described, which include addition of Tris-HCl buffer in the nutrient solution and storage at 4 °C.

Acknowledgements

Thanks are due to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), for providing a PhD scholarship for the first author, and to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support, and research and DCR grants to the 2nd and 3th authors, respectively). Special thanks to Dr. David Douds Jr. for valuable suggestions in the content and corrections of the English text.

References

- Bagshaw R, Vaidyanathan LV, Nye PH (1972) The supply of nutrient on by diffusion to plant roots in soil. VI. Effects of onion plant on pH and phosphate desorption characteristics in a sandy soil. Plant Soil 37: 627-639
- Bierman B, Linderman R.G. (1983) Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. New Phytol. 95: 97-105

- Carr GR (1991) Use of zwitterionic hydrogen ion buffers in media for growth tests of *Glomus caledonium*. Soil Biol. Biochem. 23: 205-206
- Clarck RB (1997) Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization and host plant growth and mineral acquisition at low pH. Plant Soil 192: 15-22
- Douds Jr DD, Schenck NC (1991) Germination and hyphal growth VAM fungi during and after storage in soil at 5 matric potentials. Soil Biol. Biochem. 23: 177-183
- Douds Jr DD (1997) A procedure for the establishment of *Glomus mosseae* in dual culture with Ri- T- DNA transformed carrot roots. Mycorrhiza 7: 57-61
- Gazey C, Abbott LK, Robson AD (1992) The rate of development of mycorrhizas affects the onset of sporulation and production of external hyphae by two species of *Acaulospora*. Mycol. Res. 96: 643-650
- Gemma JN, Koske RE (1988) Seasonal variation in spore abundance and dormancy of *Gigaspora gigantea* and in mycorrhizal inoculum potential of a dune soil. Mycologia 80: 211-216
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans. Br. Mycol. Soc. 46: 235-244
- Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytol. 84: 489-500
- Griffin DH (1994) Fungal Physiology. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Gryndler M, Hrselova H, Chvatalova I, Vosatka M (1998) *In vitro* proliferation of *Glomus fistulosum* intraradical hyphae from mycorrhizal root segments of maize. Mycol. Res. 103: 1067-1073
- Hart MM, Reader RJ (2002) Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol. 153: 335-344
- INVAM (2001) <http://invam.caf.wvu.edu/Myc-Info/Methods/assays/MIP.htm>
- Ishii T, Narutaki A, Sawada K, Aikawa J, Matsumoto I, Kazuomi K (1997) Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in bahia grass (*Paspalum notatum* Flüggé) roots. Plant Soil 196: 301-304
- Jarstfer AG, Sylvia DM (1992) Inoculum production and inoculation strategies for vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. In: Blaine Meeting F (ed) Soil Microbial Ecology. Application in Agricultural and Environmental Management. Marcel Decker, New York, pp. 349-369
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Pl. Dis. Rep. 48: 692

- Juge C, Samson J, Bastien C, Vierheilig H, Coughlan A, Piché Y (2002) Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza* 13: 37-42
- Karandashov V, Kuzovina I, Hawkin H-J, George E (2000) Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. *Mycorrhiza* 10: 23-28
- Louis I, Lim G (1988) Effect of storage inoculum on spore germination of a tropical isolate of *Glomus clarum*. *Mycologia* 80: 157-161
- Lowenstein J (ed) (1993) Acid and Basics: a guide for understanding acid-base disorders. Oxford University Press, New York
- Maia LC, Kimbrough JW, Benny GL (1994) Ultrastructure of spore germination in *Gigaspora albida* (Glomales). *Mycologia* 86: 343-349
- Morton JB (1993) Properties of infective propagules at the suborder level (Glomineae versus Gigasporineae). *Invam Newsletter* 3
- Morton JB (1994) Storage of fungal propagules, dead or alive. *Invam Newsletter* 4
- Masoro EJ, Siegel PD (eds) (1979) Equilíbrio ácido básico. Interamericana, Rio de Janeiro
- Millner PD, Kitt DG (1992) The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 2: 9-15
- Pawlowska TE, Douds DD, Charvat I (1999) *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycol. Res.* 103: 1549-1556
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55: 157-161
- Safir GR, Coley SC, Siqueira JO, Carlson PS (1990) Improvement and synchronization of VA mycorrhiza fungal spore germination by short-term cold storage. *Soil Biol. Biochem.* 22: 109-111
- Sanders IR, Clapp JP, Wiemken A (1996) The genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in natural ecosystem – a key to understanding the ecological and functioning of the mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 133: 123-134
- Schenck NC, Spain JL, Sieverding E, Howeler RH (1984) Several new and unreported vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Colombia. *Mycologia* 76: 685-699

- Silva FSB, Yano-Melo AM, Brandão JAC, Maia LC (2005) Sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi using Tris-HCl buffer addition to nutrient solutions. Braz. J. Microbiol. 36 (*in press*).
- Staddon PL, Fitter AH (2001) The differential vitality of intraradical mycorrhizal structures and its application. Soil Biol. Biochem. 33: 129-132
- Stasoft (1997) Statistica for Windows. Tulsa, USA
- Sylvia (2001) <http://dmsylvia.ifas.ufl.edu/commercial.htm>
- Sylvia DM (1999) Fundamentals and application of arbuscular mycorrhizae: A “biofertilizer” perspective. In: Siqueira JO, Moreira FMS, Lopes AS, Guilherme LRG, Faquin V, Furtini Neto AE, Carvalho JG (eds) Inter-relação Fertilidade, Biologia de solo e Nutrição de plantas. SBCS, UFLA, DCS, Lavras, pp. 705-723
- Taiz L, Zeiger E (1998) Plant Physiology. Sinauer Associates Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts
- Talukdar NC, Germida JJ (2001) Propagation and storage of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi isolated from Saskatchewan agricultural soil. Can. J. Bot. 71: 1328-1335
- Tommerup IC (1983) Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 81: 37-45
- Tommerup IC (1987) Physiology and ecology of VAM spore germination and dormancy in soil. Proceedings of the 7th NACOM, Gainesville, Florida, pp. 175-177
- Tommerup IC (1988) Long-term preservation by L-drying and storage of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 90: 585-591
- Vilariño A, Frey B, Schüepp H (1997) MES [2-(*N*-morpholine)-ethane sulphonic acid] buffer promotes the growth of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an alkaline sand. Biol. Fertil. Soil. 25: 79-81
- Wagner SC, Skipper HD, Walley F, Bridges WB (2001) Long-term survival of *Glomus claroideum* propagules from soil pot cultures under simulated conditions. Mycologia 93: 815-820

Capítulo 3

*Utilização de resíduos orgânicos na produção de inóculo e na infectividade de fungos
micorrízicos arbusculares após estocagem*

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Bioresource Technology

Utilização de resíduos orgânicos na produção de inóculo e na infectividade de fungos micorrízicos arbusculares após estocagem

Fábio Sérgio Barbosa da Silva¹; Adriana Mayumi Yano-Melo¹; Uided Maaze Tiburcio Cavalcante¹; Maryluce Albuquerque da Silva¹; Leonor Costa Maia^{1*}

¹Laboratório de Micorrizas, Depto. Micologia, CCB/UFPE, Av. Prof. Nelson Chaves, s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil. fsbsbarbosa@bol.com.br; amymelo17@hotmail.com; umaaze@hotmail.com; marylucealbuquerque@bol.com.br; leonorcmaia@yahoo.com

*Corresponding author: Leonor Costa Maia (Tel: +55-81-21268865; Fax: +55-81-21268482), e-mail address: leonorcmaia@yahoo.com.br

Resumo

Foram conduzidos três experimentos (um para cada resíduo) com o objetivo de selecionar substratos contendo resíduos orgânicos (composto orgânico, terra vegetal e esterco bovino não maturado) para a produção de inóculo infectivo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) utilizando painço como hospedeiro. O delineamento foi inteiramente casualizado, em fatorial de $4 \times 4 \times 2$: quatro proporções de resíduo (0, 10, 20 e 30 %), dois diluentes (solo e areia previamente desinfestados), quatro isolados de FMA (50 esporos/planta em suspensão de: *Glomus etunicatum*, *Scutellospora heterogama*, *Acaulospora longula* e *Gigaspora albida*), com 5 repetições. Após 50 (composto orgânico e esterco bovino) e 70 (terra vegetal) dias os esporos foram extraídos e quantificados. A infectividade dos inóculos de FMA que apresentaram maior densidade de esporos foi avaliada em duas ocasiões: a) após produção (sem estocagem); b) após estocagem por 120 dias a 4°C e a 28 °C. O resíduo composto orgânico adicionado a solo e areia proporcionou aumento de 8392 % e 240 %, na esporulação de *G. etunicatum*, respectivamente, enquanto *S. heterogama* e *A. longula* tiveram a esporulação reduzida em solo e inalterada em areia. Com terra vegetal, a esporulação de *A. longula* foi reduzida (em solo), a de *G. albida* ficou inalterada (solo e areia) e a de *G. etunicatum* estimulada. Em areia com 10% de terra vegetal, *S. heterogama* e *A. longula* tiveram aumento na esporulação de 8458 % e 4843 %, respectivamente, em relação ao tratamento sem resíduo. Quando esterco bovino foi adicionado ao solo houve redução na esporulação de todos os FMA; em areia isso ocorreu com *G. albida* e *G. etunicatum*. A manutenção dos inóculos de FMA a 28 °C não afeta a infectividade, embora as respostas sejam dependentes do substrato diluente, da fonte de matéria orgânica e do FMA testado.

Palavras chave: esporulação; estocagem; Glomeromycota; adubação orgânica.

1. Introdução

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) tem potencial para utilização biotecnológica, pois beneficiam o crescimento de culturas de interesse econômico por aumentar a absorção de nutrientes com baixa mobilidade na solução do solo, especialmente o fósforo (Bolan, 1991), o que resulta em vegetais mais tolerantes a entraves bióticos e abióticos (Azcón-Aguilar & Barea, 1997).

Apesar dos benefícios comprovados, a aplicação dos FMA na agricultura tem sido dificultada devido ao caráter biotrófico obrigatório do micobionte (Jarstfer & Sylvia, 1992), sendo necessário o estabelecimento da simbiose para que ao final do ciclo possa ocorrer elevada produção de propágulos que podem ser utilizados como fonte de inóculo. Várias metodologias têm sido propostas visando a maximização da produção de inoculante micorrízico tais como a utilização de diferentes substratos (Gaur & Adholeya, 2000), multiplicações em sistemas hidropônicos (Hawkins & George, 1997) e aeropônicos (Jarstfer & Sylvia, 1992), estabelecimento de cultivos *in vitro* com raízes transformadas (Pawlowska et al. 1999), bem como a utilização de substâncias estimuladoras do desenvolvimento dos FMA (Karandashov et al., 2000). Algumas dessas metodologias apresentam alto custo de instalação e manutenção podendo, no entanto, propiciar elevada esporulação (St-Arnaud et al. 1996), mas, com viabilidade reduzida dos propágulos (Gryndler et al. 2003).

A manutenção da infectividade do inóculo é fator limitante da qualidade do inoculante a ser comercializado e nesse aspecto, o armazenamento adequado é fundamental. Recomendações têm sido feitas para estocagem dos propágulos nas condições em que foram produzidos (Louis & Lim, 1988) ou em baixas temperaturas (Juge et al. 2002), sendo considerado viável, do ponto de vista comercial, o inóculo que produzir, nas raízes do hospedeiro, pelo menos 25% de colonização micorrízica (INVAM, 2001; Sylvia, 2001). No entanto, poucos estudos foram desenvolvidos nesta área, especialmente com FMA multiplicados em substrato com adubo orgânico, sendo necessário determinar, pontualmente, as condições de estocagem para cada inoculante de FMA.

Resíduos orgânicos são comumente empregados como adubo na horticultura e fruticultura favorecendo o desenvolvimento vegetal pelo aumento na disponibilidade de nutrientes, na capacidade tamponante e troca catiônica (Paul & Clark, 1989), bem como na melhoria da estruturação do solo (Caravaca et al. 2002). A suplementação desses resíduos no meio de propagação de inóculo de FMA aumenta a esporulação (Zambolim et al., 1992), podendo favorecer a adaptação dos isolados à adubação orgânica, condição comumente

encontrada na produtividade vegetal. Adicionalmente, efeitos benéficos da adubação sobre a infectividade (Palenzuela et al. 2002), colonização micorrízica (Mäder et al. 2000), produção de micélio extraradicular (Joner & Jakobsen, 1992) e produção de propágulos em campo (Douds Jr. et al. 1997; Gaur & Adholeya, 2005) foram registrados.

O emprego de fontes orgânicas para produção de inoculante de FMA vem sendo sugerido (Gryndler et al. 2003), porém a infectividade e as condições ideais de estocagem dos inóculos produzidos nestes sistemas não foram devidamente indicadas.

Este trabalho teve como objetivo determinar proporções e tipos de resíduos orgânicos mais eficientes para produção de inóculo de FMA, bem como avaliar a infectividade do inóculo produzido antes e após estocagem a 4 e 28 °C.

2. Material e métodos

Foram conduzidos dois experimentos: no primeiro, selecionou-se tipos de resíduos orgânicos e diluentes para produção de inóculo de FMA. No segundo, determinou-se a infectividade dos inóculos que apresentaram maior densidade de esporos, antes e após armazenamento a 4 e 28 °C por 120 dias.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, sendo utilizados dois substratos diluentes: A = areia grossa de rio, lavada e esterilizada em autoclave (120 °C, 1h) por dois dias consecutivos; B = Solo Franco-argilo-arenoso, proveniente de Camaragibe-PE desinfestado com Bromex[®] (Brometo de metila e 2% de cloropicrina) por 7 dias. Os substratos foram utilizados 15 dias após a desinfestação.

Hospedeiro – utilizou-se sementes de painço (*Panicum miliaceum* L.), desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5% por 15 min., antes de serem colocadas para germinar (Silva et al 2005, “in press”).

Isolados de FMA – esporos de *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann (UFPE 06), *Scutellospora heterogama* (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders (UFPE 19), *Acaulospora longula* Spain & Schenck (UFPE 21) e de *Gigaspora albida* Schenck & Smith (UFPE 01), provenientes de potes de culturas mantidos em casa de vegetação, tendo como hospedeiro o painço. Suspensões com 50 esporos dos FMA foram depositadas imediatamente abaixo das sementes do hospedeiro, em potes mantidos sob luz natural, com temperatura de 32,9 e 23,2°C e umidade relativa do ar de 80,3 e 45,5 % , máximas e mínimas, respectivamente.

Resíduos orgânicos – foram testados três tipos de resíduos (que constituíram experimentos independentes), sendo adicionados aos substratos A ou B nas proporções de 0, 10, 20 e 30% (v/v). Assim como o substrato diluente B, os resíduos foram desinfestados com brometo, sendo utilizados após 30 dias.

O composto orgânico (CO) foi proveniente de leiras, montadas a partir de frutas e verduras impróprias para comercialização e dispostas no pátio de compostagem da CEAGEPE/ Unidade CEASA de Pernambuco; a terra vegetal composta (TV) adquirida comercialmente (Viva o Verde[®]); e o esterco bovino não maturado (EB) coletado em estábulo do Departamento de Zootecnia, UFRPE.

Os resíduos foram passados em peneira (3 mm), desinfestados, diluídos nos substratos A e B. Amostras foram encaminhadas à Embrapa Semi-Árido para análise química (Tabela 1). Após mistura, os substratos foram deixados em repouso por 15 dias antes da utilização.

Tabela 1. Caracterização química e físico-química dos resíduos orgânicos e dos substratos diluentes, utilizados na produção de inóculo de FMA

	Resíduos orgânicos			Substratos diluentes	
	Composto orgânico	Terra vegetal	Esterco bovino	Areia	Solo
P* (mg dm ⁻³)	393,00	69,00	1026,00	88,00	4,00
Ca** (cmol _c dm ⁻³)	7,71	3,10	4,70	0,90	1,20
Mg** (cmol _c dm ⁻³)	3,40	2,20	5,10	0,60	0,40
C (g Kg ⁻¹)	43,10	33,40	222,60	2,00	13,30
N (g Kg ⁻¹)	3,80	1,20	13,10	0,30	1,20
C/N	11,34	27,86	16,99	6,66	11,08
CTC (cmol _c dm ⁻³)	12,67	13,88	12,05	3,37	1,69
pH (H ₂ O -1:2,5)	6,20	5,40	7,60	5,50	4,60

CTC= capacidade de troca catiônica; *Mehlich I; ** KCl 1M.

Irrigação – com exceção do tratamento com substrato A e sem adubação, que a partir de quinze dias após a germinação do painço foi irrigado com solução de Hoagland & Arnon, modificada (Jarstfer & Sylvia, 1992), os demais tratamentos (substratos A e B) foram irrigados, a cada dois dias, com água destilada.

Delineamento experimental – cada tipo de substrato constituiu um experimento independente, com delineamento inteiramente casualizado, em fatorial: $4 \times 4 \times 2$, sendo quatro proporções de resíduo, quatro isolados de FMA, dois substratos diluentes (solo e areia) e cinco repetições, totalizando 160 potes/experimento.

Avaliação – os experimentos foram avaliados 50 dias (composto orgânico e esterco bovino) e 70 dias (terra vegetal) após a inoculação, períodos correspondentes à floração do hospedeiro. Esporos de FMA foram extraídos dos substratos por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963) e centrifugação em água e sacarose (Jenkins, 1964), colocados em placas canaletadas e quantificados em estereomicroscópio Leica (40×).

Análise estatística – os dados de esporulação foram transformados em $\sqrt{x + 1}$ e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$); regressões polinomiais e lineares foram determinadas para os dados de esporulação dos FMA em função das proporções de resíduo, sendo ajustados modelos lineares e quadráticos utilizando-se o programa Sanest.

Avaliação da infectividade do inóculo – Do experimento anterior, utilizaram-se amostras dos inóculos produzidos com a adição de composto orgânico e terra vegetal composta, que apresentaram maior densidade de esporos, para avaliar a infectividade do inoculante. Com exceção do inóculo produzido em esterco bovino, fonte orgânica que inibiu a esporulação dos FMA, a infectividade dos inóculos de FMA foi avaliada, pelo método da percentagem média de infecção (INVAM, 2001), em experimentos com delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial, com os seguintes tratamentos:

Composto orgânico: fatorial de 4×3 , sendo quatro fontes de inóculo [*G. etunicatum*, *G. albida* e *S. heterogama*, multiplicados em solo + composto orgânico (10%) e *G. etunicatum*, multiplicado em areia + composto orgânico (10%)], três tratamentos de estocagem (não estocado e estocado por 120 dias em temperatura ambiente (28 ± 2 °C) e em refrigerador (4 ± 1 °C) e quatro repetições, totalizando 48 unidades experimentais.

Terra vegetal composta: fatorial de 3×3 , sendo três fontes de inóculo [*G. etunicatum*, *S. heterogama* e *A. longula* multiplicados em areia + terra vegetal (10%)], três tratamentos de estocagem (sem estocagem, estocado por 120 dias em temperatura ambiente (28 ± 2 °C) e em refrigerador (4 ± 1 °C) e quatro repetições, totalizando 36 parcelas experimentais.

Amostras do inóculo, constituído por esporos, hifas e raízes colonizadas, foram diluídas na proporção de 1:10 (v/v) com areia autoclavada (121°C, 1 h), utilizando-se milho (*Zea mays* L. cv. Assum Preto) como planta hospedeira. Após 30 dias foi avaliada a percentagem de colonização, utilizando-se a técnica da interseção dos quadrantes (Giovannetti & Mosse, 1980).

3. Resultados

Produção de inóculo em substratos com composto orgânico

A esporulação de *G. albida* apresentou modelo quadrático em relação às proporções de composto orgânico no solo, enquanto a produção de esporos de *S. heterogama* e de *A. longula* foi linearmente reduzida com a adição de resíduo no solo ($P \leq 0,01$) (Figura 1). Por outro lado, a adição do resíduo ao solo promoveu aumento significativo na produção de esporos de *G. etunicatum* (ca. 81 vezes), observando-se comportamento quadrático em relação às proporções de composto orgânico testadas, com ponto de máximo estimado em 17,01% de composto (Figura 1).

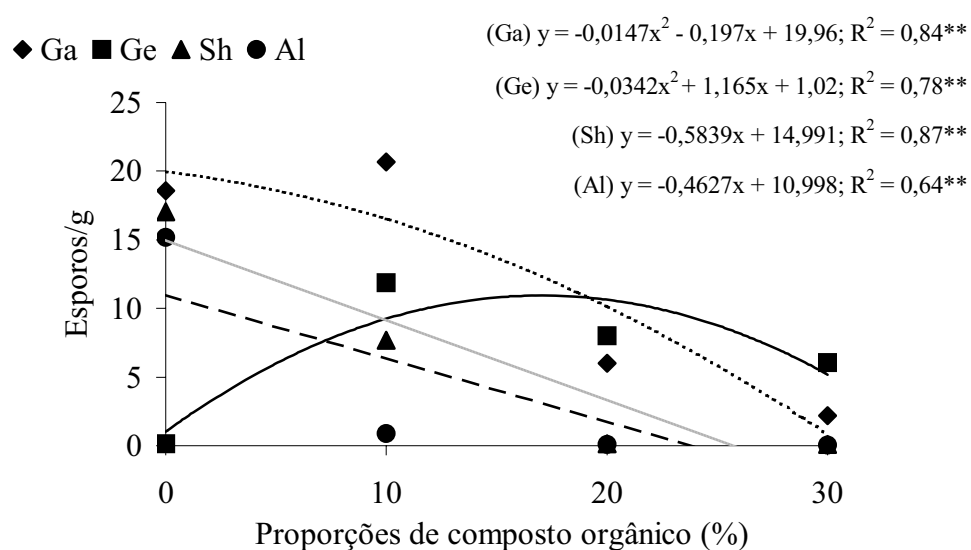


Figura 1. Produção de esporos de FMA, associados a *Panicum miliaceum*, em solo adubado com composto orgânico, 50 dias após a inoculação. ** ($P \leq 0,01$). Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*.

De modo geral a produção de inóculo foi prejudicada nos tratamentos em areia, com ou sem adição de composto orgânico, exceto em *G. etunicatum* que teve esporulação estimulada (ca.

3 vezes) pela adição de 10% do composto e diminuída nas demais proporções (20 e 30%) (Figura 2).

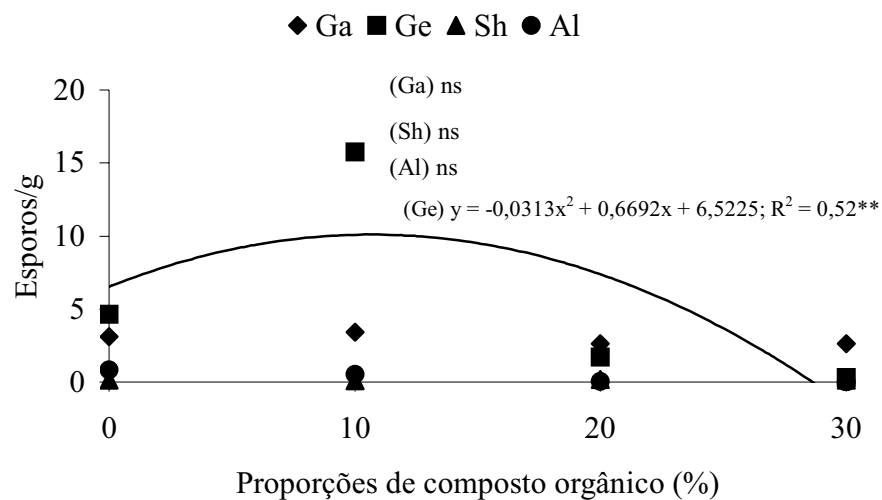


Figura 2. Produção de esporos de FMA, associados a *Panicum miliaceum*, em areia adubada com composto orgânico, 50 dias após a inoculação. ** ($P \leq 0,01$); ns (ajuste não significativo); Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*.

Produção de inóculo em substrato com terra vegetal

A esporulação de *G. etunicatum* aumentou linearmente com as proporções de terra vegetal no solo (Figura 3) e em areia (Figura 4) apresentou modelo quadrático com ponto de máximo estimado em 19% de adubação. A produção de esporos de *G. albida* não foi alterada pela adição de terra vegetal ao solo, e houve redução linear na esporulação de *S. heterogama* e *A. longula* com o aumento das proporções de resíduo (Figura 3).

Nos tratamentos em areia, a adição de terra vegetal também não alterou a esporulação de *G. albida*. Houve regressão quadrática para a esporulação de *S. heterogama* com ponto de máxima em 19,47% de resíduo. Com exceção de *G. albida* a adição de apenas 10% de resíduo propiciou aumento significativo na esporulação dos demais FMA utilizados, em relação ao controle sem adição de matéria orgânica, resultando no aumento de cerca de 79, 49 e 4 vezes para *S. heterogama*, *A. longula* e *G. etunicatum*, respectivamente (Figura 4).

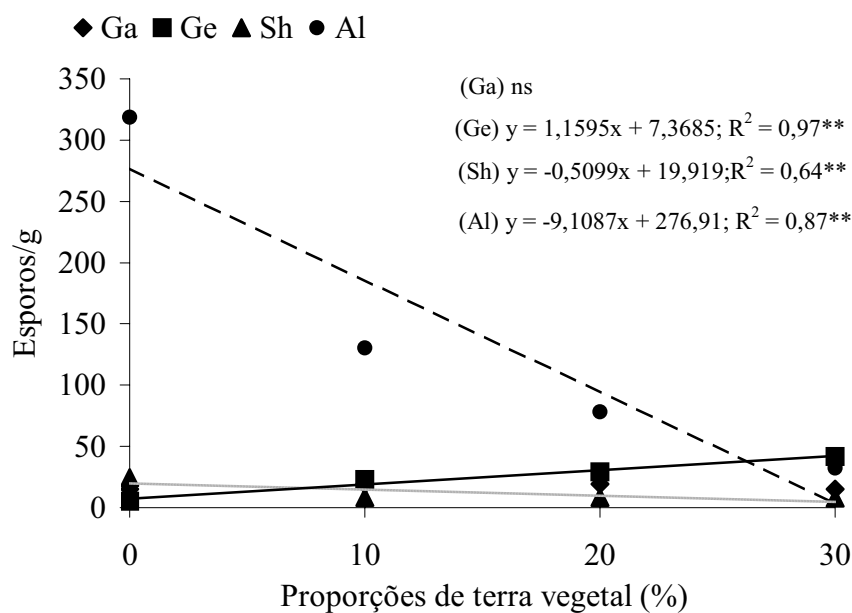


Figura 3. Produção de esporos de FMA, associados a *Panicum miliaceum*, em solo adubado com terra vegetal composta, 70 dias após a inoculação. ** ($P \leq 0,01$); ns (ajuste não significativo); Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*.

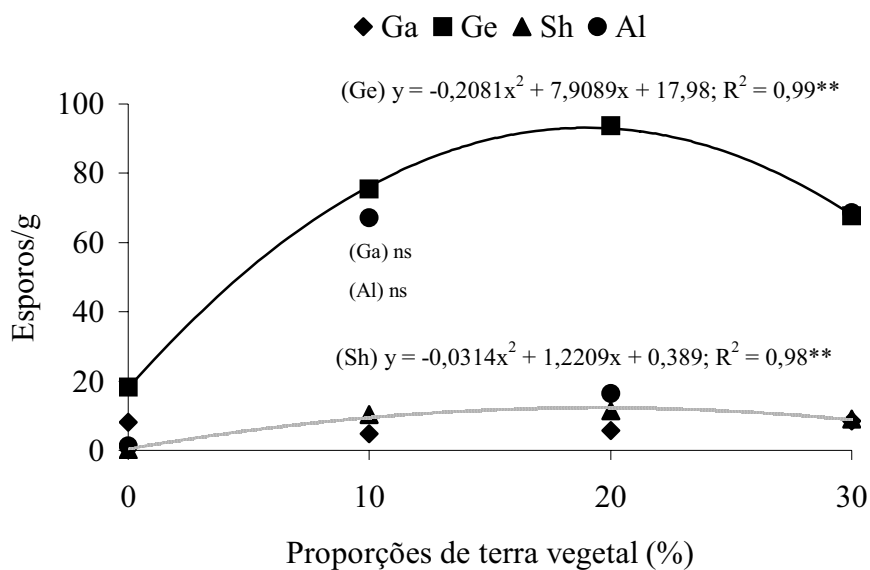


Figura 4. Produção de esporos de FMA, associados a *Panicum miliaceum*, em areia adubada com terra vegetal composta, 70 dias após a inoculação. ** ($P \leq 0,01$); ns (ajuste não significativo); Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*.

Produção de inóculo em substrato com esterco bovino não maturado

Quando o esterco bovino foi adicionado ao solo todos os FMA testados tiveram esporulação linearmente reduzida. Em areia, *G. albida* e *G. etunicatum* apresentaram o mesmo padrão, enquanto a esporulação de *S. heterogama* e *A. longula* não foi alterada pela presença do esterco (Figuras 5 e 6).

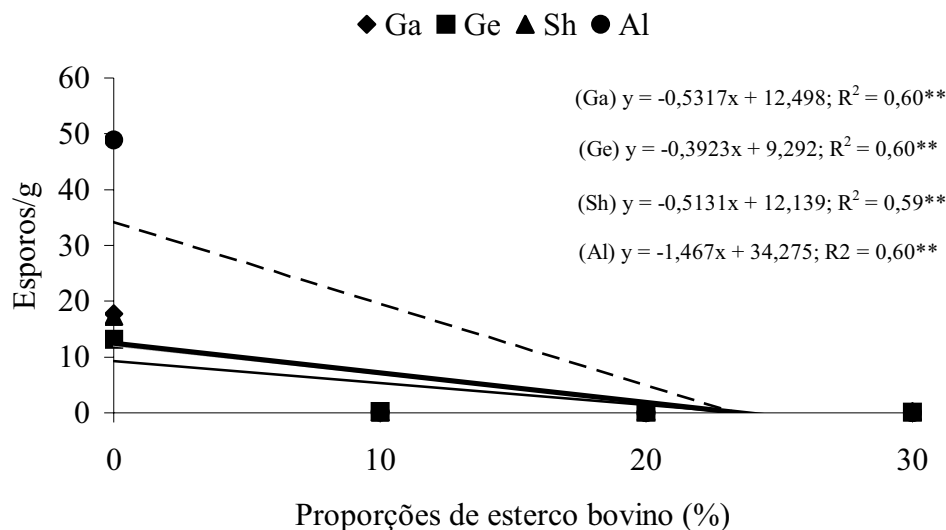


Figura 5. Produção de esporos de FMA, associados a *Panicum miliaceum*, em solo adubado com esterco bovino, 50 dias após a inoculação. ** ($P \leq 0,01$); Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*.

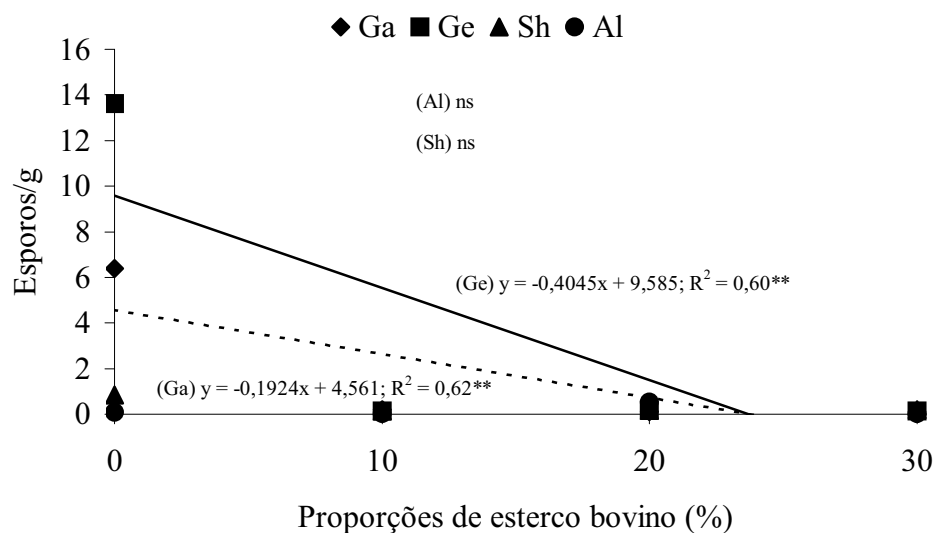


Figura 6. Produção de esporos de FMA, associados a *Panicum miliaceum*, em areia adubada com esterco bovino, 50 dias após a inoculação. ** ($P \leq 0,01$); ns (ajuste não significativo); Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*.

Ensaio de infectividade

Isolados de Gigasporaceae (*G. albida* e *S. heterogama*) multiplicados em solo com adição de 10% de composto orgânico mantiveram o potencial infectivo após estocagem a 4 °C e a 28 °C. Em contrapartida, *G. etunicatum* comportou-se de modo diferenciado em relação aos tratamentos de estocagem e substrato onde foi produzido; quando este FMA foi multiplicado em solo com 10% de composto orgânico a manutenção a 4 °C promoveu aumento no potencial infectivo em relação ao tratamento sem estocagem ou mantido em temperatura ambiente. No entanto, quando multiplicado em areia, o condicionamento a 4 °C reduziu a infectividade em relação ao tratamento sem estocagem (Tabela 2).

Tabela 2. Infectividade de inóculo de FMA, em milho, após multiplicação em substrato com 10% de composto orgânico, em solo (S) ou em areia (A), tendo como hospedeiro o painço, antes e após manutenção a 4 °C e a 28 °C, por 120 dias

Tratamentos	Infectividade (% colonização micorrízica)			
	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. etunicatum</i>	<i>G. albida</i>	<i>S. heterogama</i>
	(A)	(S)	(S)	(S)
Sem estocagem	26,67 a	23,56 b	51,80 a	2,92 a
4 °C	15,56 b	39,56 a	65,38 a	4,36 a
28 °C	18,33 ab	18,35 b	63,03 a	1,73 a
CV (%)	13,35			

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$)

Independentemente dos tratamentos de estocagem houve manutenção da infectividade do inóculo de *G. etunicatum*, *S. heterogama* e *A. longula* produzido em areia com 10% de terra vegetal composta (Tabela 3).

O inóculo de *G. albida* produzido em solo com 10% de composto orgânico e *A. longula*, *S. heterogama* e *G. etunicatum* em areia com 10% de terra vegetal não perde a infectividade mesmo após estocagem por 4 meses a 28 °C, dispensando o uso de câmaras frias ou geladeiras para armazenamento de inoculante de FMA.

Tabela 3. Infectividade de inóculo de FMA, em milho, após multiplicado em substrato com 10% de terra vegetal em areia tendo como hospedeiro painço, antes e após manutenção a 4 °C e a 28 °C, por 120 dias

Tratamentos	Infectividade (% colonização micorrízica)		
	<i>G. etunicatum</i>	<i>A. longula</i>	<i>S. heterogama</i>
Sem estocagem	11,86 a	27,14 a	2,80 a
4 °C	21,77 a	18,00 a	0,49 a
28 °C	14,42 a	34,36 a	0,70 a
C.V. (%)	31,43		

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

4. Discussão

A utilização de resíduos orgânicos não compostados pode favorecer a qualidade do solo (Pascual et al. 1999), no entanto, neste estudo, o esterco bovino não compostado reduziu a esporulação dos FMA testados. Este resultado pode ser atribuído à presença de substâncias fitotóxicas, que poderiam ser eliminadas no processo de compostagem (Kiehl, 1998), tendo em vista que, em geral, mesmo a menor proporção do esterco inibiu a esporulação dos FMA. Martín et al. (2002) observaram redução na colonização produzida por *Glomus mosseae* (Nicolson & Gerd.) Gerd. & Trappe e *G. deserticola* Trappe, Bloss & Menge em substrato constituído por resíduos de oliveiras não compostados, tendo os autores atribuído os efeitos negativos da adubação à presença de compostos fitotóxicos.

O caráter inibitório do esterco bovino sobre a esporulação dos FMA pode estar relacionado ao elevado teor de nutrientes; entre estes, o fósforo (1026 mg dm^{-3}), de reconhecido efeito inibitório sobre a produção de esporos de FMA, quando em altas concentrações no solo (Douds Jr. & Schenck, 1990). Do mesmo modo, o elevado teor de nitrogênio ($13,10 \text{ g Kg}^{-1}$) encontrado no esterco pode ter prejudicado o desenvolvimento dos fungos, considerando que este influencia o estabelecimento da simbiose, e conseqüente reprodução do fungo (Bressan, 2002). É possível que a presença de elevados teores de Mg ($5,10 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$) no esterco também tenha contribuído para reduzir a esporulação dos FMA. Jarstfer et al. (1998) observaram que altos níveis de magnésio reduziram a colonização micorrízica e a esporulação de *Glomus* sp. Tulasne & Tulasne sendo este efeito mediado pela redução do cálcio no tecido do hospedeiro.

Outro fator relevante no esterco é o caráter alcalino (pH 7,6) do resíduo, que pode ter atuado de forma negativa sobre ambos, o fungo e o hospedeiro, e consequentemente sobre a colonização e a produção de esporos, visto que o potencial hidrogeniônico afeta a associação micorrízica arbuscular (van Aarle et al. 2002).

Membros de Gigasporaceae são referidos com baixa frequência em solos submetidos à adubação orgânica (Oehl et al. 2004); no entanto, neste estudo a aplicação de terra vegetal e composto orgânico não afetou a esporulação de *G. albida* e estimulou a de *S. heterogama* (10% de terra vegetal em areia), indicando que estes FMA podem ser multiplicados nessas condições. Douds et al. (2005) verificaram que o uso de composto orgânico (1800 mg P dm⁻³) e vermiculita (1:4 v/v) favoreceu a produção de inóculo de *Gigaspora gigantea* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe.

Adubos orgânicos com elevados teores de nutrientes, especialmente P, atuam na seleção e manutenção de FMA mais eficientes (Muthukumar & Udaiyan, 2002). Espécies de *Glomus* podem apresentar elevada tolerância ao P (Carrenho et al. 2002), como observado pelos resultados obtidos com composto orgânico que apresentava 393 mg P dm⁻³ (Figuras 1 e 2).

Embora maiores médias na esporulação de *Acaulospora longula* tenham sido obtidas em solo adubado com terra vegetal quando comparado ao obtido com areia, observa-se redução linear na produção de esporos em solo com o aumento nas proporções de terra vegetal (Figura 3), fato possivelmente relacionado à melhoria na retenção de água e ao aumento nos teores de matéria orgânica nesse substrato. Esses resultados contrariam a hipótese de Bhadalung et al. (2005), os quais consideraram que a esporulação de *Acaulospora* Gerdemann & Trappe emend. Buch não é influenciada pela fertilização. Em areia, a adição de terra vegetal favoreceu esporulação deste FMA, em relação ao controle (areia sem adubo) (Figura 4); é possível que a matéria orgânica adicionada à areia estimule a propagação do fungo como relatado por St. John et al. (1983). Além disso, o caráter ácido do resíduo (pH 5,4) pode ter favorecido a esporulação dessa espécie, pois segundo Clark (1997) espécies de *Acaulospora* têm elevada propagação em meio ácido e foram registradas por Oehl et al. (2004) em áreas com manejo orgânico.

Os maiores benefícios da aplicação de terra vegetal ocorreram quando se utilizou areia como diluente, confirmando a influência da composição e da granulometria do substrato na produção de propágulos de FMA (Gaur & Adholeya, 2000); este comportamento pode ser atribuído ao aumento do teor de nutrientes, em decorrência da adubação, visto que a areia é considerada um meio inadequado para produção de inoculante (INVAM, 1994). Além disso, a

melhor aeração promovida pela areia (Morard & Silvestre, 1996), bem como o favorecimento do crescimento micelial fornecido pela matéria orgânica do adubo (Joner & Jakobsen, 1992) podem ter maximizado a esporulação de alguns dos FMA.

Gigaspora albida e *S. heterogama* apresentam apenas esporos como unidade infectiva (INVAM, 1993) e estes são mais resistentes do que as hifas presentes no inóculo (Tommerup, 1988), favorecendo desta forma a manutenção do potencial infectivo observado nos experimentos.

Espécies de *Gigaspora* Gerdemann & Trappe emend. Walker & Sanders são referidas como sendo mais sensíveis que *Scutellospora* Walker & Sanders, perdendo rapidamente o potencial infectivo após estocagem em geladeira (INVAM, 2004); no entanto, no presente estudo, ambos os FMA testados mantiveram a infectividade, podendo o adubo orgânico ter contribuído neste processo. Harinikumar & Bagyaraj (1989) observaram que a sobrevivência dos FMA entre os períodos de plantio, em sistema de rotação de culturas, foi devida à presença de esterco no substrato.

O meio de multiplicação influencia a viabilidade do inóculo de FMA (Tommerup, 1988). Quando *G. etunicatum* foi multiplicado em solo e estocado a 4 °C houve aumento na infectividade deste isolado; este comportamento pode ser atribuído à inativação de inibidores ou à ativação de promotores da germinação (Tommerup, 1987), ao aumento da sincronização do processo germinativo (Safir et al. 1990), bem como à redução na mortalidade dos esporos (Juge et al. 2002).

Em geral, observa-se declínio no potencial infectivo de FMA quando os propágulos são submetidos a longos períodos de estocagem (Ruiz-Lozano & Azcón, 1996). A redução da infectividade de *G. etunicatum* multiplicado em areia com composto e estocado a 4 °C, pode ter ocorrido por perda da viabilidade das estruturas presentes no inóculo, conforme observado também por Staddon & Fitter (2001).

Quando se utilizou areia e 10 % de terra vegetal, a esporulação foi incrementada e o potencial infectivo dos FMA permaneceu inalterado após a estocagem, fazendo deste resíduo substrato promissor para a produção de esporos. Kuszala et al. (2001) observaram que a infectividade de inóculo (na forma de suspensão de esporos e micélio) de *Glomus*, *Gigaspora* Gerdemann & Trappe emend. Walker & Sanders, *Acaulospora* Gerdemann & Trappe emend. Walker e *Scutellospora* Walker & Sanders foi mantida por até 6 meses, independentemente da temperatura de manutenção dos inóculos (18-28 °C, +4 °C, -18 °C e -80 °C).

Os inóculos de *G. etunicatum*, *G. albida* (produzidos em substrato com composto orgânico) e de *A. longula* (multiplicado em meio com terra vegetal) por produzir > 25% de colonização micorrízica, enquadram-se como viáveis para comercialização (Sylvia, 2001; INVAM, 2001).

O estabelecimento de protocolo para produção de inóculo de FMA utilizando resíduos orgânicos (10% de terra vegetal em areia e 10% de composto orgânico em solo) é alternativa viável, pois incrementa a esporulação e favorece a manutenção da infectividade dos fungos, podendo condicionar os isolados ao manejo orgânico, prática agrícola crescente que beneficia a qualidade edáfica e a agricultura sustentável.

5. Agradecimentos

A Venézio Felipe dos Santos (IPA-PE), pelo auxílio nas análises estatísticas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de Doutorado (F.S.B. Silva) e Mestrado (M.A. Silva) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de Produtividade (L.C. Maia) e DCR (A.M. Yano-Melo).

6. Referências bibliográficas

- van Aarle, I.M., Olsson, P.A., Södeström, B., 2002. Arbuscular mycorrhizal fungi respond to the substrate pH of their extraradical mycelium by altered growth and root colonization. *New Phytol.* 155, 173-182.
- Azcón-Aguilar, C., Barea, J.M., 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Sci. Hortic.* 68, 1-24.
- Bhadalung, N.N., Suwamarit, A., Dell, B., Nopamornbodi, O., Thamchaipenet, A., Rungchuang, J., 2005. Effects of long-term NP-fertilization on abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi under a maize cropping system. *Plant Soil* 270, 371-382.
- Bressan, W., 2002. Factors affecting “in vitro” plant development and root colonization of sweet potato by *Glomus etunicatum* Becker & Gerd. *Braz. J. Microbiol.* 33, 31-34.
- Bolan, N.S., 1991. A critic review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphate by plants. *Plant Soil* 134, 189-207.

- Caravaca, F., Hernández, F., Garcia, C., Roldán, A., 2002. Improvement of rhizosphere aggregate stability of afforested semiarid plants species subjected to mycorrhizal inoculation and compost addition. *Geoderma* 108, 133-144.
- Carrenho, R., Silva, E.S., Trufem, S.F.B., Bononi, V.L.R., 2001. Sucessive cultivation of maize and agricultural practices on root colonization, number of spores and species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Braz. J. Microbiol.* 32, 262-276.
- Clarck, R.B., 1997. Arbuscular mycorrhizal adaptation, spore germination, root colonization, and host growth and mineral acquisition at low pH. *Plant Soil* 192, 15-22.
- Douds Jr., D.D., Galvez, L., Franke-Snyder, M., Reiders, C., Drinkwater, L. E., 1997. Effect of compost addition and crop rotation point upon VAM fungi. *Agric. Ecosyst. Environ.* 65, 257-266.
- Douds, D.D., Nagahashi, G., Pfeffer, P.E., Reider, C., Kayser, W.M., 2005. On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. *Bioresour. Technol.* (*in press*).
- Douds, D.D., Schenck, N.C., 1990. Relationship of colonization and sporulation by VA mycorrhizal fungi to plant nutrient and carbohydrate contents. *New Phytol.* 116, 621-627.
- Gaur, A., Adholeya, A., 2005. Diverse response of five ornamental plant species to mixed indigenous and single isolate arbuscular-mycorrhizal inocula in marginal soil amended with organic matter. *J. Plant Nutr.* 28, 707-723.
- Gaur, A., Adholeya, A., 2000. Effects of the particle size of soilless substrates upon AM fungus inoculum production. *Mycorrhiza* 10, 43-48.
- Gerdemann, J.W., Nicolson, T.H., 1964. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235- 244.
- Giovannetti, M., Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.* 84, 489-500.
- Gryndler, M., Jansa, J., Hrselová, H., Chvátalová, I., Vosátka, M., 2003. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* 22, 283-287.
- Harinikumar, K.M., Bagyaraj, D.J., 1989. Effect of cropping, fertilizers and farmyard manure on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in different crops over three consecutive seasons. *Biol. Fertil. Soils* 7, 173-175.
- Hawkins, H.J., George, E., 1997. Hidroponic culture of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* with *Linum usitatissimum* L., *Sorghum bicolor* L. and *Triticum aestivum* L. *Plant Soil* 196, 143-149.

- Jarstfer, A.G., Farmer-Koppenol, P., Sylvia, D.M., 1998. Tissue magnesium and calcium affect arbuscular mycorrhiza development and fungal reproduction. *Mycorrhiza* 7, 237-242.
- Jarstfer, A.G., Sylvia, D.M., 1992. Inoculum production and inoculation strategies for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, in: Metting, B. (Ed.), *Soil Microbial Technologies: Applications in Agriculture, Forestry and Environmental Management*, Marcel Dekker, New York, pp. 349-377.
- Jenkins, W.R., 1964. A rapid centrifugal flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis. Rep.* 48, 692.
- Joner, E.J., Jakobsen, I., 1992. Enhanced growth of external VA mycorrhizal hyphae in soil amended with straw, in: Read, D.J., Lewis, D.H., Fitter, A.H., Alexander, I.J. (Eds.) *Mycorrhizas in Ecosystems*. CAB International, Wallingford. p. 387.
- Juge, C., Samson, J., Bastien, C., Vierheilig, H., Coughlan, A., Piché, Y., 2002. Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza* 13, 37-42.
- Karandashov, V., Kuzovkina, I., Hawkin, H.J., George, E., 2000. Growth and sporulation of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonium* in dual culture with transformed carrot roots. *Mycorrhiza* 10, 23-28.
- Kiehl, E.J., 1998. *Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto*. Editado pelo autor, Piracicaba.
- Kuszala, C., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Person, V., 2001. Storage conditions for the long-term survival of AM fungal propagules in wet sieved soil fractions. *Symbiosis* 30, 287-299.
- INVAM, 1994. Culture methods and inoculum production: A reality check. *INVAM Newsletter*, 4.
- INVAM, 1993. Properties of infective propagules at the sub order level (Glomineae versus Gigasporineae) *INVAM Newsletter*, 3.
- INVAM. 2001. <http://invam.caf.wvu.edu/methods/assays/MIP.htm>. (2001).
- INVAM. 2004. <http://invam.caf.wvu.edu/methods/storage/storageindex.htm>. (2004).
- Louis, I., Lim, G., 1988. Effect of storage of inoculum on spore germination of a tropical isolate of *Glomus clarum*. *Mycologia* 80: 157-161.
- Mäder, P., Edenhofer, S., Boller, T., Wiemken, A., Niggli, V., 2000. Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biol. Fertil. Soils* 31, 150-156.
- Martín, J., Sampedro, I., García-Romera, I., García-Garrido, J.M., Ocampo, J.A., 2002. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce

- (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues. *Soil Biol. Biochem.* 34, 1769-1775.
- Morard, P., Silvestre, J., 1996. Plant injury due to oxygen deficiency in the root environment of soilless culture: A review. *Plant Soil* 184, 243-254.
- Muthukumar, T., Udaiyan, K., 2002. Growth and yield of cowpea as influenced by changes in arbuscular mycorrhiza in response to organic manuring. *J. Agron. Crop Sci.* 188, 123-132.
- Oehl, F., Sieverding, E., Mader, P., Dubois, D., Ineichen, K., Bollner, T., Wiemken, A., 2004. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia* 138, 574-583.
- Palenzuela, J., Azcón-Aguilar, C., Figueira, D., Caravaca, F., Roldán, A., Barea, J.M., 2002. Effects of mycorrhizal inoculation of shrubs from Mediterranean ecosystems and composted residue application on transplant performance and mycorrhizal developments in a desertified soil. *Biol. Fertil. Soils* 36, 170-175.
- Pascual, J.A., García, C., Hernández, T., 1999. Comparison of fresh and composted organic matter waste in their efficacy on the improvement of arid soil quality. *Bioresour. Technol.* 68, 255-264.
- Paul, E.A., Clark, F.E., 1989. *Soil Microbiology and Biochemistry*, Academic Press, San Diego.
- Pawlowska, T.E., Douds Jr, D.D., Charvat, I., 1999. *In vitro* propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum*. *Mycol. Res.* 103, 1549-1556.
- Ruiz-Lozano, J.M., Azcón, R., 1996. Viability and infectivity of mycorrhizal spores after long term storage in soils with different water potentials. *Appl. Soil Ecol.* 3, 183-186.
- Safir, G.R., Coley, S.C., Siqueira, J.O., Carlson, P.S., 1990. Improvement and synchronization of VA mycorrhiza fungal spore germination by short-term cold storage. *Soil Biol. Biochem.* 22, 109-111.
- Silva, F.S.B., Yano-Melo, A.M., Brandão, J.A.C., Maia, L.C., 2005. Sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi using Tris-HCl buffer addition to nutrient solutions. *Braz. J. Microbiol.* 36 (in press).
- Staddon, P.L., Fitter, A.H., 2001. The differential vitality of intraradical mycorrhizal structures and its implications. *Soil Biol. Biochem.* 33, 129-132.
- St-Arnaud, M., Hamel, C., Vitarin, B., Caron, M., Fortin, J.A., 1996. Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in an *in vitro* system in the absence of host roots. *Mycol. Res.* 100, 328-332.

St. John, T.V., Coleman, D.C., Reid, P.P. 1983. Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae with soil organic particles. *Ecology* 64, 957-959.

Sylvia. 2001. <http://dmsylvia.ifas.ufl.edu/commercial.htm>. (2001).

Tommerup, I.C., 1988. Long-term preservation by L-drying and storage of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 90, 585-591.

Tommerup, I.C., 1987. Physiology and ecology of VAM spores germination and dormancy in soil, in: *Proceedings of the 7th NACOM*, Gainesville, Florida. pp. 175-177.

Zambolim, L., Reis, M.A., Costa, L.M., 1992. Substratos para multiplicação do fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Glomus etunicatum*. *Fitopatol. Bras.* 17, 28-31.

Capítulo 4

*Partially purified extract of glomalin stimulates in vitro growth of
Gigaspora albida mycelia*

Artigo enviado para publicação no periódico Mycorrhiza

**Partially purified extract of glomalin stimulates *in vitro* growth of
Gigaspora albida mycelia**

Fábio Sérgio Barbosa da Silva¹; Nicácio de Oliveira Freitas¹; Adriana Mayumi Yano-Melo¹;
Michele Dalvina Correia da Silva²; Maria Tereza dos Santos Correia²;
Leonor Costa Maia^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Micorrizas, Depto. Micologia, CCB, Cidade Universitária, CEP. 50670-420, Recife, PE, Brasil. fsbsbarbosa@bol.com.br; nicacio.freitas@bol.com.br, amymelo17@hotmail.com; leonorcmaia@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Glicoproteínas, Depto. Bioquímica, CCB, Cidade Universitária, CEP. 50670-420, Recife, PE, Brasil. micheledalvina@ig.com.br, mtcorreia@bol.com.br.

*Corresponding author - Tel.: 55-81-21268865; Fax: 55-81 121268482.

leonorcmaia@yahoo.com.br

**Partially purified extract of glomalin stimulate *in vitro* growth of
Gigaspora albida mycelia**

Abstract

Arbuscular mycorrhizal fungi produce a glycoprotein (glomalin) that has been related to soil aggregation. Considering that the effect of glomalin on the asymbiotic phase of the AMF is unknown, partially purified glomalin extracts were added to the medium and germination and mycelial growth of *Gigaspora albida* Schenck and Smith was observed. An isolate of *G. albida*, multiplied or not multiplied in a substrate with organic amendment, was used. Spores were disinfected (0.05% NaOCl, 2 min) and placed on 1.3% water agar with 15, 30 or 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of glomalin. After 7 and 14 days germination rate and hyphal growth were estimated. Germination was not affected by the glycoprotein in the growth medium. Mycelial growth of the fungus multiplied in organic residue was greater than that of the same fungus, multiplied without organic substrate. Concentration of glomalin at 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ stimulated, but 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$ glomalin inhibited mycelial growth. The stimulatory effect of glomalin in the pre-symbiotic phase might be related to utilization of both the carbohydrate and the protein portions of glomalin. However, high amounts of this glycoprotein may inhibit fungal growth.

Key Words: Glomeromycota, glycoprotein, mycorrhiza.

Introduction

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) form a beneficial association with most plant species. In this interaction the mycobiont increases the absorption of nutrients for the associated host and enhances host tolerance to biotic and abiotic stresses (Smith and Read 1997).

The arbuscular mycorrhizae increase productivity of many economically important crops (Azcón-Aguilar and Barea 1997), and are especially important in soils of tropical regions with low phosphorus availability (Howeler et al. 1987).

Germination and early mycelial development are important for symbiosis establishment. Early fungal development is affected by factors such as: temperature, humidity, pH and constitution of the substrate or growth medium (Green et al. 1976; Daniels and Trappe 1980; Siqueira et al. 1985; Maia and Yano-Melo 2001), as well as CO₂ tension and substances that may stimulate the asymbiotic growth of the fungus (Bécard et al. 1992; Ishii et al. 1997; Siqueira et al. 1999; Bécard et al. 2004). Conversely, high concentrations of certain nutrients, such as phosphorus, may inhibit early fungal development (Louis and Lim 1988; Nagahashi et al. 1996).

Studies have shown the effect of amino acids and carbohydrates on germination and mycelial growth of AMF (Silva and Siqueira 1991; Freitas and Siqueira 1994); however, there is little information regarding the effect of glycoproteins on such biological processes. Glycoproteins have been implicated in the recognition between the symbiont partners (Díaz et al. 1989).

The extraradical mycelium of the AMF produce a specific glycoprotein known as glomalin (Rillig et al. 2003; Driver et al. 2005), that is involved in soil aggregation (Rillig et al. 2002). By enhancing aggregate stability (Wright and Upadhyaya 1996; 1998) glomalin contributes to storage of soil carbon (Rillig et al. 1999; Rillig et al. 2001a). This biomolecule is responsible for 4-5% of soil C and N, while the microbial biomass (estimated by the traditional method of fumigation-extraction) represents only 0.08 - 0.2% (Rillig et al. 2001b). Moreover, it has been considered the highest source of carbon from the organic matter, a function earlier related to the humic acids (Wright and Nichols 2002). Other function of this protein glycoconjugate is related to the presence of iron in its structure. Iron potentially may impair growth of pathogenic organisms, which need this element for development (Wright and Nichols 2002). Although important and ubiquitous (Wright and Upadhyaya 1996; Wright and Anderson 2000) in nature, the effect of glomalin on germination and mycelial growth of AMF is still unknown. The aim of this work was to evaluate how the presence of glomalin in the substrate affects the asymbiotic phase of *Gigaspora albida* Schenck & Smith.

Material and methods

Glomalin. The glomalin was extracted from soil of an Atlantic Forest area, in the municipality of Jaqueira, Pernambuco, Brazil (Usina Frei Caneca 08°42'37''S and 35°50'01''W), using the method described by Wright and Upadhyaya (1998). The Bradford protein assay (Bradford 1976) was used to determine the glomalin concentration. The extract of glomalin was partially purified as described by Wright et al. (1998): protein was precipitated with an equal volume of 20% (w/v) TCA (4 °C for 1 h). The pellet of protein was washed twice with deionized water, dissolved in 100 mM Tris (hydroxymethyl aminometane, pH 8.0) and dialyzed against 10 mM Tris (pH 8.0). Dialyzed samples were lyophilized and incorporated to the medium.

Spores. Spores of *Gigaspora albida* (UFPE 01) were multiplied in two substrates (Table 1): a) soil; b) soil + 10% compost of fruits and legumes. *Panicum miliaceum* L. (fodder millet) was the host plant. After a multiplication cycle of 60 days, the substrates with the fungi (spores and colonized roots) were maintained at 4 °C for three months before being used (Kim et al. 2002). The inoculum from substrate (a) was named number 1 and that from substrate (b) was called number 2. In previous experiments (Silva et al. unpublished data) these isolates showed the highest potential for increasing the growth of sweet passion fruit seedlings (*Passiflora alata* Curtis). Spores multiplied in both substrates were extracted from soil by wet sieving and sucrose centrifugation (Gerdemann and Nicolson 1963; Jenkins 1964) immersed in sodium hypochlorite (0.05 % for 2 min.), and washed several times with sterilized distilled water (Nutila et al. 1995).

Table 1. Chemical characterization of the substrates used for multiplication of *Gigaspora albida*

Substrates	pH	P*	C	N	CTC	C/N
	(H ₂ O-1:2.5)	(mg dm ⁻³)	(g kg ⁻¹)		(cmol _c dm ⁻³)	
Soil	4.6	4	13.3	1.2	1.69	11.08
Soil + 10% OC	5.6	53	26.1	2.0	9.89	13.05

OC= organic compost; CTC= cationic exchange capacity; *Mehlich I.

Experimental setup and design. Spores were transplanted to Petri dishes containing 7 mL agar-water medium (1.3 %, autoclaved (121 °C/ 20 min.) amended with 0, 15, 30 or 45 µg of glomalin mL⁻¹ (each replicate was represented by a Petri dish with five spores). The plates were incubated in the dark, under environmental conditions of temperature (28 ± 2 °C) and relative air humidity (60-80 %). The final concentration of glomalin per plate was: 105, 210 and 315 µg protein (respective pH: 7.00, 7.02 and 7.06). The experimental design was a random factorial arrangement of: 4 glomalin concentrations × 2 *G. albida* inoculum sources (number 1 and number 2) × 2 evaluation periods (7 and 14 days) and four replicates for a total of 64 experimental parcels, with each bioassay being repeated twice.

Evaluations and measurements. Spore germination was rated as positive when the germ tube was twice the size of its diameter. Mycelial growth was estimated in a stereomicroscope (40 ×) by the Newman method (1966), after staining the hyphae with Trypan blue (0,05%). Data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test (P<0.05). Regression analysis was used to compare concentrations of glomalin and mycelial growth (Statistica program, Statsoft, 1997).

Results

Spore germination of *G. albida* was not affected by presence of glomalin in the growth medium (Figure 1), but mycelial growth of *G. albida* from both inoculum source (number 1 and number 2) (P<0.0001) was influenced by the glycoprotein. Spores multiplied in substrate with organic residue had higher mycelial growth in comparison with those multiplied in soil (P<0.0001). For *G. albida* number 1, the concentration of 30 µg glomalin mL⁻¹ promoted growth, while 45 µg of this glycoprotein in the medium inhibited hyphal development (Figure 2) in both evaluation periods. On the other hand, the asymbiotic growth of *G. albida* number 2, multiplied in substrate without the organic amendment, was initially (at the 7th day) linear (Y=3.3115+0.14552x; P<0.01; R²=0.99) and at the 14th day showed a square function; however in this case the adjustment was not significant (P>0.05).

Discussion

Germination results from metabolization of spore reserves, after absorption of water and in presence of oxygen, being regulated by some factors such as: pH, temperature and nutrient concentration in the external medium. Because spore reserves are used for energy and

growth during germination, molecules present in the external environment, such as glomalin, probably do not directly affect germination, as we observed.

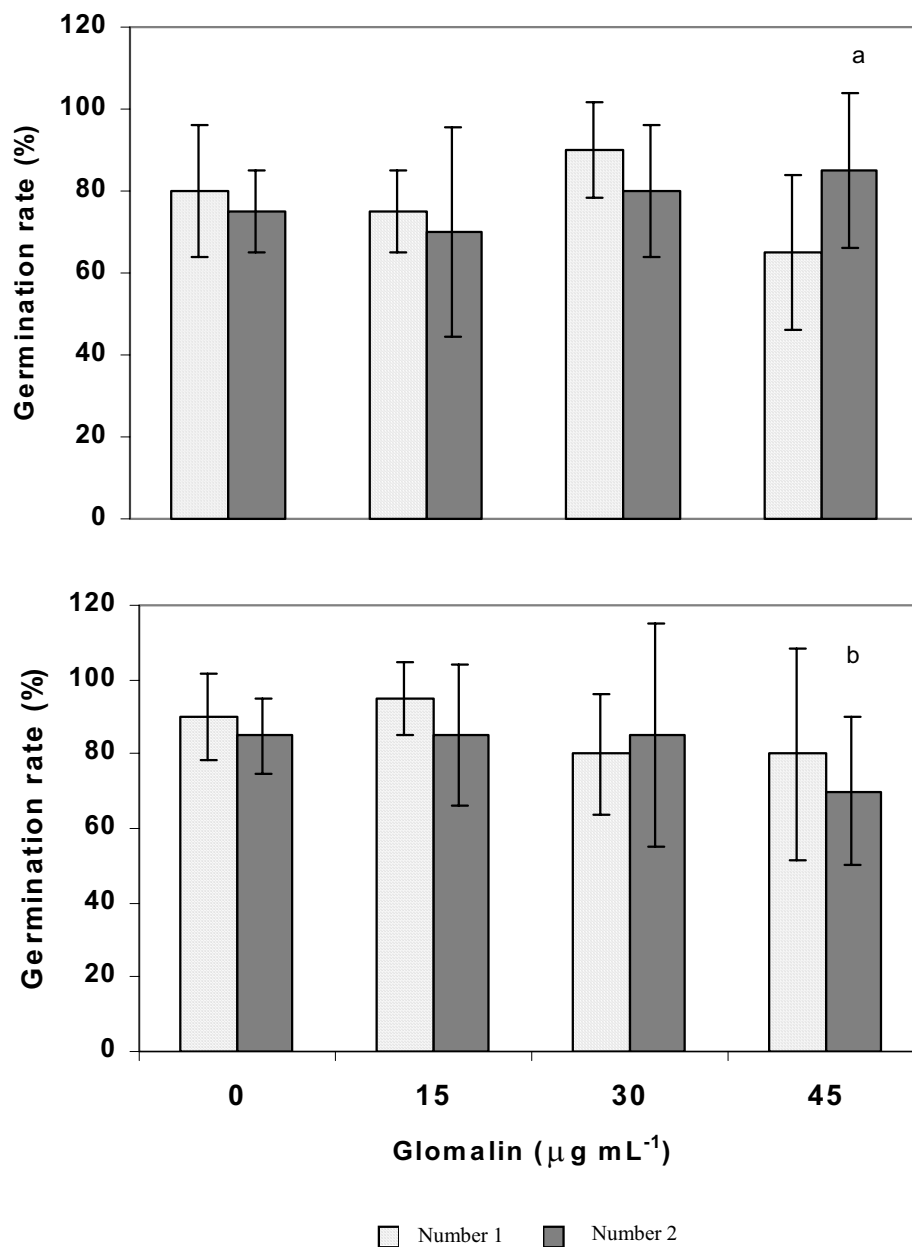


Figure 1. Germination rate of spores of *Gigaspora albida* multiplied (60 days) in soil with (number 1) and without (number 2) addition of organic compound, in medium supplemented with increasing concentrations of partially purified glomalin extract, at the 7th (a) and 14th (b) days. Bar= standard error (Tukey test, $P \leq 0.05$).

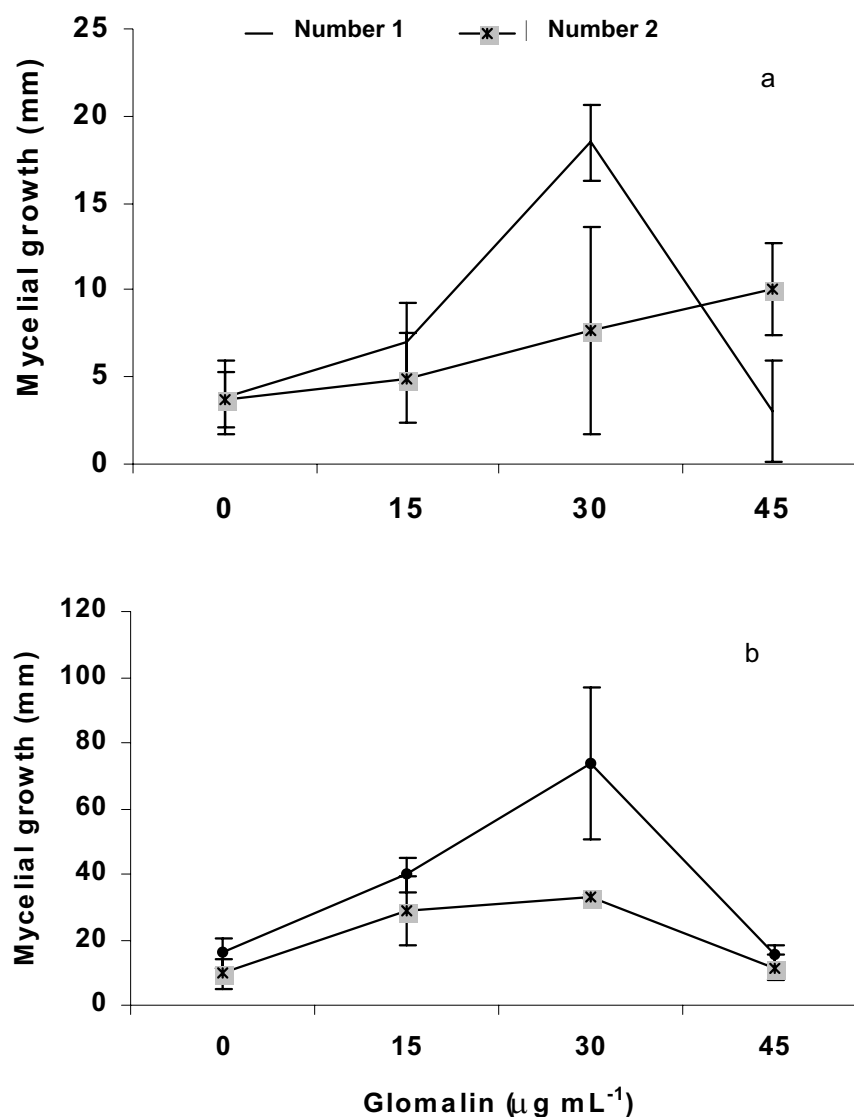


Figure 2. Mycelial growth of *Gigaspora albida* multiplied (60 days) in soil with (number 1) or without (number 2) addition of organic compound, in medium supplemented with increasing concentrations of partially purified glomalin extract, at the 7th (a) and 14th (b) days after inoculation. Bar= standard error (Tukey test, $P \leq 0.05$)

The increase in mycelial growth when the medium was supplied with extracted glomalin may be due to the utilization, by the fungus, of the own molecule (as a nutrient) or of the carbohydrate portion of glomalin. Bago et al. (1999) observed that glucose and fructose were absorbed and used during the asymbiotic growth of *Glomus mosseae* (Nicolson and Gerdemann) Gerdemann and Trappe. It is also possible that the protein portion of glomalin

enhance mycelial growth by a stimulatory effect similar to the effect of amino acids reported by Freitas and Siqueira (1994). Other possibility is the stimulatory effect of the carbon present in the chemical structure of glomalin. Others have reported enhancement of both the symbiotic and asymbiotic phases of AMF by carbonaceous molecules (Becárd and Piché 1989; Silva and Siqueira 1991).

Even though the extraction of protein may eliminate thermosensible proteins, and extracts probably contain little or no extraneous peptides or phenolic compounds, such as tannins (Rillig et al. 2001b), one should not exclude the possibility of presence of other substances stimulating the initial growth of the fungi. However, for González-Chávez et al. (2004), acidic precipitation followed by dialysis (as used in our studies) gives an extract with high purity degree. Also, native, insoluble glomalin may be different from the extracted molecule.

The higher mycelial growth was observed in the *G. albida* multiplied in organic amended substrate than the fungus multiplied in the substrate without amendment could be related to the process of adaptation of the fungus to the presence of glomalin in the soil once that this protein is the major source of carbon from organic matter in the soil (Wright and Nichols 2002). AMF adapted to specific soil conditions regrow in similar soils better than non-adapted AMF (Weissenhorn et al. 1993; Scullion et al. 1998; Enkhtuya et al. 2000).

The glomalin displayed a stimulatory effect on the asymbiotic growth of *G. albida* but there was less growth when the concentration was high. This can be the result of presence of Fe, which varies from 0.08 to 8%, in the glomalin structure (Wright and Upadhyaya 1998). Thus, it would be possible that high concentrations of glomalin impaired normal mycelial growth. In the same way, the humic acids earlier considered the major components of the organic fraction of the soil (Hayes and Clapp 2002) linearly reduced mycelial growth of *G. mosseae* (Vallinni et al. 1993) and this effect was related to presence of Na in its structure.

Glycoproteins are known to act on cellular recognition through the carbohydrates portions (Powlson 1989). The enhancement of mycelial growth on medium with 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of glomalin (Figure 2) may be related to the cellular recognition promoted by the glomalin to stimulate the use of resources of the spore. Our results indicated that the presence of glomalin enhanced growth in relation to the control. In other symbiotic systems (lichen and *Rhizobium*-legume), glycoproteins are important for cellular recognition between the partners (Diáz et al. 1989; Molina and Vicente 2000). Another possible explanation for the increase in mycelial growth is the presence of sugars contributed by glomalin to the growth medium. In

ectomycorrhizal systems, the increase in concentration of monossacharides controls genetic expression (Nehls et al. 2000).

Presence of glomalin has no effect on germination of *G. albida*, but mycelial growth is stimulated by this protein, with the enhancement depending on the concentration in the growth medium. Moreover, the conditions under which the spores of *G. albida* are multiplied affect the asymbiotic growth of the fungus when in a substrate with glomalin.

Acknowledgements

Thanks are due to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superios), for providing a PhD scholarship for the first author, and to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support and research grant to L.C. Maia. Special thanks to Dr. Sara Wright for valuable suggestions in the content and corrections of the English text.

References

- Azcón-Aguilar C, Barea JM (1997) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Sci Hortic* 68: 1-24
- Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y (1999) Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol* 121: 263-271
- Bécard G, Piché Y (1989) Fungal growth stimulation by CO₂ and root exudates in the vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 55: 2320-2325
- Bécard G, Douds DD, Pfeffer PE (1992) Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO₂ and flavonols. *Appl Environ Microbiol* 58: 821-825
- Bécard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C (2004) Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot* 82: 1186-1197
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Daniels BA, Trappe JM (1980) Factors affecting spores germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. *Mycologia* 72: 457-471
- Díaz CL, Melchers LS, Hooykaas PJJ, Lugtenberg BJJ, Kijne JW (1989) Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Nature* 338: 579-581

- Driver JD, Holben WE, Rillig M (2005) Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 37: 101-106
- Enkhtuya B, Rydlová J, Vosátka M (2000) Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man made habitats. *Appl Soil Ecol* 14: 201-211
- Freitas MH, Siqueira JO (1994) Crescimento micelial de esporos pré-germinados do fungo endomicorrízico *Gigaspora gigantea* em meio líquido suplementado com compostos orgânicos nitrogenados. *Pesqui Agropecu Bras* 29: 751-756
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* 46: 235-244
- González-Chávez MC, Carrillo-González R, Wright SF, Nichols KA (2004) The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. *Environ Pollut* 130: 317-323
- Green NE, Graham SO, Schenck NC (1976) The influence of pH on germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. *Mycologia* 68: 929-933
- Hayes MHB, Clapp CE (2002) Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Sci* 166: 723-737
- Howeler RH, Sieverding E, Saif S (1987) Practical aspects of mycorrhizal technology in some tropical crops and pastures. *Plant Soil* 100: 249-283
- Ishii T, Narutaki A, Sawada K, Aikawa J, Matsumoto I, Kazuomi K (1997) Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in bahia grass (*Paspalum notatum* Flügge) roots. *Plant Soil* 196: 301-304
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Plant Dis Rep* 48: 692
- Kim KY, Cho YS, Sohn BK, Park RD, Shim JH, Jung SJ, Kim YW, Seong KY (2002) Cold-storage of mixed inoculum of *Glomus intraradices* enhances root colonization, phosphorus status and growth of hot pepper. *Plant Soil* 238: 267-272
- Louis I, Lim G (1988) Observations on *in vitro* sporulation of *Glomus clarum*. *Trans Br Mycol Soc* 91: 698-699
- Maia LC, Yano-Melo AM (2001) Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. *Braz J Microbiol* 32: 281-285
- Mollina MC, Vicente C (2000) Purification and characterization of two isolectins with arginase activity from the lichen *Xantoria parietina*. *J Biochem Mol Biol* 33: 300-307

- Nagahashi G, Douds DD, Abney GD (1996) Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. *Mycorrhiza* 6: 403-408
- Nehls U, Wiese J, Hampp R (2000) External sugar concentration as a signal ectomycorrhizal fungal gene expression. In: Podila GK, Douds Jr DD (eds) *Currents Advances in Mycorrhizae Research*. APS Press, St. Paul, pp. 19-26
- Newman EI (1966) A method of estimating the total length of root in a sample. *J Appl Eco* 3: 139
- Nuttila AM, Vestberg M, Kauppinen V (1995) Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria x Ananana* Duch) with arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Cell Rep* 14: 505-509
- Powlson JC (1989) Glycoproteins: what are sugar chain for? *Trends Biochem Sci* 14: 272-276
- Rillig MC, Wright SF, Allen MF, Field CB (1999) Rise on carbon dioxide soil structure. *Nature* 400: 628
- Rillig MC, Wright SF, Kimball BA, Pinter PJ, Wall GW, Ottman MJ, Leavitt SW (2001a) Elevated carbon dioxide and irrigation effects on water stable aggregates in a Sorghum field: a possible role for arbuscular mycorrhizal fungi. *Global Change Biol* 7: 333-337
- Rillig MC, Wright SF, Nichols KA, Schmidt WF, Torn MS (2001b) Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil* 233: 167-177
- Rillig MC, Wright SF, Shaw R, Field CB (2002) Artificial climate warming positively affects arbuscular mycorrhiza but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. *Oikos* 97: 52-58
- Rillig MC, Ramsey PW, Morris S, Paul EA (2003) Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land use change. *Plant Soil* 253: 293-299
- Scullion J, Eason WR, Scottie P (1998) The effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi high-input conventional and organic grassland and grass-arable rotations. *Plant Soil* 204: 243-254
- Silva LRC, Siqueira JO (1991) Efeito de carboidratos e ácidos orgânicos sobre o crescimento micelial do fungo endomicorrízico *Gigaspora gigantea* in vitro. *Pesqui Agropecu Bras* 26: 2007-2014
- Siqueira JO, Pereira MAM, Simão JBP, Moreira FMS (1999) Efeito da formononetina (7 hidroxí, 4'metoxi isoflavona) na colonização micorrízica e crescimento do milho em solo contendo excesso de metais pesados. *Rev Bras Ci Solo* 13: 561-567

- Siqueira JO, Sylvia DM, Gibson J (1985) Spores, germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can J Bot* 31: 965-972
- Smith SE, Read DJ (eds) (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. 2nd ed, Academic Press, San Diego
- Statsoft, Inc (1997) *Statistica for Windows (Computer Program Manual)*. Tulsa, USA.
- Sylvia DM (1999) Fundamentals and applications of arbuscular mycorrhizae: a “biofertilizer” perspective. In: Siqueira JO, Moreira FMS, Lopes AS, Guilherme LRG, Faquini V, Furtini Neto AE, Carvalho JG (eds) *Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Lavras, pp. 705-723
- Vallinni G, Pera A, Avio L, Valdrighi M, Giovannetti M (1993) Influence of humics acids on laurel growth, associated rhizospheric microorganisms, and mycorrhizal fungi. *Biol Fertil Soils* 16: 1-4
- Weissenhorn I, Leywal C, Berthelin J (1993) Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy metal polluted soils. *Plant Soil* 157: 247-256
- Wright SF, Upadhyaya A (1996) Extraction of an arbuscular and unusual protein from soil and comparison on hyphal protein of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci* 161: 575-586
- Wright SF, Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198: 97-107
- Wright SF, Upadhyaya A, Buyer JS (1998) Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis. *Soil Biol Biochem* 30: 1853-1857
- Wright SF, Anderson RL (2000) Aggregate stability and glomalin in alternative crop rotations for the Central Great Plains. *Biol Fertil Soils* 31: 249-253
- Wright SF, Nichols KA (2002) Glomalin: hiding place for a third of the world’s stored soil carbon. *Agric Res Magazine* 50: 4-7

Capítulo 5

*Influência de resíduos orgânicos sobre a fase assimbiótica de Gigaspora albida
Schenck & Smith (Glomeromycota)*

Artigo a ser submetido para publicação no periódico Mycorrhiza

**Influência de resíduos orgânicos sobre a fase assimbiótica de
Gigaspora albida Schenck & Smith (Glomeromycota)**

Fábio Sérgio Barbosa da Silva¹; Adriana Mayumi Yano-Melo¹; Nicácio de Oliveira Freitas¹;
Danielle Karla Alves da Silva & Leonor Costa Maia^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Micorrizas, Depto. Micologia, CCB, Cidade Universitária, CEP. 50670-420, Recife, PE, Brasil. fsbsbarbosa@bol.com.br; amymelo17@hotmail.com; nicacio.freitas@bol.com.br; daniellekarla@ig.com.br; leonorcmaia@yahoo.com.br.

*Corresponding author: Leonor Costa Maia, Tel.: 55-81-21268865; Fax: 55-81 21268482, e-mail address: leonorcmaia@yahoo.com.br

Resumo

Fungos micorrízicos arbusculares (FMA) desempenham importante papel na agricultura (orgânica); no entanto, o efeito da aplicação de resíduos orgânicos na fase assimbiótica desses fungos é pouco conhecido. Foi avaliado o efeito de doses e tipos de adubos orgânicos sobre a germinação e o crescimento micelial de *G. albida* multiplicado em solo adubado (número 1) ou não (número 2) com composto orgânico. Cinco esporos foram desinfestados (NaOCl/0,05%/2min), colocados entre membranas filtrantes e transferidos para solo adubado com 0, 10, 20 e 30% (v/v) de composto orgânico, proveniente da compostagem de frutas e verduras, terra vegetal ou esterco bovino não maturado, em experimentos independentes. Avaliações do índice germinativo e do crescimento micelial foram conduzidas aos 7 e 14 dias da inoculação. Cada experimento foi inteiramente casualizado em fatorial: 2 isolados de *G. albida* \times 4 proporções de resíduo \times 2 épocas de avaliação e 4 repetições. A germinação e o crescimento micelial inicial dos isolados de *G. albida* foram afetados pelo resíduo orgânico testado. Maior germinação e crescimento micelial de *G. albida* ocorreram em solo adubado com composto orgânico (53 % e 17,1 mm), seguido de terra vegetal (42,8 % e 13,9 mm) e esterco bovino (23,7 % e 5,2 mm). Em solo adubado com composto orgânico, *G. albida* (número 2) apresentou maior índice germinativo (57 %) que o multiplicado em condições orgânicas (50 %). Comportamento inverso ocorreu em substrato adubado com terra vegetal, com registro de maior germinação em *G. albida* (número 1). No experimento com esterco bovino, a condição de multiplicação não interferiu nas respostas assimbióticas. Em geral, a germinação e o crescimento micelial de *G. albida* foram beneficiados apenas em solo com composto orgânico e terra vegetal o que não ocorreu no experimento com esterco bovino, especialmente nas maiores proporções utilizadas. Seleção criteriosa dos tipos e proporções de resíduo utilizados na agricultura deve ser feita, considerando que aplicações inadequadas podem afetar o estabelecimento da associação micorrízica, pelo comprometimento da fase pré-simbiótica.

Palavras-chave: crescimento assimbiótico; adubação orgânica; FMA.

Introdução

A crescente preocupação com a qualidade ambiental tem impulsionado a utilização de fontes que favoreçam a qualidade edáfica e a agricultura sustentável (Mielniczuk 1999; Carter 2002). Entre esses materiais estão os resíduos orgânicos que, sendo devidamente aplicados melhoram a estruturação do solo (Caravaca et al. 2002a), fornecem nutrientes (Paul & Clark 1989), aumentam a capacidade tampão e de troca catiônica (Wagner & Wolf 1988) e beneficiam a microbiota com aumento na atividade microbiana (Fernandes et al. 2005). No entanto, as respostas positivas são dependentes da dose e do tipo de resíduo utilizado (Tanu et al. 2004).

Para o estabelecimento da associação micorrízica arbuscular são necessárias condições ideais para o desenvolvimento da fase pré-simbiótica, que envolve a germinação e a formação de micélio assimbiótico (Giovannetti 2000). Fatores como pH (Green et al. 1976), temperatura (Daniels & Trappe 1980), umidade (Sylvia & Schenck 1983), luminosidade (Varela-Castejón et al. 1998), nutrientes (Bressan 2001), tensões de CO₂ (Bécard et al. 1989), assim como vários compostos (Ishii et al. 1997; Bécard et al. 2004) e interações bióticas (Carpenter-Boggs et al. 1995) são relatados como moduladores do processo (Siqueira et al. 1985).

Em sistemas para formação de mudas ou em plantios, recomenda-se a aplicação de adubos orgânicos (Caravaca et al. 2002b), que podem atuar de modo diferenciado e particular sobre a interação dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) com as plantas (Jeffries et al. 2003); entretanto, pouco se sabe sobre o efeito desses insumos sobre a germinação e o crescimento micelial inicial de FMA, apesar da habilidade saprofítica de FMA em substratos com matéria orgânica ter sido sugerida (Hepper & Warner 1983; Warner 1984). Estudando o efeito da aplicação de resíduos orgânicos sobre a fase assimbiótica de FMA, Calvet et al. (1992) observaram que o comportamento germinativo de *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd) Gerdemann & Trappe foi independente da presença de adubo no substrato.

Maior eficiência simbiótica tem sido obtida com a utilização de FMA adaptados às condições edafoclimáticas alvo (Algualcil et al. 2003), podendo esses benefícios serem decorrentes da maior taxa de germinação e de crescimento micelial desses fungos; porém, essa hipótese ainda não foi testada, especialmente com FMA condicionados à adubação orgânica.

As etapas assimbióticas são importantes para o estabelecimento da associação micorrízica arbuscular e a aplicação inadvertida de doses ou fontes impróprias de adubação

pode comprometer programas de inoculação de plantas que passam por fase de viveiro, assim como o potencial germinativo de FMA em campos manejados organicamente. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da presença de resíduos orgânicos, no substrato, sobre a germinação e o crescimento micelial de *Gigaspora albida* Schenck & Smith multiplicado em solo adubado ou não com resíduo orgânico.

Material e métodos

Foram utilizados esporos de *Gigaspora albida* (UFPE 01) provenientes de um ciclo de multiplicação (60 dias) em solo adubado (número 1) ou não (número 2) com 10% de composto orgânico (Tabela 1), tendo como hospedeiro o painço (*Panicum miliaceum* L.). Após a multiplicação o solo-inóculo (esporos e raízes colonizadas), contendo 20 esporos g⁻¹ substrato, foi seco e armazenado (4°C por três meses) antes de ser utilizado (Kim et al. 2002). Em experimentos anteriores (Silva *et al.* dados não publicados), esses isolados foram os mais promissores em aumentar o crescimento de mudas de *Passiflora alata* Curtis.

Tabela 1. Caracterização química dos substratos utilizados para multiplicação de *Gigaspora albida*

Substratos	pH	P*	C	N	CTC	C/N
	(H ₂ O-1:2,5)	(mg dm ⁻³)	(g Kg ⁻¹)		(cmol _c dm ⁻³)	
Solo	4,6	4	13,3	1,2	1,69	11,08
Solo e 10% CO	5,6	53	26,1	2,0	9,89	13,05

CO= composto orgânico; CTC= capacidade de troca catiônica; *Mehlich I

Foram testados três resíduos orgânicos (Tabela 2), que constituíram experimentos independentes: a)Composto orgânico – proveniente da compostagem de frutas e verduras impróprias para comercialização e fornecido pela CEAGEPE/unidade CEASA/ Recife; b)Terra Vegetal – adquirida comercialmente (Viva o Verde Ltda.); c)Esterco Bovino não maturado – coletado no estábulo do Departamento de Zootecnia / UFRPE.

Todos os resíduos foram peneirados (3 mm), desinfestados com Bromex® (Brometo de metila – 98% e cloropicrina – 2%) por 5 dias e mantidos em repouso por 30 dias.

Como substrato foi utilizado o solo tipo franco-argilo-arenoso, proveniente do município de Aldeia, Camaragibe-PE (pH 5,4 e 3 mg P dm⁻³) esterilizado em autoclave (121°C/30 min/2 dias consecutivos) que recebeu os resíduos orgânicos nas proporções de 0,

10, 20 e 30 % (v/v), correspondente à aplicação de 0, 200, 400 ou 600 t ha⁻¹. Após preparo, o substrato foi deixado em repouso por 15 dias e umedecido com água destilada esterilizada (40% do volume total dos poros) antes de ser utilizado.

Tabela 2. Caracterização química dos resíduos orgânicos utilizados nos experimentos

	Resíduos orgânicos		
	Composto orgânico	Terra vegetal	Esterco bovino
P* (mg dm ⁻³)	393,00	69,00	1026,00
Ca** (cmol _c dm ⁻³)	7,71	3,10	4,70
Mg** (cmol _c dm ⁻³)	3,40	2,20	5,10
C (g Kg ⁻¹)	43,10	33,40	222,60
N (g Kg ⁻¹)	3,80	1,20	13,10
C/N	11,34	27,86	16,99
CTC (cmol _c dm ⁻³)	12,67	13,88	12,05
pH (H ₂ O -1:2,5)	6,20	5,40	7,60

CTC= capacidade de troca catiônica; *Mehlich I; ** KCl 1M.

Para inoculação, esporos foram extraídos por peneiramento úmido, seguido de centrifugação em sacarose (Gerdemann & Nicolson 1963; Jenkins 1964), desinfestados com NaOCl (0,05%/2 min) e lavados quatro vezes em H₂O destilada e esterilizada (Nutila et al. 1995). Quatro grupos de cinco esporos foram colocados entre membranas filtrantes (Gelman Sciences Inc., Amm Arbor Michigan), que foram depositadas a 2,5 cm da superfície em recipientes (Nalgene®, 42 × 13 × 5,5 cm e capacidade para 2000 mL) contendo 1500 mL dos substratos testados. Cada conjunto de esporos entre membranas foi considerado uma repetição. Os recipientes foram acondicionados no escuro, em temperatura ambiente (28 ± 2°C).

Avaliações foram conduzidas aos 7 e 14 dias da inoculação. Foram considerados germinados os esporos que apresentaram comprimento da hifa germinativa maior que o diâmetro do esporo (Bartolome – Esteban & Schenck 1994). As hifas foram coradas com solução aquosa de azul de Trypan (0,05%) e o crescimento micelial determinado pelo método de Newman (1966), em estereomicroscópio (40×).

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado em arranjo fatorial: 2 fontes de inóculo de *Gigaspora albida* (número 1 e número 2) × 4 proporções do resíduo

orgânico \times 2 épocas de avaliação e 4 repetições, totalizando 64 parcelas experimentais para cada resíduo testado. Os dados foram transformados ($\sqrt{x + 0,5}$), submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (0,05%), utilizando-se o programa Sanest (Zonta et al. 1984). Análises conjuntas dos experimentos foram realizadas para determinação do resíduo mais favorável aos processos pré-simbióticos do fungo, utilizando-se o programa NTIA (Embrapa 1996). Análises de regressão foram feitas para os parâmetros que apresentaram interação com as proporções de resíduo.

Resultados

No experimento com composto orgânico, houve interação entre os fatores estudados (fonte de inóculo de *G. albida*, proporções de adubo e época de avaliação) para o crescimento micelial, porém para o índice germinativo, a interação foi significativa entre os fatores fonte de inóculo e proporções de adubo, independente da época de avaliação ($P < 0,01$). No ensaio com terra vegetal, a germinação foi influenciada pela fonte de inóculo, sem haver interação com os outros fatores, enquanto para o crescimento micelial, a interação entre fonte de inóculo e proporções de terra vegetal no substrato foi significativa, independentemente da época de avaliação ($P < 0,01$). Em solo adubado com esterco bovino, as proporções de adubo influenciaram significativamente a germinação e o crescimento micelial, independentemente da época de avaliação e da fonte de inóculo testada ($P < 0,05$).

Em meio com composto orgânico, *G. albida* (número 2), produzido apenas em solo, apresentou maior índice germinativo que o multiplicado em condições orgânicas. Comportamento inverso ocorreu em substrato adubado com terra vegetal, onde se observou maior germinação e crescimento micelial de *G. albida* (número 1). No experimento com esterco bovino, a condição de multiplicação do fungo não interferiu nas respostas assimbióticas (Figura 1).

A adubação do solo com 20 % de composto orgânico estimulou a germinação de *G. albida* produzido em substrato com adubo orgânico, mas o aumento da dose foi prejudicial independentemente da época de avaliação. Em contrapartida, a adição de apenas 10 % foi suficiente para aumentar o percentual germinativo dos esporos multiplicados em solo, que se manteve elevado mesmo nos tratamentos com mais adubo (Figura 2), tanto aos 7 quanto aos 14 dias de avaliação.

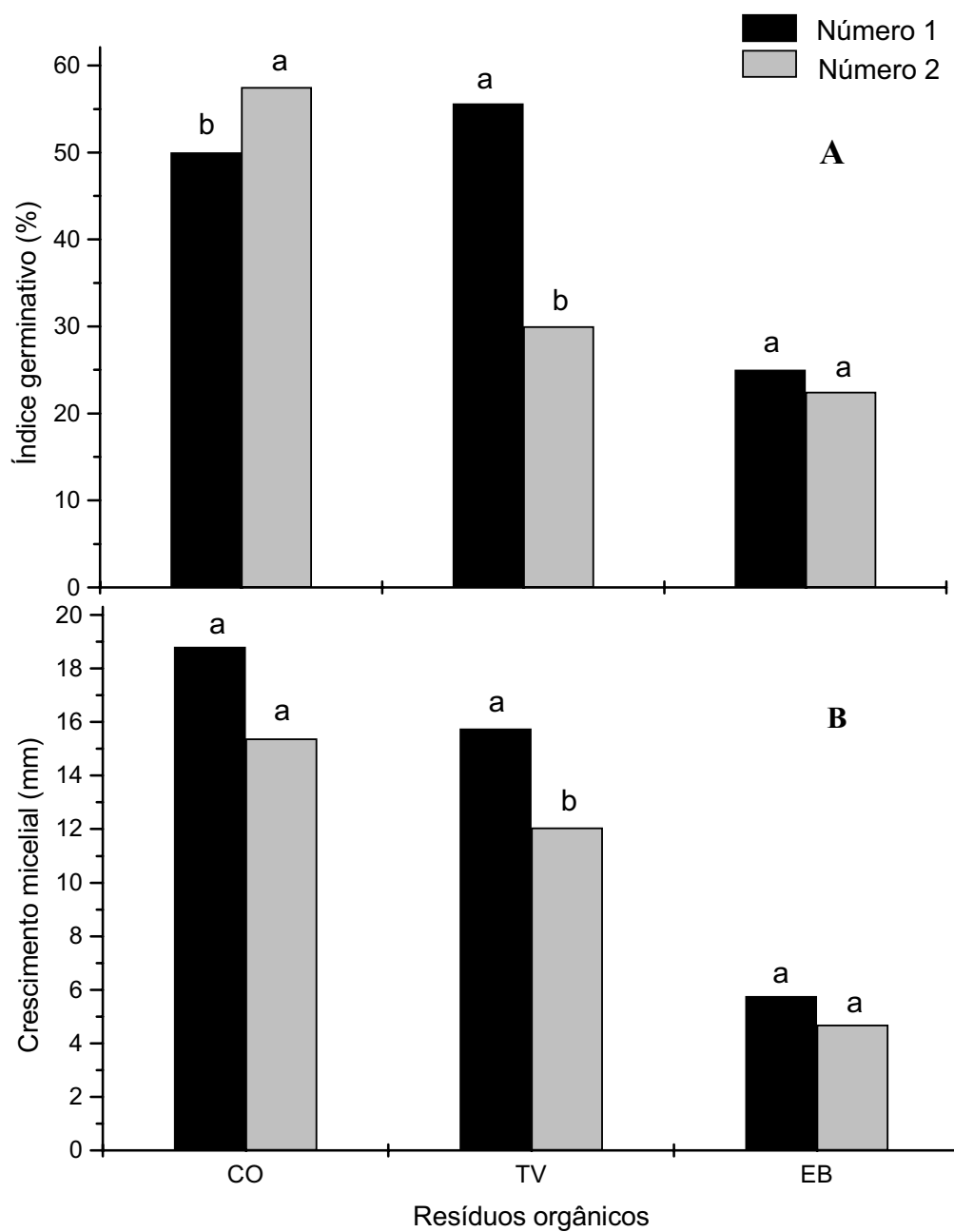


Figura 1. Índice germinativo (A) e crescimento micelial (B) de *Gigaspora albida*, multiplicado em substrato com (Número 1) ou sem (Número 2) adição de composto orgânico, em solo adubado com composto orgânico (CO), terra vegetal (TV) ou esterco bovino (EB). Médias seguidas da mesma letra dentro de cada resíduo orgânico não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

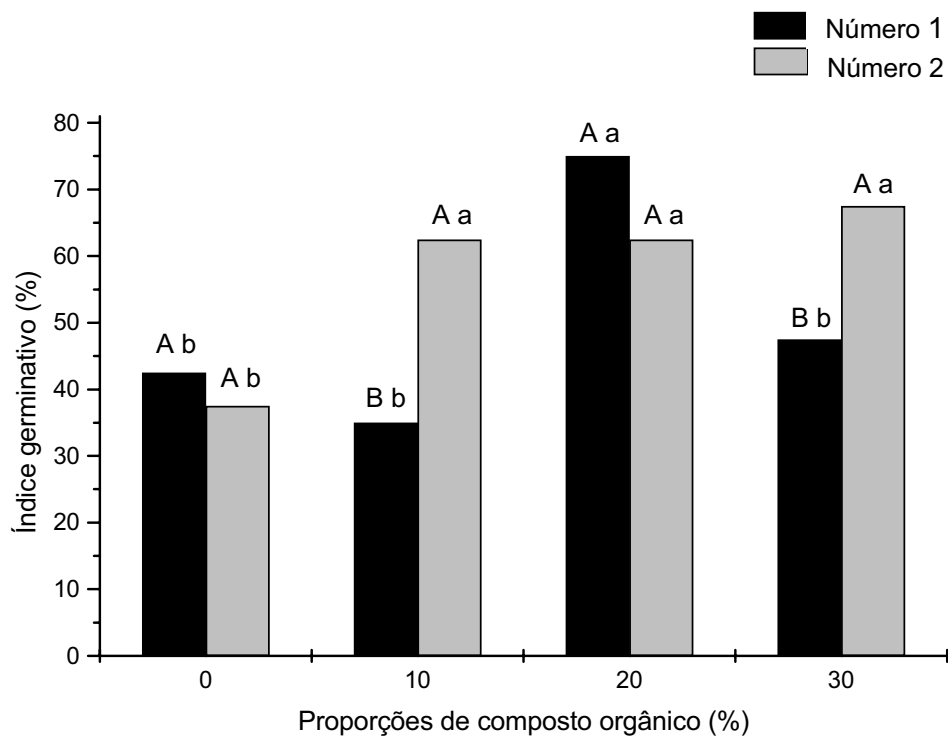


Figura 2. Índice germinativo de isolados de *Gigaspora albida*, produzidos em substrato com (número 1) ou sem (número 2) adubo orgânico, mantido em solo com proporções crescentes de composto orgânico, independentemente da época de avaliação. Médias seguidas da mesma letra minúscula, entre as proporções e dentro de cada fonte de inóculo de FMA e maiúsculas entre as fontes de inóculo na mesma proporção do resíduo, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Na primeira avaliação (7 dias), o crescimento micelial de *G. albida* (número 1) foi favorecido pela presença de 20 % de composto orgânico; porém, com o passar do tempo (14 dias) o tratamento controle atingiu crescimento micelial similar (Figura 3).

A aplicação de 10 e 20 % de composto também favoreceu o crescimento micelial de *G. albida* (número 2) até os sete dias, porém, do mesmo modo que ocorreu com o outro isolado, aos 14 dias o crescimento alcançado nesses tratamentos também foi acompanhado pelo controle (Figura 3). Diferenças entre as fontes de inóculo, aos 7 dias, ocorreram apenas no tratamento com 10 % de adubo com *G. albida* (número 2) apresentando maior crescimento micelial que *G. albida* (número 1). Aos 14 dias houve diferença entre os isolados apenas no tratamento com 20 % de adubação e dessa vez *G. albida* (número 1) apresentou maior crescimento micelial do que *G. albida* (número 2) (Figura 3).

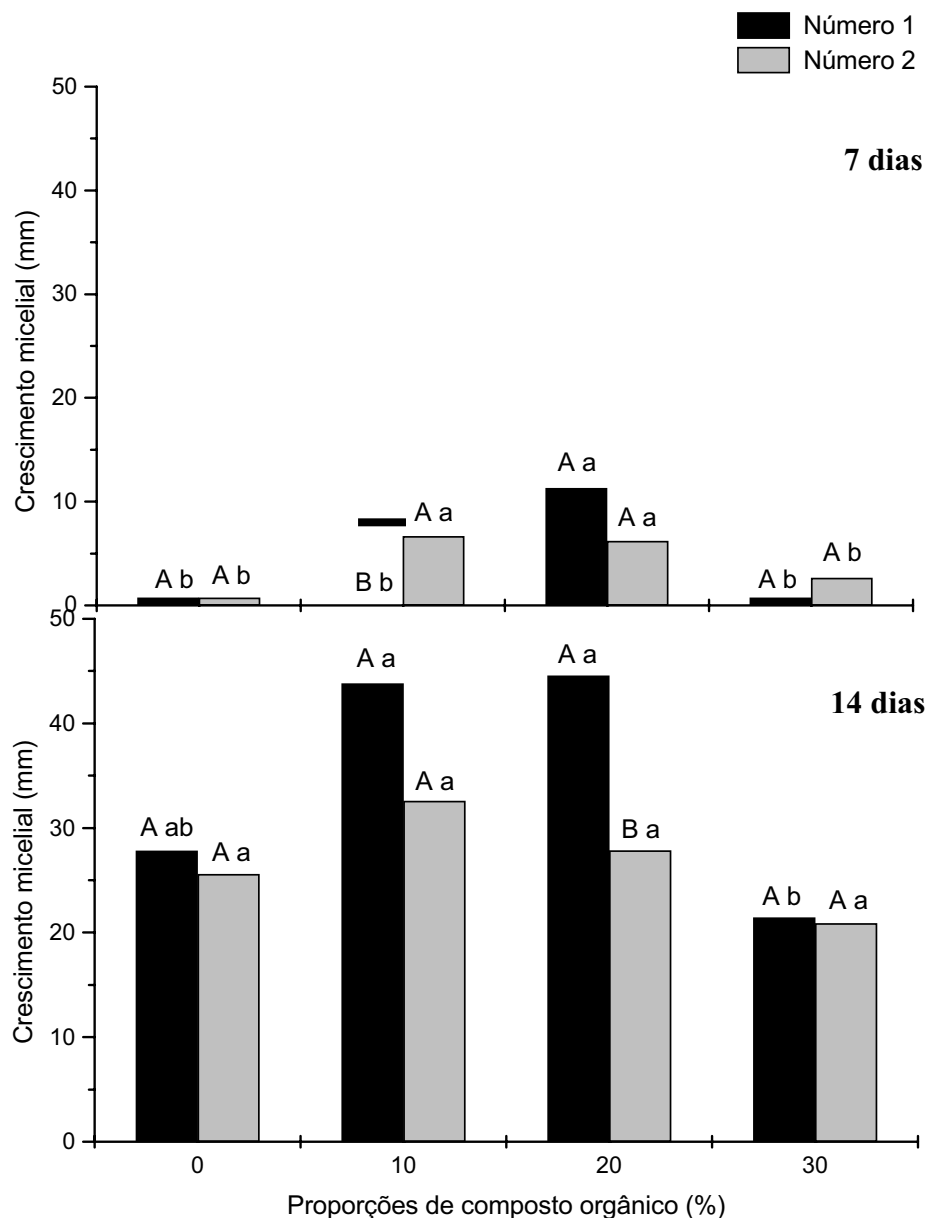


Figura 3. Crescimento micelial de isolados de *Gigaspora albida*, produzidos em substrato com (Número 1) ou sem (Número 2) adubo orgânico, em solo com proporções crescentes de composto orgânico, aos 7 e 14 dias de inoculação. Médias seguidas da mesma letra minúscula, entre as proporções e dentro de cada fonte de inóculo de FMA e maiúscula, entre as fontes de inóculo na mesma proporção do resíduo, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Em solo com terra vegetal, nas duas épocas de avaliação, os esporos de *G. albida* provindos de condição orgânica produziram maior quantidade de micélio assimbiótico na menor dose testada (10%) (Figura 4). Em contrapartida, o crescimento micelial do isolado mantido em solo não foi afetado pela presença da terra vegetal no meio de crescimento

(Figura 4). Em geral, *G. albida* (número 1) desenvolveu melhor do que *G. albida* (número 2) nessa condição de solo (Figura 4).

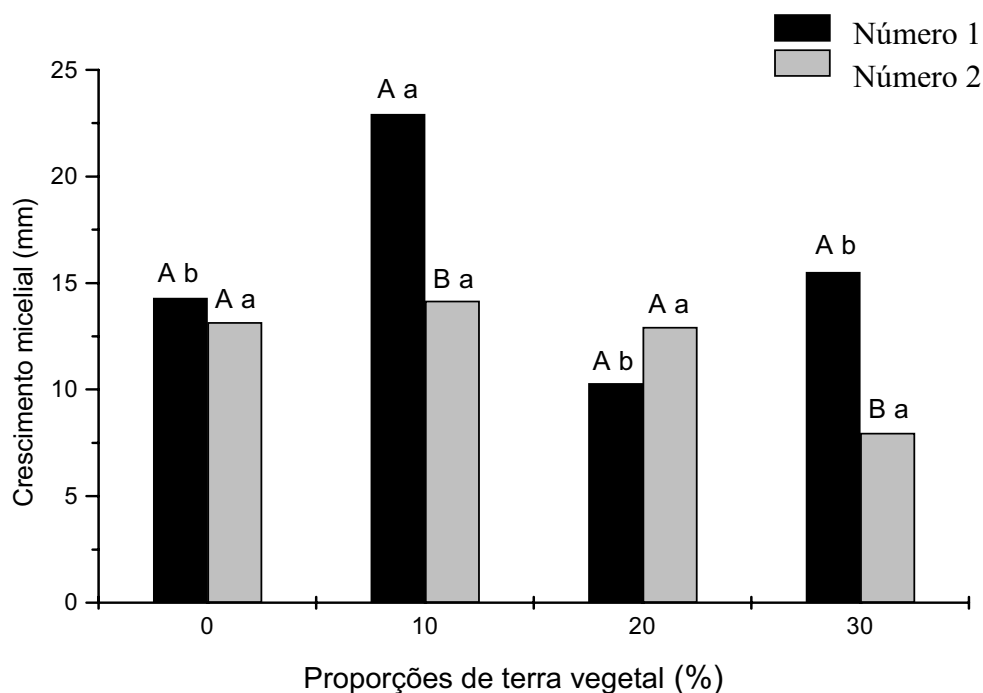


Figura 4. Crescimento micelial de isolados de *Gigaspora albida*, produzidos em substrato com (Número 1) ou sem (Número 2) adubo orgânico, mantidos em solo com proporções crescentes de terra vegetal, independentemente da época de avaliação. Médias seguidas da mesma letra minúscula, entre as proporções e dentro de cada fonte de inóculo de FMA e maiúscula entre as fontes de inóculo na mesma proporção do resíduo não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A adição de esterco bovino não maturado reduziu linearmente tanto a germinação quanto o crescimento micelial de ambos os isolados de *G. albida*, nas duas épocas de avaliação (Figura 5).

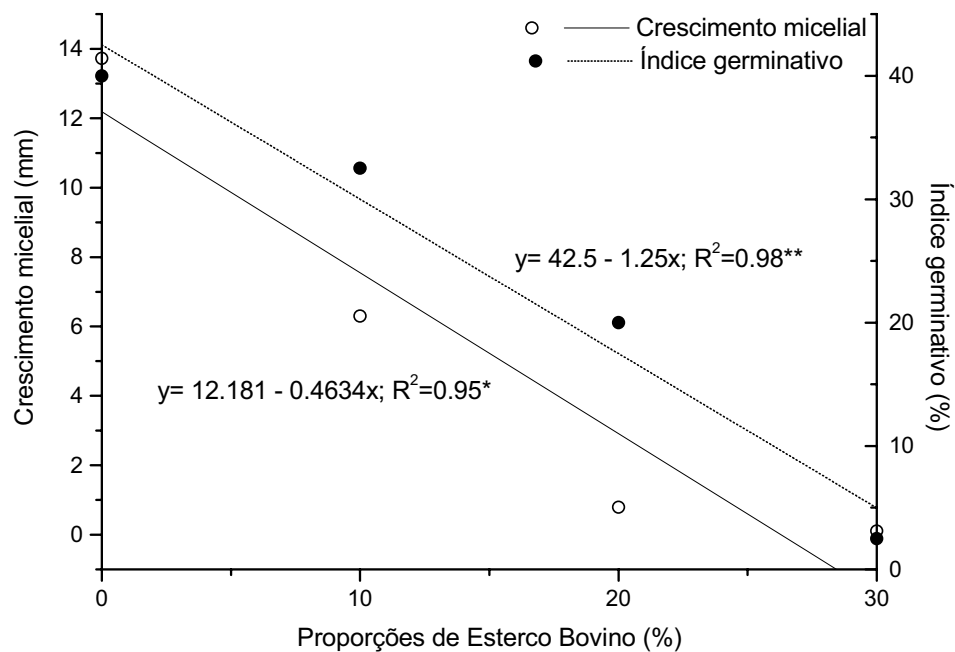


Figura 5. Índice germinativo e crescimento micelial de *Gigaspora albida* em solo adubado com proporções crescentes de esterco bovino, independentemente da fonte de inóculo e da época de avaliação. * ($P < 0.05$); ** ($P < 0.01$).

A partir da análise conjunta dos experimentos, verificou-se que a germinação e o crescimento micelial inicial de *G. albida* foram afetados pelo resíduo orgânico testado, sendo observado melhor desenvolvimento em meio com composto orgânico, seguido da terra vegetal, enquanto a adição de esterco bovino não maturado não favoreceu a fase assimbiótica do fungo ($P < 0,01$) (Tabela 3).

Tabela 3. Índice germinativo e crescimento micelial de esporos de *Gigaspora albida* em solo adubado com composto orgânico (CO), terra vegetal (TV) ou esterco bovino não maturado (EB), independentemente da época de avaliação e das proporções dos resíduos.

Variável	Resíduos orgânicos		
	Composto orgânico	Terra vegetal	Esterco bovino
Índice germinativo (%)	53,0a	42,8b	23,7c
Crescimento micelial (mm)	17,1a	13,9b	5,2c

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0.05$).

O isolado de *Gigaspora albida* multiplicado em meio com adubo orgânico formou, em todos os tratamentos (épocas, doses e tipos de resíduos), células auxiliares com morfologia diferenciada (Figura 6), o que não ocorreu no isolado produzido em solo sem adubo.

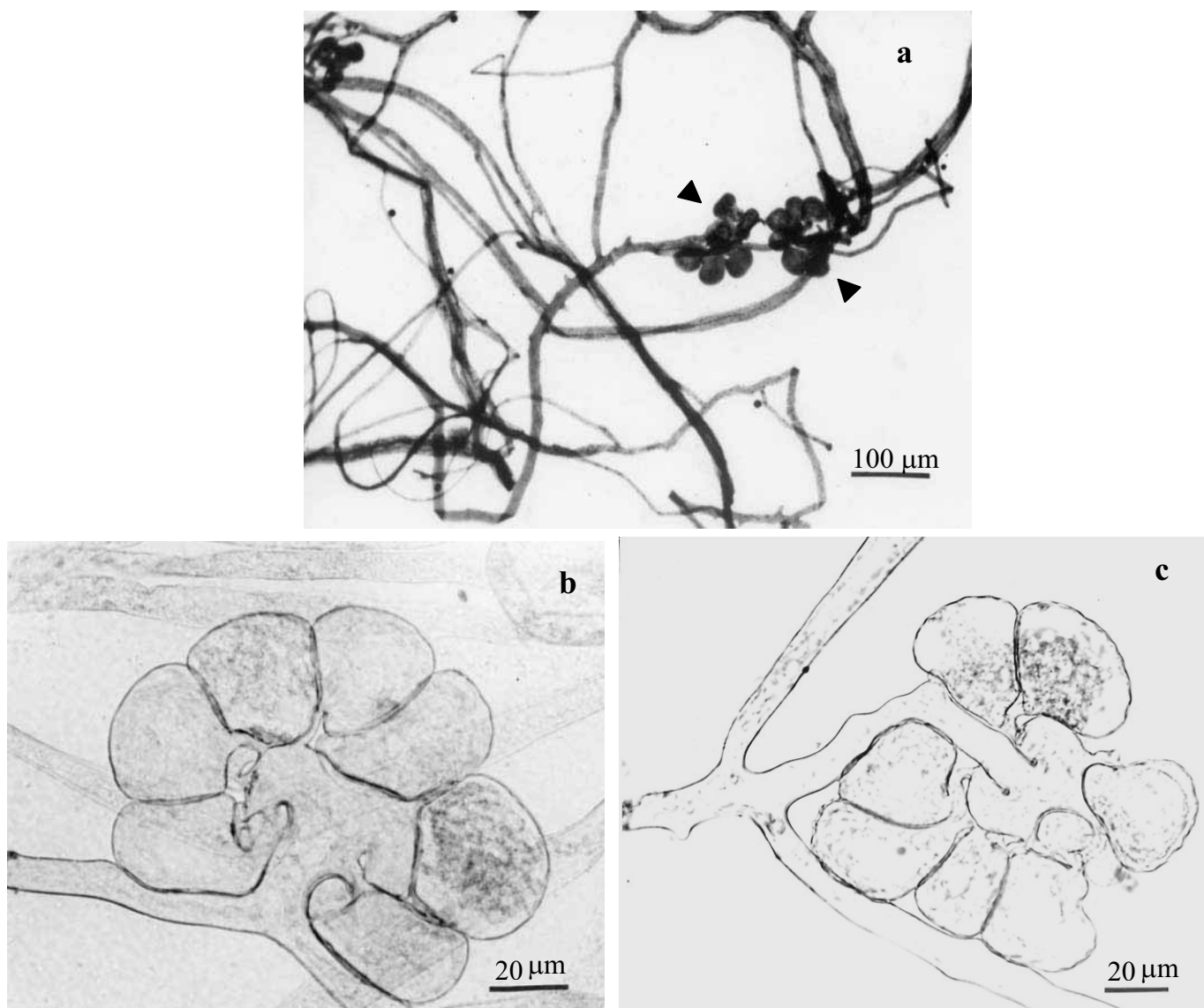


Figura 6. Células auxiliares produzidas no micélio assimbiótico de *Gigaspora albida* (número 1) multiplicado em solo com composto orgânico: (a) hifas e células auxiliares (seta); (b, c) detalhe das células auxiliares alteradas pela ausência de ornamentações.

Discussão

A composição do substrato de crescimento afeta a germinação e a fase pré-simbiótica de FMA (Maia & Yano-Melo 2001). No presente estudo, respostas diferenciadas nas fases assimbióticas foram obtidas em relação ao tipo de substrato orgânico testado (Tabela 3).

A aplicação de materiais orgânicos no solo pode aumentar a colonização micorrízica (Mäder et al. 2000), o número de propágulos infectivos (Palenzuela et al. 2002), bem como a produção de esporos de FMA (Gryndler et al. 2003). O estímulo no crescimento micelial de *G. albida* em decorrência da presença do composto orgânico ou terra vegetal no solo pode ser atribuído à presença de carbono, oriundo da adubação, visto que o efeito benéfico de compostos com C na estrutura química já foi relatado (Bécard et al. 1989; Silva & Siqueira 1991), porém o tipo de adubo empregado pode modular as respostas obtidas. Maior produção de hifas também foi observada por St. John et al. (1983) em substratos com elevada quantidade de material orgânico particulado.

Resíduos orgânicos compostados favorecem a qualidade do solo (Caravaca et al. 2002a) e estes benefícios são decorrentes da maior estabilidade do material, assim como da eliminação de substâncias fitotóxicas durante o processo de compostagem (Kiehl 1998). Essas características podem ter contribuído para o maior crescimento micelial de *G. albida* em solo enriquecido com composto orgânico, em relação às demais fontes testadas (Figura 3). Com resultados semelhantes, Calvet et al. (1992) observaram elevada produção de esporos vegetativos no micélio assimbiótico de *Glomus mosseae* desenvolvido em resíduos compostados, em relação ao tratamento em turfa não compostada. A baixa relação C/N do composto orgânico estudado é relatada como benéfica para FMA (Douds et al. 1997) e pode ter favorecido o processo.

O caráter alcalino do esterco bovino (Tabela 2) pode ter afetado negativamente o desenvolvimento dos FMA, visto que a concentração hidrogeniônica afeta o processo pré-simbiótico (Green et al. 1976). Trindade et al. (2000) observaram redução na colonização micorrízica em mudas de mamoeiro com o aumento da proporção de esterco bovino maturado no substrato. O comprometimento do processo pré-simbiótico em meio com esterco pode estar relacionado ao teor de N presente no resíduo (Tabela 2), visto que elevados teores deste macronutriente foram referidos como inibidores da simbiose (Bressan 2002). Outra provável explicação é a presença de substâncias fitotóxicas que são comumente encontradas em materiais não compostados (Kiehl 1998), como o esterco utilizado no presente estudo.

Em condições desfavoráveis, *G. albida* emite vários tubos germinativos (Maia et al. 1994), o que aumenta as chances do fungo encontrar e colonizar o hospedeiro (Giovannetti 2000). Essa estratégia poderia ter sido utilizada pelo fungo produzido apenas em solo, quando mantido nos tratamentos com composto orgânico, mas o comportamento pré-simbiótico similar entre os isolados não indica que isso tenha ocorrido.

A utilização de FMA adaptados às condições edafoclimáticas em que serão aplicados tem sido recomendadas (Azcón-Aguilar & Barea 1997) e respostas positivas de FMA adaptados a diversos fatores do solo foram descritas (Enkthuya et al. 2000; Weissenhorn et al. 1993; Malcová et al. 2003). No presente estudo, os benefícios da adaptação do isolado à condição orgânica variaram em função do tipo de material orgânico empregado no ensaio de germinação. Apesar do maior desenvolvimento assimbiótico ser esperado para o fungo multiplicado em condição orgânica, o propagado apenas em solo, também se mostrou adaptado à presença de composto orgânico no solo (Figuras 2 e 3). Este comportamento traduz possível plasticidade fenotípica, decorrente talvez da elevada quantidade de núcleos no esporo (Weissenhorn et al. 1994). Por outro lado, Meharg & Cairney (2000) sugerem que em substratos com maiores pressões seletivas, tal como o elevado teor de P (53 mg dm^{-3}) no substrato com composto orgânico utilizado para multiplicação de *G. albida*, genes codificadores da tolerância são expressos em elevadas taxas e transferidos dentro da população de FMA, conferindo melhores respostas em relação a isolados multiplicados em meio sem pressão de seleção. No presente trabalho, esta hipótese é suportada apenas em substrato adubado com terra vegetal, onde maiores taxas de germinação e de crescimento micelial foram obtidas a partir de esporos produzidos em condição orgânica (Figura 1). Apesar de ser considerado que os FMA adaptados às condições edafoclimáticas são fisiologicamente superiores aos não adaptados, verifica-se que as respostas são também mediadas pela composição do meio de crescimento.

Conforme ressaltado por Giovannetti (2000), respostas diferenciadas no crescimento assimbiótico são observadas em relação aos nutrientes do meio. Elevadas proporções do composto orgânico reduziram o crescimento micelial do isolado multiplicado em substrato adubado (Figura 3). A elevada concentração de P no substrato pode não ter sido a responsável por essa resposta, uma vez que este macronutriente tem efeitos deletérios mais pronunciados na fase simbiótica (Bressan 2002) do que na fase assimbiótica (Koske 1981). Por outro lado, a presença de elevados teores de N no tratamento com maior nível de adubação (30 %) pode ter comprometido o desenvolvimento micelial inicial, tal como observado por Bressan (2001). Outra provável explicação para a inibição do crescimento micelial é a elevada quantidade de

húmus em materiais compostados (Kiehl 1998). Vallini et al. (1993) observaram que o aumento na concentração de ácidos húmicos no meio de crescimento reduziu o comprimento da hifa germinativa de *Glomus mosseae*.

Representantes de *Gigaspora* Gerdemann & Trappe emend. Walker & Sanders formam células auxiliares no solo (Schenck & Pérez 1990). Supõe-se que essas estruturas extra-radiculares estão mais relacionadas às características intrínsecas do esporo do que associadas à composição do meio de crescimento (Silva & Siqueira 1991). As alterações morfológicas observadas em *G. albida* (número 1) (Figura 6), podem ser decorrentes da sua multiplicação em substrato com adubo, o que se traduziu pela formação de células auxiliares com morfologia diferenciada daquela característica do gênero, que apresenta células com ornamentações espinhosas (Schenck & Smith 1982). Relatos de modificações na morfologia do micélio assimbiótico também foram registrados por Mayo et al. (1986), os quais observaram que a eliminação de bactérias associadas aos esporos de *Glomus versiforme* (Karsten) Buch favoreceu a formação de micélio com protuberâncias, o que não ocorreu no micélio originado de esporos sem desinfestação. Entretanto, avaliações de esporos provenientes de vários ciclos consecutivos de multiplicação em substrato adubado são necessárias para comprovar se esta alteração seria decorrente de adaptação ou mutação.

Não é claro se a perda das espinescências, registrada nas células auxiliares produzidas por *G. albida* multiplicado em substrato com adubo, aumentaria as chances de emissão de hifas por essa estrutura ou se reduziria o gasto metabólico para a produção dessas ornamentações. Contudo, os ganhos não iriam se traduzir em garantia de colonização do hospedeiro, dada a incapacidade dessas estruturas funcionarem como fonte de inóculo micorrízico (Bierman & Linderman 1983). A emissão de hifas a partir de células auxiliares de *Scutellospora reticulata* (Koske, Miller & Walker) Walker & Sanders foi recentemente constatada por Declerck et al. (2004), entretanto, o micélio formado não foi hábil em colonizar as raízes de *Allium porrum* L. e de *Daucus carota* L.

Os dados obtidos sugerem que deve ser feita seleção criteriosa da quantidade e tipo de resíduo empregado em sistemas agrícolas orgânicos, visto que adubações inadequadas podem afetar os benefícios da simbiose micorrízica arbuscular pelo comprometimento da fase assimbiótica dos fungos que formam essa associação.

Referências bibliográficas

- Alguacil MM, Hernández T, Caravaca F, Portillo B, Roldán A (2003) Antioxidant enzyme activities in shoots from three mycorrhizal shrub species afforested in a degraded semi-arid soil. *Physiol Plant* 118: 562-570
- Azcón-Aguilar C, Barea JM (1997) Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Sci Hortic* 68: 1-24
- Bartolome-Esteban H, Schenck NC (1994) Spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to aluminum soil saturation. *Mycologia* 86: 217-226
- Becard G, Kosuta S, Tamasloukht M, Séjalon-Delmas N, Roux C (2004) Partner communication in the arbuscular mycorrhizal interaction. *Can J Bot* 82: 1186-1197
- Becard G, Piché Y, Fortin JA (1989) Some aspects on the biotrophy of VAM fungi. *Agric Ecosyst Environ* 29: 29-33
- Bierman B, Linderman, RG (1983) Use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots, intraradical vesicles and extraradical vesicles as inoculum. *New Phytol* 95: 97-105
- Bressan W (2002) Factors affecting “in vitro” plant development and root colonization of sweet potato by *Glomus etunicatum* Becker & Hall. *Braz J Microbiol* 33: 31-34
- Bressan W (2001) The interactive effect of phosphorus and nitrogen on “in vitro” spore germination of *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann, root growth and mycorrhizal colonization. *Braz J Microbiol* 32: 276-280
- Calvet C, Estaun V, Camprubi A (1992) Germination, early mycelial growth and infectivity of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in organic substrates. *Symbiosis* 14: 405-411
- Caravaca F, Hernández F, García C, Roldán A (2002a) Improvement of rhizosphere aggregate stability of afforested semiarid plants species subjected to mycorrhizal inoculation and compost addition. *Geoderma* 108: 133-144
- Caravaca F, Barea JM, Roldán A (2002b) Synergistic influence of an arbuscular mycorrhizal fungus and organic amendment on *Pistacia lentiscus* L. seedlings afforested in a degraded semiarid soil. *Soil Biol Biochem* 34: 1139-1145
- Carpenter-Boggs L, Loynachan TE, Stahl PD (1995) Spore germination of *Gigaspora margarita* stimulated by volatiles of soil-isolated actinomycetes. *Soil Biol Biochem* 11: 1445-1451
- Carter MR (2002) Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. *Agron J* 94: 38-47

- Daniels BA, Trappe JM (1980) Factors affecting spores germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. Mycologia: 457-471
- Douds Jr DD, Galvez L, Franke-Snyder M, Reiders C, Drinkwater LE (1997). Effect of compost addition and crop rotation point upon VAM fungi. Agric Ecosyst Environ 65: 257-266.
- Declerck S, D'Or D, Bivort C, Souza FA (2004). Development of extraradical mycelium of *Scutellospora reticulata* under root-organ culture: spore production and function of auxiliar cells. Mycol. Res. 108: 84-92.
- Embrapa Progamma NTIA (1996) Centro de Pesquisa Tecnológica em informática para a agricultura. SWNTIA, Campinas, versão 4.2.1.
- Enkhtuya B, Rydlová J, Vosátka M (2000) Effectiveness of indigenous and non-indigenous isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in soils from degraded ecosystems and man-made habitats. Appl Soil Ecol 14: 201-211
- Fernandes SAP, Bettiol W, Cerri CC (2005) Effect os sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. Appl Soil Ecol 30: 65-77
- Gerdemann JW, Nicolson TH (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. Trans Br Mycol Soc 46: 235-244.
- Giovannetti M (2000) Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In: Kapulnik Y, Douds Jr DD (eds) Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function. Kluwer Academic Press, Netherlands, pp. 47-68
- Green NE, Graham SO, Schenck NC (1976) The influence of pH on the germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal spores. Mycologia 68: 929-934
- Gryndler M, Jansa J, Hrselová H, Chvátalová I, Vosátka M (2003) Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. Appl Soil Ecol 22 283-287
- Hepper CM, Warner A (1983) Role of organic matter in growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil. Trans Br Mycol Soc 81: 155-156
- Ishii T, Narutaki A, Sawada K, Aikawa J, Matsumoto I, Kodoya K (1997) Growth stimulatory substances for vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in bahia grass (*Paspalum notatum* Flügge) roots. Plant Soil 196: 301-304
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM (2003) The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenace of plant health and soil fertility. Biol Fertil Soils 37: 1-16
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. Plant Dis Rep 48: 692

- Kiehl EJ (ed) (1998) Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto. Editado pelo autor, Piracicaba
- Kim KY, Cho YS, Sohn BK, Park RD, Shim JH, Jung SJ, Kim YW, Seong KY (2002) Cold-storage of mixed inoculum of *Glomus intraradices* enhances root colonization, phosphorus status and growth of hot pepper. *Plant Soil* 238: 267-272
- Koske RE (1981) *Gigaspora gigantea*: observations on spore germination of VA-mycorrhizal fungus. *Mycologia* 73: 288-300
- Mader P, Edenhofer S, Boller T, Wiemken A, Niggli V (2000) Arbuscular mycorrhizae in a long-term field trial comparing low-input (organic, biological) and high-input (conventional) farming systems in a crop rotation. *Biol Fertil Soils* 31: 150-156
- Maia LC, Yano-Melo AM (2001) Germination and germ tube growth of the arbuscular mycorrhizal fungi *Gigaspora albida* in different substrates. *Braz J Microbiol* 32: 281-285
- Mayo K, Davis RE, Motta J (1986) Stimulation of germination of spores of *Glomus versiforme* by spore-associated bacteria. *Mycologia* 78: 426-431
- Malcová R, Rydlová J, Vosátka M (2003) Metal-free cultivation of *Glomus* sp. isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. *Mycorrhiza* 13: 151-157
- Meharg AA, Cairney JW (2000) Co-evolution of mycorrhizal and their hosts to metal-contamination environments. *Adv Ecol Res* 30: 69-112.
- Mielniczuk J (1999) Matéria orgânica e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. In: Santos GA, Camargo FAO (eds) Fundamentos da matéria orgânica do solo. Editora Gênese, Porto Alegre, pp. 1-8
- Newman EI (1966) A method of estimating the total length of root in a sample. *J Appl Ecol* 3: 139
- Nuttila AM, Vestberg M, Kauppinen V (1995) Infection of hairy roots of strawberry (*Fragaria x Ananana* Duch) with arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Cell Rep* 14: 505-509
- Palenzuela J, Azcón-Aguilar C, Figueroa D, Caravaca F, Roldán A, Barea JM (2002) Effects of mycorrhizal inoculation of shrubs from Mediterranean ecosystems and composted residue application on transplant performance and mycorrhizal developments in a desertified soil. *Biol Fertil Soils* 36: 170-175.
- Paul EA, Clark FE (1989) Carbon cycling and soil organic matter. In: Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, pp. 91-114.
- Schenck NC, Pérez Y (1990) Manual for the identification of VA mycorrhizal fungi. 3rd ed, Synergistic Publications, Gainesville

- Schenck NC, Smith GS (1982) Additional new and unreported species of mycorrhizal fungi (Endogonaceae) from Florida. *Mycologia* 74: 77-92.
- Silva LRG, Siqueira JO (1991) Efeito de carboidratos e ácidos sobre o crescimento micelial do fungo endomicorrízico *Gigaspora gigantea* “in vitro”. *Pesqui Agropecu Bras* 26: 2007-2014
- Siqueira JO, Sylvia DM, Gibson J, Hubbell DH (1985) Spores, germination, and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can J Microbiol* 31: 965-972.
- St. John TV, Coleman DC, Reid PP (1983) Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae with soil organic particles. *Ecology* 64: 957-959
- Sylvia DM, Schenck NC (1983) Germination of chlamidospores of three *Glomus* species as affected by soil matric potential and fungal contamination. *Mycologia* 75: 30-35
- Tanu, Prakash A, Adholeya A (2004) Effect of different organic manures/compost on the herbage and essential oil yield of *Cymbopogon winterianus* and their influence on the native AM population in a marginal afisol. *Bioresour Technol* 92: 311-319
- Trindade AV, Faria NG, Almeida FP (2000) Uso de esterco bovino no desenvolvimento de mudas de mamoeiro colonizados com fungos micorrízicos. *Pesqui Agropecu Bras* 35: 1389-1394
- Vallini G, Pera A, Avio L, Valdrighi M, Giovannetti M (1993) Influence of humic acids on laurel growth, associated rhizospheric microorganisms, and mycorrhizal fungi. *Biol Fertil Soils* 16: 1-4
- Varela-Castejón C, González-Pentalta B, Vilariño A, Sainz MJ (1998) Fluorescent light inhibits the germination of propagules on the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus macrocarpum*. *Soil Biol Biochem* 30: 1845-1847
- Wagner GH, Wolf DC (1998) Carbon transformation and soil organic matter formation. In: Sylvia DM, Fuhrmann JJ, Hartel PG, Zubeber DA (eds). *Principles and Applications of Soil Microbiology*. Prentice-Hall, New Jersey, pp. 218-258
- Warner A (1984) Colonization of organic matter by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Trans Br Mycol Soc* 82: 352-354
- Weissenhorn I, Leyval C, Berthelin J (1993) Cd-tolerant arbuscular mycorrhizal (AM) fungi from heavy-metal polluted soils. *Plant Soil* 157: 247-256
- Weissenhorn I, Glashoff A, Leyval C, Berthelin B (1994) Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soil. *Plant Soil* 167: 189-196

Zonta EP, Machado AA, Silveira Júnior P (eds) (1984) Sistema de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Dep. Mat. Estat., Pelotas

Capítulo 6

*Fungos micorrízicos arbusculares multiplicados em substrato com adubo orgânico
favorecendo a formação de mudas orgânicas de Passiflora alata Curtis:
uma questão de adaptação?*

*Artigo a ser submetido para publicação no
periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira*

**Fungos micorrízicos arbusculares multiplicados em substrato com adubo orgânico
favorecendo a formação de mudas orgânicas de *Passiflora alata* Curtis:
uma questão de adaptação?**

Fábio Sérgio Barbosa da Silva^{1,4}; Adriana Mayumi Yano-Melo^{2,4};
Uided Maaze Tiburcio Cavalcante^{2,4}; Maryluce Albuquerque da Silva^{1,4} &
Leonor Costa Maia^{3,4*}

¹Biólogo, doutorando em Biologia de Fungos (fsbsbarbosa@bol.com.br;
marylucealbuquerque@bol.com.br)

²Bióloga, Dr. em Ciências Biológicas(amymelo17@hotmail.com; umaaze@yahoo.com.br)

³Bióloga, PhD em Fitopatologia *(leonorcmaia@yahoo.com.br)

⁴Laboratório de Micorrizas, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, PE, Brasil

*autor para correspondência

Resumo – (Fungos micorrízicos arbusculares multiplicados em substrato com adubo orgânico favorecendo a formação de mudas orgânicas de *Passiflora alata* Curtis: uma questão de adaptação?) Avaliou-se a aplicação de composto orgânico na produção de mudas de maracujazeiro-doce associadas a fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus etunicatum*, *Acaulospora longula*, *Gigaspora albida* e *Scutellospora heterogama*) multiplicados em solo ou substrato + 10 % de resíduos orgânicos. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em fatorial de 9×2 : quatro FMA multiplicados em solo, quatro em substrato + adubo orgânico e um controle \times dois substratos (com ou sem composto orgânico), 4 repetições. Após 42 dias avaliou-se: altura; produção foliar; massa seca da parte aérea; área foliar; produção de esporos e de glomalina; colonização radicular. A adubação associada a micorrização proporcionou maior crescimento, sendo os maiores benefícios com *G. albida* produzido em substrato + adubo orgânico, resultando em incrementos de 90 % e 92 % para massa seca da parte aérea e área foliar, respectivamente, em relação ao controle. *G. etunicatum* favoreceu o crescimento das mudas, apenas quando multiplicado em solo sem adubo; os resultados com *A. longula* não foram afetados pela condição de multiplicação. A glomalina e a esporulação não foram influenciadas pela adubação. Mudas associadas a *G. albida* (multiplicado em substrato com resíduo orgânico), produzidas em solo + composto orgânico, apresentam maior crescimento, colonização micorrízica e redução de 60 % do tempo de formação, indicando que a micorrização, condicionada à adubação orgânica, constitui ferramenta eficaz na produção orgânica de mudas desta fruteira.

Termos para indexação: **maracujazeiro-doce, composto orgânico, micorriza arbuscular**

Introdução

Entre as alternativas biotecnológicas que podem aumentar a produtividade de culturas economicamente importantes está a aplicação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA). Para proporcionar efetivos benefícios em culturas agrícolas, é necessária a prévia seleção de inóculo de FMA, visto que há diferentes graus de compatibilidade entre o hospedeiro e o micobionte (Costa et al., 2001; Sylvia et al., 2003). Nesse aspecto, é recomendada a utilização de FMA adaptados às condições edafo-climáticas onde serão aplicados (Azcón-Aguilar & Barea, 1997), devido à melhor eficiência desses fungos nessa situação (Gonzalez-Chavez et al., 2002). Entretanto, pouco se conhece sobre o potencial de FMA adaptados à adubação orgânica na produtividade vegetal em sistemas orgânicos.

A busca pela sustentabilidade e redução nos custos de produção em sistemas agrícolas tem favorecido a utilização de fontes orgânicas que maximizem a produção vegetal sem comprometer a qualidade edáfica. Adubos orgânicos melhoram a agregação das partículas do solo, a capacidade tamponante e de troca catiônica, o teor de nutrientes (Paul & Clarck, 1989), além de beneficiar a atividade microbiana do solo (Caravaca et al., 2004). Em sistemas micorrízicos, a suplementação do solo com fontes orgânicas pode favorecer o desenvolvimento de FMA tanto no solo (Frey & Ellis, 1997) quanto na raiz (Murphy et al., 2000).

O maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) é a segunda espécie de Passifloraceae em importância econômica no Brasil (Vasconcelos et al., 2001). Da mesma forma que o maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) depende da associação micorrízica arbuscular para pleno desenvolvimento (Cavalcante et al., 2002), especialmente em solo com baixo teor de fósforo; Anjos (2004) e Silva et al. (2004) constataram que a mesma condição ocorre em maracujazeiro-doce.

Apesar do efeito sinérgico positivo da aplicação conjunta de adubos orgânicos e da inoculação com FMA no crescimento vegetal (Caravaca et al., 2003), não se conhece este efeito na formação de mudas de maracujazeiro-doce. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho selecionar FMA eficiente em promover o crescimento de maracujazeiro-doce em solo adubado com composto orgânico, e verificar se a eficiência do fungo era influenciada pelo substrato de produção do inóculo.

Material e métodos

Sementes de maracujazeiro-doce (*P. alata*) foram desinfestadas com NaOCl-20% (2% cloro ativo) por 2 minutos, lavadas em água destilada e colocadas para germinar em solo e areia (2:1 v/v), previamente desinfestado.

Os tratamentos de inoculação com FMA e condições de propagação dos fungos são apresentados na Tabela 1; em todos os potes de cultura usou-se o painço (*Panicum miliaceum* L.) como hospedeiro. Após multiplicação, o solo-inóculo (esporos e raízes colonizadas) foi seco e mantido a 4 °C por três meses, antes de ser utilizado (Kim et al., 2002). Em experimentos anteriores (Silva et al., dados não publicados), esses substratos foram os mais promissores para produção de inóculo dos FMA testados. Os FMA multiplicados em solo foram utilizados como controle.

Tabela 1. Condições da produção e densidade dos inóculos de FMA

Inóculo FMA	Espécie (acesso)	Substrato de multiplicação	Densidade do inóculo*
Ga-Org	<i>Gigaspora albida</i> Schenck & Smith (UFPE 01)	Solo + CO (10% v/v)	20,66
Ga-S	<i>Gigaspora albida</i>	Solo	18,58
Ge-Org	<i>Glomus etunicatum</i> Becker & Gerd. (UFPE 06)	Areia + TV (10% v/v)	92,24
Ge-S	<i>Glomus etunicatum</i> (UFPE 06)	Solo	101,03
Sh-Org	<i>Scutellospora heterogama</i> (Nicol. & Gerd.) Walker & Sanders (UFPE 19)	Areia + TV (10% v/v)	10,27
Sh-S	<i>Scutellospora heterogama</i> (UFPE 19)	Solo	18,00
Al-Org	<i>Acaulospora longula</i> Spain & Schenck (UFPE 21)	Areia + TV (10% v/v)	103,12
Al-S	<i>Acaulospora longula</i> (UFPE 21)	Solo	100,17

*esporos g⁻¹; CO= composto orgânico; TV= terra vegetal.

Como substrato para o experimento foi usado solo franco argilo arenoso desinfestado com Bromex[®] (98% de brometo de metila e 2% de cloropicrina) por 5 dias. Parte do substrato foi adubado (10% v/v) com composto orgânico (Tabela 2), proveniente da compostagem de frutas e verduras impróprias para comercialização na CEAGEPE/Unidade CEASA/Recife.

Tabela 2. Caracterização química dos substratos utilizados para multiplicação dos FMA e para cultivo do maracujazeiro-doce

Substratos	pH	P*	C	N	CTC	C/N
	(H ₂ O-1:2,5)	(mg dm ⁻³)	(g Kg ⁻¹)		(cmol _c dm ⁻³)	
Multiplicação de FMA						
Solo	4,6	4	13,3	1,2	1,69	11,08
Solo+10% CO	5,6	53	26,1	2,0	9,89	13,05
Areia+10% TV	6,1	65	4,0	0,3	3,38	13,33
Cultivo do maracujazeiro						
Solo	4,7	4	38,5	1,16	11,35	33,19
Solo+10% CO	5,0	42	44,4	2,03	13,25	21,87

CO=composto orgânico; TV=terra vegetal; CTC=capacidade de troca catiônica; *Mehlich I.

Plântulas de maracujá com duas folhas definitivas foram transferidas para potes com capacidade para 200 g de substrato e nessa ocasião inoculadas na região das raízes com solo-inóculo fornecendo 200 esporos de FMA/pote, de acordo com o tratamento. Após 15 dias, foram transplantadas para vasos de 1 Kg com o mesmo substrato. Nos tratamentos controle foram adicionados 2 mL de filtrado (45 µm), oriundo do peneiramento de todos os inóculos testados (20 g dos inóculos em 200 mL de H₂O destilada), visando equilibrar a microbiota do solo, exceto FMA. O experimento foi mantido em telado, sob condições ambientais de luminosidade, temperatura (T_{max}: 37,04 °C; T_{min}: 26,69 °C) e umidade (UR_{max}: 38,86%; UR_{min}: 80,45%).

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 9 (Controle não inoculado, Ga-Org, Ga-S, Ge-Org, Ge-S, Sh-Org, Sh-S, Al-Org e Al-S) × 2 tipos de substrato de cultivo das mudas (com ou sem adição de composto orgânico) em 4 repetições, totalizando 72 unidades experimentais.

O experimento foi colhido 42 dias após a inoculação, ocasião em que houve emissão de gavinhas, sendo avaliados: altura, número de folhas, diâmetro do caule a 3 cm do solo, massa seca da parte aérea, área foliar, incremento no crescimento; produção de esporos (Gerdemann & Nicolson, 1963; Jenkins, 1964) e de glomalina no solo (Wright & Upadhyaya, 1998). Após diafanização das raízes em KOH (10 % p/v) e coloração com azul de Trypan (0,05%) em lactoglicerol (Phillips & Hayman, 1970), foram avaliadas a percentagem de colonização micorrízica total, arbuscular, hifálica e vesicular (Mc Gonigle et al., 1990). A

massa seca foi obtida após secagem em estufa de circulação de ar até peso constante, e a área foliar avaliada usando o Programa Sigma Pró Scan 5. Para determinar o incremento produzido pela presença do FMA utilizou-se a fórmula de Edington *et al.* (1971) adaptada: $I(\%) = [(Tr - T)/Tr] \times 100$, onde $I(\%)$ = incremento da variável; Tr = valor médio para o tratamento micorrizado e T = valor médio do controle não inoculado.

Para análise, os dados de densidade de esporos foram transformados em $\log(x + 1)$, colonização micorrízica total, arbuscular e hifálica em arco seno ($\sqrt{x}/100$) e colonização vesicular em $\sqrt{x} + 0,5$. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), utilizando o programa Sanest.

Resultados

Houve efeito significativo ($P < 0,001$) da interação entre inoculação de FMA e adubação do substrato para diâmetro do caule, altura, massa seca aérea, área foliar e colonização micorrízica total, arbuscular, hifálica e vesicular das mudas de maracujazeiro-doce. Para a densidade de esporos houve efeito apenas dos tratamentos de inoculação, enquanto a produção de glomalina não foi afetada pelos fatores testados ($P > 0,05$).

Em geral, a aplicação de adubo orgânico oriundo da compostagem, juntamente com a inoculação com FMA, favoreceu o crescimento das mudas em comparação com o controle não inoculado (Tabela 3). As mudas associadas a *S. heterogama* multiplicado em solo, não foram beneficiadas pela micorrização exceto em relação à área foliar, no tratamento usando solo + composto orgânico. Por outro lado, nos tratamentos com *S. heterogama* multiplicado em terra vegetal, houve respostas positivas de crescimento nos demais parâmetros quando se usou solo + 10 % composto orgânico como substrato de cultivo das mudas.

Em solo adubado, apenas as mudas inoculadas com o isolado de *G. albida* multiplicado em substrato com adubo orgânico emitiram gavinhas; nestas condições, este isolado proporcionou melhores respostas do maracujazeiro-doce em todos os parâmetros estudados, o que foi traduzido por incrementos de 90 % e 92 %, para massa seca da parte aérea e área foliar, respectivamente, em relação ao controle não inoculado. No solo com adubo, com exceção da altura, as mudas associadas a *G. albida* multiplicado em solo com resíduo orgânico e *G. etunicatum* oriundo de solo sem adubação apresentaram o mesmo padrão de crescimento (Tabela 3).

Tabela 3. Diâmetro do caule, altura, massa seca da parte aérea e área foliar de mudas de maracujazeiro-doce, inoculadas com FMA multiplicados em substrato com adubo orgânico e cultivadas em solo com ou sem composto orgânico, 42 dias após a inoculação

Inoculação	Diâmetro do caule		Altura		Massa seca aérea		Área foliar	
	solo	solo+CO	solo	solo+CO	solo	solo+CO	solo	solo+CO
NI	1,60 bA	1,57 cA	4,25 aA	4,20 eA	0,06 bA	0,17 fA	16,32 cA	39,48 eA
Ga-Org	2,31 aB	3,20 aA	7,50 aB	20,85 aA	0,57 aB	1,69 aA	200,50 aB	478,50 aA
Ga-S	2,33 aB	2,72 bA	7,07 aB	11,35 bcA	0,41 abB	1,14 bcA	133,40 abB	315,90 bcA
Ge-Org	1,60 bB	2,62 bA	5,27 aB	8,87 cdA	0,14 bB	0,69 deA	46,23 bcB	215,90 cdA
Ge-S	1,70 bB	3,20 aA	5,40 aB	15,00 bA	0,22 bB	1,41 abA	64,69 bcB	377,50 abA
Sh-Org	1,96 abB	2,55 bA	6,57 aB	9,17 cdA	0,29 abB	0,84 cdA	44,98 bcA	98,40 eA
Sh-S	1,70 bA	1,92 cA	5,52 aA	6,47 deA	0,16 bA	0,37 efA	87,90 bcB	276,10 bcdA
Al-Org	1,65 bB	2,65 bA	5,52 aB	10,32 cA	0,18 bB	0,96 cdA	53,48 bcB	268,90 cdA
Al-S	1,67 bB	2,52 bA	5,60 aB	8,47 cdA	0,07 bB	0,71 deA	31,54 bcB	202,90 dA

CO= composto orgânico; Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*; C= não inoculado (controle); S=FMA multiplicado em solo; Org=FMA multiplicado em substrato com adubo orgânico. Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Em solo suplementado com composto orgânico, *G. albida* e *S. heterogama* multiplicados em substrato com adubo promoveram as melhores respostas no crescimento das mudas do que os isolados oriundos de multiplicação em solo. O inverso ocorreu com *G. etunicatum*; neste caso, melhores respostas foram obtidas com o isolado multiplicado em solo sem adubo. Por outro lado, a condição de multiplicação de *A. longula* não afetou as variáveis testadas (Tabela 3).

De modo geral, não se evidenciou efeito da condição de multiplicação dos FMA, no crescimento das mudas cultivadas em solo não adubado. Nesta condição, melhores respostas de crescimento de *P. alata* foram registradas com a inoculação de *G. albida* (Tabela 3) com incrementos de 90 % e 92 % para massa seca da parte aérea e área foliar, respectivamente, em relação ao controle não inoculado.

Na ausência de adubação, maior colonização micorrízica total foi observada em plantas inoculadas com *G. albida* multiplicado em solo ou em solo + adubo orgânico e com *S. heterogama* oriundo da multiplicação em solo + adubo, diferindo estatisticamente da colonização produzida pelos demais fungos (Tabela 4). Maior desenvolvimento de hifas foi observado em raízes inoculadas com *S. heterogama* multiplicado em substrato com adubo,

enquanto maior colonização arbuscular tenha sido registrada em raízes associadas com *G. albida* (Tabela 4).

A colonização por hifas foi beneficiada pela presença do composto orgânico no meio de cultivo. Neste substrato, o isolado de *G. albida* multiplicado em condição orgânica produziu maior colonização hifálica do que aquele oriundo de multiplicação em solo. Por outro lado, a condição de multiplicação não influenciou a formação de arbúsculos (Tabela 4).

A produção de glomalina não diferiu entre os FMA e não foi afetada pela presença de adubo no meio de crescimento (Tabela 4).

Tabela 4. Percentual de colonização micorrízica total (CT), por hifas (CH) e arbúsculos (CA) e produção de glomalina em mudas de maracujazeiro-doce, inoculadas com isolados de FMA multiplicados em substrato com adubo orgânico e cultivadas em solo com ou sem composto orgânico, 42 dias após a inoculação, em casa de vegetação

Inoculação	CT (%)		CH (%)		CA (%)		Glomalina* (mg g agregado ⁻¹)	
	Solo	Solo+CO	Solo	Solo+CO	Solo	Solo+CO	Solo	Solo+CO
C	0,0 dA	0,7 eA	0,0 dA	0,7 eA	0,0 dA	0,0 dA	9,9 aA	9,7 aA
Ga-Org	79,6 aA	85,1 aA	11,8 bcB	30,1 abcA	67,8 aA	55,0 aB	10,2 aA	10,8 aA
Ga-S	71,2 aA	71,0 abA	19,3 bA	7,0 deB	52,0 aA	64,0 aA	11,4 aA	10,7 aA
Ge-Org	2,9 cdB	40,1 cdA	1,4 cdB	23,2 bcdA	1,5 cdB	16,9 bA	10,6 aA	10,3 aA
Ge-S	23,3 bA	16,2 dA	7,8 bcA	11,0 cdeA	15,5 bA	5,9 bcB	10,6 aA	10,7 aA
Sh-Org	55,4 aA	52,4 bcA	49,9 aA	49,1 aA	5,5 bcA	3,2 cdA	10,1 aA	11,5 aA
Sh-S	11,4 bcdB	50,6 bcA	9,5 bcdB	47,6 abA	1,9 cdA	2,9 cdA	10,8 aA	8,9 aA
Al-Org	10,4 bcB	42,7 bcdA	6,1 bcdB	26,6 abcA	3,9 cdA	0,5 cdA	10,8 aA	10,5 aA
Al-S	6,6 bcdB	36,9 cdA	3,8 bcdB	22,1 cdA	1,0 cdA	2,0 cdA	11,0 aA	10,9 aA

*1-2mm diâmetro; CO= composto orgânico; Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*; C= não inoculado (controle); S=FMA multiplicado em solo; Org=FMA multiplicado em substrato com adubo orgânico.

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente (P<0,05).

Não foram observadas vesículas nas raízes associadas a *G. etunicatum*, enquanto naquelas em simbiose com *A. longula* a adubação favoreceu a formação dessas estruturas (Tabela 5).

Tabela 5. Percentual de colonização vesicular por *Acaulospora longula*, multiplicado em substrato com (Org) ou sem (S) adubo orgânico, nas raízes de maracujazeiro-doce cultivado em solo com ou sem composto orgânico, 42 dias após a inoculação, em casa de vegetação

Inoculação	Substratos	
	Solo	Solo + 10 % CO
Al-S	0,34 aB	1,83 aA
Al-Org	10,54 aB	12,77 aA

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente ($P < 0,05$).

Não houve diferenças significativas na esporulação dos FMA considerando o substrato onde as mudas foram cultivadas. No entanto, *G. albida* multiplicado em solo com adubo produziu maior quantidade de esporos que os demais fungos (Tabela 6).

Tabela 6. Número de esporos de FMA na rizosfera de mudas de maracujazeiro-doce inoculadas com isolados multiplicados em solo e em substrato com adubo orgânico, independentemente do tipo de substrato de cultivo, 42 dias após a inoculação

	FMA / origem do inóculo							
	<i>G. albida</i>		<i>A. longula</i>		<i>G. etunicatum</i>		<i>S. heterogama</i>	
	Org	S	Org	S	Org	S	Org	S
Nº esporos. g ⁻¹ solo	2,15a	1,34b	0,83bc	0,69cd	0,10e	0,17de	0,05e	0,05e

Ga= *Gigaspora albida*; Ge= *Glomus etunicatum*; Sh= *Scutellospora heterogama*; Al= *Acaulospora longula*; C= não inoculado (controle); S=FMA multiplicado em solo; Org=FMA multiplicado em substrato com adubo orgânico.

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Discussão

O isolado de *G. albida*, que maximizou o crescimento das mudas de *P. alata* em solo com ou sem composto orgânico, usado neste trabalho, promoveu o crescimento do maracujazeiro-amarelo (Cavalcante et al., 2002) e do maracujazeiro-doce (Silva et al., 2004).

A incorporação de resíduos orgânicos favorece o crescimento vegetal devido à melhoria das condições físico-químicas e biológicas do solo. No entanto, no presente estudo, os benefícios da adubação orgânica não foram evidenciados em plantas não micorrizadas, mesmo

com o substrato adubado apresentando 42 mg P dm⁻³ (Tabela 2), o que confirma o micotrofismo de *P. alata*, constatado por Anjos (2004).

A micorrização, segundo Johnson (1998), pode ser favorecida pela presença de matéria orgânica em solos pobres, considerando que há aumento no teor de nutrientes no solo adubado, especialmente em relação aos teores de N e P como observado no experimento (Tabela 1), sendo este aspecto verificado na resposta da interação entre FMA e adubação orgânica para o crescimento de maracujazeiro-doce. Similarmente, Caravaca et al. (2003) relataram o efeito sinérgico positivo da aplicação de resíduos orgânicos e de FMA no crescimento vegetal.

Os benefícios da inoculação com FMA e adição de composto orgânico registrados no presente estudo podem ser atribuídos à melhor utilização, pelas hifas, de P e N orgânicos (Hodge et al., 2001) e à melhoria da estruturação do solo, decorrente da adubação. Adicionalmente tem sido observado que maior produção de hifas em meio com matéria orgânica (Frey & Ellis, 1997) pode favorecer a formação de extensa rede micelial que propicia aumento no crescimento de mudas devido à maior absorção de nutrientes.

Mesmo em substrato adubado, os isolados de *S. heterogama* e de *A. longula* multiplicados em solo sem adubo não foram capazes de incrementar o crescimento das mudas. No tratamento com *S. heterogama* a ineficiência simbiótica pode estar relacionada às respostas tardias do isolado multiplicado em solo, comportamento observado em mudas de maracujazeiro-amarelo associadas a esse isolado (Cavalcante et al., 2002). Entretanto, quando multiplicado em meio com adubo, o isolado de *S. heterogama* mostrou-se eficiente em promover o crescimento do maracujazeiro-doce, evidenciando que a condição de multiplicação influencia a atuação do fungo micorrízico.

Comportamento diferenciado com relação à estratégia de colonização de FMA pertencentes a famílias distintas foi observado por Hart & Reader (2002). No presente estudo, foi constatado que o benefício da micorrização variou de acordo com a espécie de FMA. Os isolados de *G. albida* e *S. heterogama*, multiplicados em substrato com adubo orgânico, promoveram maiores benefícios ao hospedeiro do que os isolados multiplicados apenas em solo, ocorrendo o inverso com o isolado de *G. etunicatum*, enquanto com *A. longula* o substrato de multiplicação não influenciou os benefícios decorrentes da simbiose. Este comportamento sugere que o substrato para multiplicação pode aumentar a eficiência de isolados de Gigasporaceae, indicando certo grau de adaptação à condição de cultivo. Nesse aspecto, Muthukumar & Udaiyan (2002) consideram que a multiplicação de FMA em meio com resíduo orgânico constitui alternativa para manter e selecionar isolados mais eficientes. Scullion et al. (1998) observaram que FMA isolados de áreas com manejo orgânico foram mais

efetivos em promover o crescimento de *Trifolium repens* L. do que fungos oriundos de áreas com sistema de cultivo convencional, onde foram aplicados fertilizantes químicos. Além disso, há relatos sobre o efeito benéfico de FMA adaptados a diversas condições edáficas (Gonzalez-Chavez et al., 2002).

A melhor atuação dos FMA multiplicados em substrato suplementado com adubo orgânico, e testados também em condição orgânica, tal como observado no presente estudo, pode ser atribuída à tolerância dos isolados, principalmente ao P, adquirida durante a multiplicação, visto que em substratos com elevadas pressões seletivas, ocorre alta taxa de expressão de genes ligados à tolerância, que são transferidos dentro da população de FMA, conferindo melhores respostas simbióticas (Meharg & Cairney, 2000). Entretanto, o fraco desempenho do isolado de *G. etunicatum* multiplicado em substrato com terra vegetal em relação ao produzido apenas em solo, pode estar relacionado à plasticidade funcional desta espécie (Weissenhorn et al., 1994). Esse comportamento está de acordo com a hipótese proposta por Johnson (1993) de que a fertilização seleciona FMA menos eficientes em promover o crescimento do hospedeiro. Neste experimento, quando *G. etunicatum* foi multiplicado em substrato adubado que apresentava elevado teor de P (Tabela 2) foi menos efetivo em promover o crescimento do maracujazeiro-doce do que o inóculo oriundo da multiplicação em solo sem adubo. Fraco desempenho de espécies de *Glomus* Tulasne & Tulasne adaptadas a diversos fatores do solo, como salinidade (Tian et al., 2004), sobre o crescimento do hospedeiro tem sido registrado em relação a isolados não adaptados.

O meio de multiplicação não interferiu na eficiência de *A. longula* considerando que os dois isolados apresentaram comportamento simbiótico similar. O mesmo foi observado por Graham & Abbott (2000) com isolados de *Acaulospora laevis* Gerd. & Trappe que apresentavam diferentes graus de infectividade.

Elevada esporulação pode ser obtida com a aplicação adequada de fontes orgânicas (Gryndler et al., 2002); entretanto, a duração do experimento (42 dias) pode não ter sido suficiente para possibilitar a formação de grande número de esporos dos FMA testados. *Gigaspora albida* multiplicado em substrato com adubo orgânico foi o único FMA que teve destacada esporulação, independentemente do substrato de cultivo de *P. alata*, sendo essa característica importante na seleção de inoculantes, pois se busca isolados que além de beneficiar o hospedeiro produzam elevadas quantidades de propágulos no solo (Abbott et al., 1994).

Aumentos na taxa de colonização radicular foram referidos em diversos sistemas quando fontes orgânicas foram adicionadas ao substrato (Murphy et al., 2000). Entretanto,

apesar das melhores respostas de crescimento do maracujazeiro-doce terem sido obtidas com o isolado de *G. albida* produzido em condição orgânica isso não foi traduzido por maior produção de estruturas micorrízicas, em relação a *G. albida* multiplicado em solo. Os arbúsculos participam ativamente da transferência de nutrientes (Barker et al., 1998) entre os parceiros e influenciam a funcionalidade da simbiose, porém praticamente não houve diferença na colonização promovida por *G. albida* multiplicado em condições diferentes. Provavelmente, outras técnicas para avaliação da simbiose micorrízica, como a eficiência na aquisição de P entre os isolados (Munkvold et al., 2004) e a quantificação de micélio externo (Hart & Reader, 2002) possam detectar diferenças intraespecíficas.

Entre os FMA testados que formam vesículas, apenas *A. longula* produziu tais estruturas no córtex radicular de *P. alata*, sendo registrada maior quantidade em solo com adubo orgânico. Tal produção possivelmente foi relacionada à maior disponibilidade de nutrientes no meio suplementado com composto orgânico, visto que vesículas são estruturas de armazenamento (Smith & Read, 1997). A colonização extensiva do córtex radicular por espécies de Acaulosporaceae é tardia (Hart & Reader, 2002) o que pode ter contribuído para o efeito pouco destacado da simbiose formada por *A. longula*.

A adubação orgânica, na maioria das vezes, favorece a produção de micélio externo (Frey & Ellis, 1997) o qual é responsável pela síntese de glomalina (Wright & Upadhyaya, 1998). Entretanto, a produção de glomalina não diferiu entre os tratamentos, o que pode ser atribuído à curta duração do experimento, visto que boa parte da energia do fungo pode ter sido destinada à formação de colonização intraradicular e absorção de nutrientes do solo, não estando disponível para o metabolismo secundário e conseqüente formação da glicoproteína. Em experimento de longa duração (24 meses), Caravaca et al. (2005) registraram aumento na produção de glomalina na rizosfera de *Olea europaea* L., *Pistacia lentiscus* L., *Rentama sphaerocarpa* L. e *Rhamnus lycioides* L. associadas a *Glomus claroideum* Schenck & Smith, em relação às plantas controle sem inoculação.

A aplicação de FMA em mudas de fruteiras tem reduzido o tempo para transplântio ao campo, tal como mencionado para maracujazeiro amarelo (Cavalcante et al., 2002). Para maracujazeiro-doce são necessários 104 dias e aplicação de 25 % de esterco para formação de mudas com altura de 19 cm e presença de gavinhas, condições ideais para transplântio ao campo (Borges et al., 1995). A utilização de 10 % de composto orgânico associado à inoculação com *G. albida*, multiplicado em meio com composto orgânico, permitiu a formação de mudas com essas características em apenas 42 dias após a inoculação. A adoção desse sistema (FMA + adubo orgânico) reduziu tanto o tempo de formação da muda (ca. 60

%) quanto a dose adubo (ca. 60 %) necessária para promover o crescimento, em comparação com a dose recomendada de esterco (25 %) (Borges et al., 1995), constituindo alternativa de baixo custo na produção de mudas dessa frutífera.

Conclusões

1. O uso de adubo, obtido da compostagem de frutas e verduras, associado à micorrização estimula o crescimento de mudas de maracujazeiro-doce.
2. Mudas associadas a *G. albida* cujo inóculo foi multiplicado em substrato com resíduo orgânico têm o crescimento maximizado, com redução de 60 % no tempo necessário para o transplântio ao campo.
3. A eficiência do fungo é favorecida pela multiplicação de inóculo em substrato com adubo orgânico, sendo as respostas dependentes do isolado de FMA.

Referências bibliográficas

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; GAZEY, C. Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: NORRIS, J.R.; READ, D.; VARMA, A.K. (Eds.). **Techniques for mycorrhizal research**. London: Academic Press, 1994. p.461-481.
- ANJOS, E.C.T. **Dependência micorrízica do maracujazeiro doce (*Passiflora alata*) e comportamento de mudas micorrizadas ao parasitismo do nematóide das galhas *Meloidogyne incognita* raça 1**. 2004. 104p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, v.68, p.1-24, 1997.
- BARKER, S.J.; TAGU, D.; DELP, G. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. **Plant Physiology**, v.116, p.1201-1207, 1998.
- BORGES, A.L.; LIMA, A.A.; CALDAS, R.C. Adubação orgânica e química na formação de mudas de maracujazeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.17, p.17-22, 1995.
- CARAVACA, F.; ALGUACIL, M.M.; AZCÓN, R.; DÍAZ, G.; ROLDÁN, A. Comparing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and *Aspergillus niger* to enhance field performance of the leguminous shrub *Dorycnium pentaphyllum* L. **Applied Soil Ecology**, v.25, p.169-180, 2004.

- CARAVACA, F.; AGUALCIL, M.M.; BAREA, J.M.; ROLDÁN, A. Survival of inocula and native AMF fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 227-233, 2005.
- CARAVACA, F.; FIGUEROA, D.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M.; ROLDÁN, A. Medium-terms effects of mycorrhizal inoculation and composted municipal waste addition on the establishment of two Mediterranean shrub species under semiarid field conditions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.97, p.95-105, 2003.
- CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; MELO, A.M.M.; SANTOS, V.F. Influência da densidade de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.643-649, 2002.
- COSTA, C.M.C.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T.; 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**, v.36, p.893-901, 2001.
- EDINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazol compounds. **Phytopathology**, v.61, p.42-44, 1971.
- FREY, J.R.; ELLIS, J.R. Relationship of soil properties and soil amendments to response of *Glomus intraradices* and soybeans. **Canadian Journal of Botany**, v.75, p.483-491, 1997.
- GERDEMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.235-244, 1963.
- GRAHAM, J.H.; ABBOTT, L.K. Wheat responses to aggressive and non-aggressive arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.220, p.207-218, 2000.
- GONZALEZ-CHAVEZ, C.; D'HAEN, J.; VANGRONSVELD, J.; DODD, J.C. Copper sorption and accumulation by the extraradical mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil**, v.246, p.287-297, 2002.
- GRYNDLER, M.; VOSÁTKA, M.; HRSELOVÁ, H.; CHVÁTALOVÁ, I.; JANSÁ, J. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and cellulose in growth substrate. **Applied Soil Ecology**, v.19, p.279-288, 2002.
- HART, M.M.; READER, R.J. Does percent root length colonization and soil hyphal length reflect the extent of colonization of all AMF? **Mycorrhiza**, v.12, p.297-301, 2002.
- HODGE, A.; CAMPBELL, C.D.; FITTER, A.H. An arbuscular mycorrhizal fungus accelerates decomposition and acquires nitrogen directly from organic material. **Nature**, v.413, p.297-299, 2001.

- JENKINS, W.R. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v.48, p.692, 1964.
- JOHNSON, N.C. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? **Ecological Applications**, v.3, p.749-757, 1993.
- JOHNSON, N.C. Response of *Salsola kali* and *Panicum virgatum* to mycorrhizal fungi, phosphorus and soil organic matter: implications for reclamation. **Journal of Applied Ecology**, v.35, p.86-94, 1998.
- 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**, v.238, p.267-272, 2002.
- MEHARG, A.A.; CAIRNEY, J.W.G. Co-evolution of mycorrhizal and their hosts to metal-contamination environments. **Advances in Ecological Research**, v.30, p.69-112, 2000.
- MC GONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L.; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.115, p.495-501, 1990.
- MUNKVOLD, L.; KJØLLER, R.; VESTEBERG, M. ROSENDAHL, S.; JAKOBSEN, I. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist** **164**, p.357-364, 2004.
- MURPHY, J.G.; RAFFERTY, S.M.; CASSELIS, A.C. Stimulation of wild strawberry (*Fragaria vesca*) arbuscular mycorrhizas by addition of shellfish waste to the growth substrate: interaction between mycorrhization, substrate amendment and susceptibility to red core (*Phytophthora fragariae*). **Applied Soil Ecology**, v.15, p.153-158, 2000.
- MUTHUKUMAR, T.; UDAIYAN, K. Growth and yield of cowpea as influenced by changes in arbuscular mycorrhiza in response to organic manuring. **Journal Agronomy and Crop Science**, v.188, p.123-132, 2002.
- PAUL, E.A.; CLARCK, F.E. Carbon cycling and soil organic matter. In: **Soil Microbiology and Biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1989. p.91-114.
- PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. **Transactions of British Mycological Society**, v.55, p.158-161, 1970.
- SCULLION, J.; EASON, W.R.; SCOTT, E.P. The effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi from high input conventional and organic grassland and grass-arable rotations. **Plant and Soil**, v.204, p.243-254, 1998.

SILVA, M.A.; CAVALCANTE, U.M.T.; SILVA, F.S.B.; SOARES, S.A.G.; MAIA, L.C. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) associadas a fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota). **Acta Botânica Brasílica**, v.18, p.981-985, 2004.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2.ed. London: Academic Press, 1997. 605p.

SYLVIA, D.M.; ALAGELY, A.K.; KANE, M.E.; PHILMAN, N.L. Compatible host/mycorrhizal fungus combinations for micropropagated sea oats. I. Field sampling and greenhouse evaluations. **Mycorrhiza**, v.13, p.177-183, 2003.

TIAN, C.Y.; FENG, G.; LI, X.L.; ZHANG, F.S. Different effects of arbuscular mycorrhizal fungal isolates from saline or non-saline on salinity tolerance of plants. **Applied Soil Ecology**, v.26, p.143-148, 2004.

VASCONCELOS, M.A.S.; BRANDÃO FILHO, J.U.T.; VIEITES, R.L. Maracujá-doce. In: BRUCKNER, C.H.; PIKANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agro-indústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. p.33-49.

WEISSENHORN, I.; GLASHOFF, A.; LEYVAL, C.; BERTHELIN, B. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soil. **Plant and Soil**, v.167, p.189-196, 1994.

WRIGHT, S.F.; UPADHYAYA, A. A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, v.198, p.97-107, 1998.

Capítulo 7

*Substratos orgânicos na produção de mudas micorrizadas de maracujazeiro-doce e
na atividade microbiana do solo*

*Artigo a ser submetido para publicação no periódico
Pesquisa Agropecuária Brasileira*

Substratos orgânicos na produção de mudas micorrizadas de maracujazeiro-doce e na atividade microbiana do solo

Fábio Sérgio Barbosa da Silva¹; Adriana Mayumi Yano-Melo¹; Danielle K. Alves da Silva¹; Sônia Valéria Pereira² & Leonor Costa Maia^{1*}

¹Laboratório de Micorrizas, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, PE, Brasil.

²Instituto de Tecnologia de Pernambuco, Av. Prof. Luiz Freire, 700, Cidade Universitária, CEP 50740-540, Recife, PE, Brasil.

* autor para correspondência: leonorcmaia@yahoo.com

RESUMO

(Substratos orgânicos na produção de mudas micorrizadas de maracujazeiro-doce e na atividade microbiana do solo). Foi conduzido experimento visando selecionar substratos orgânicos que favoreçam a atuação do fungo micorrízico arbuscular (FMA) na produção de mudas de maracujazeiro-doce e a atividade microbiana do solo. Plântulas de *Passiflora alata* foram inoculadas ou não com *Gigaspora albida* e cultivadas em 4 substratos: (a) solo, (b) solo e esterco bovino maturado, (c) solo e palha de coco e (d) solo e terra vegetal, os três últimos na proporção 9:1 (v/v). O delineamento experimental foi em fatorial: 2 tratamentos de inoculação \times 4 tipos de substratos, 4 repetições. Após 46 dias foram avaliados: crescimento das mudas, colonização micorrízica total, hifálica e arbuscular, evolução de CO₂ e atividade de hidrólise do diacetato de fluoresceína. As mudas cultivadas em solo com esterco bovino cresceram duas vezes mais do que as mantidas nos demais substratos, com a micorrização favorecendo a formação de plantas mais desenvolvidas, resultando em incrementos de 157 % e 175 % para a área foliar e massa seca da parte aérea, respectivamente, em relação ao controle. Apenas a adição de palha de coco maximizou a colonização micorrízica total, enquanto a formação de arbúsculos foi estimulada por todas as fontes empregadas. A colonização por hifas não foi influenciada pelos substratos. Maior emissão de CO₂ ocorreu em solo com esterco bovino ou palha de coco, com o FMA contribuindo no processo. A micorrização favoreceu a atividade enzimática do solo apenas na presença de adubo. Entre os substratos o que inclui esterco bovino pode ser indicado para formação de mudas micorrizadas de maracujazeiro-doce, pois aumenta o crescimento das plantas e a atividade microbiana do solo.

Termos para indexação

Evolução de CO₂; FDA; micorriza arbuscular; *Passiflora alata*

Introdução

O maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) é a segunda espécie de Passifloraceae mais cultivada no Brasil, produzindo frutos que são consumidos principalmente *in natura*, devido às qualidades gustativas da polpa que é doce e acidulada (Manica & Oliveira Jr., 2005). As folhas são utilizadas na indústria farmacêutica para extração de princípios ativos como a passiflorina (Paris *et al.*, 2002). O cultivo desta frutífera tem se intensificado nos últimos anos, pois os frutos apresentam elevado valor agregado (Braga & Junqueira, 2000) e potencial para exportação (Cançado Júnior *et al.*, 2000). Contudo, um dos problemas atuais da cultura é a renovação de pomares com mudas certificadas e de qualidade (Melleti, 2001).

Uma das maneiras de reduzir os custos da adubação na fase de muda é a aplicação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Ilbas & Sahin, 2005). Quando em simbiose, as plantas associadas apresentam maior aporte nutricional, o que contribui para aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos. Esses benefícios têm sido evidenciados em espécies de *Passiflora* L. (Rodriguez *et al.*, 1995; Cavalcante *et al.*, 2002); em *P. alata* (maracujazeiro-doce) a micorrização favoreceu o crescimento e reduziu o tempo de formação das mudas para transplantio ao campo (Silva *et al.*, 2004; Anjos *et al.*, 2005).

A composição do substrato é importante para formação de mudas sadias. Nesse sentido, são recomendados para o maracujazeiro-doce, formulações à base de solo e fertilizantes químicos, podendo-se fazer uso de adubos orgânicos (Ruggiero *et al.*, 1996; Leonel & Pedroso, 2005). Porém, para garantir os benefícios da micorrização, a escolha do substrato é fundamental (Silveira *et al.*, 2003).

A redução na quantidade de adubos aplicados pode minimizar os custos de produção do viveirista. Nesse aspecto, Silva *et al.* (dados não publicados) obtiveram mudas de maracujazeiro-doce associadas a *Gigaspora albida* Schenck & Smith, em solo com apenas 10 % de composto orgânico, supostamente com economia de 60 % na dose de adubo aplicado e dispensando o uso de fertilizantes químicos no substrato de cultivo. Para obtenção de resultados similares, a seleção prévia de substratos é necessária, considerando que os benefícios da adubação podem variar de acordo com a fonte orgânica utilizada (Trindade *et al.*, 2003).

A necessidade de sistemas agrícolas sustentáveis gera preocupação com a qualidade do solo desde a fase de produção de mudas. Uma das maneiras de aumentar a qualidade edáfica é o emprego de fontes orgânicas em doses adequadas, visto que tais materiais, quando devidamente utilizados, melhoram as condições físicas, químicas e biológicas do solo (Abdelhamid *et al.*, 2004). Maior atividade microbiana, estimada pela evolução de CO₂ e

atividade de enzimas do solo, é freqüentemente observada em solo com fertilizantes orgânicos do que naqueles sem ou com adubo químico (García-Gil *et al.*, 2004). Por outro lado, os FMA favorecem o crescimento de vegetais em substratos com adubo orgânico, mas pouco se conhece sobre o papel que desempenham na atividade microbiana do solo (Wamberg *et al.*, 2003), que pode ser alterada pela presença desses fungos (Duponois *et al.*, 2005).

O objetivo deste trabalho foi selecionar substratos que favoreçam a atuação do fungo micorrízico sobre a produção de mudas de maracujazeiro-doce e a atividade microbiana do solo.

Material e métodos

Sementes de maracujazeiro-doce foram desinfestadas com NaOCl-20% (2% cloro ativo) por 2 minutos, lavadas em água destilada e colocadas para germinar em solo previamente desinfestado. Plântulas de maracujá com duas folhas definitivas foram transferidas para potes com capacidade para 180 g de substrato (Tabela 1) e inoculadas na região das raízes com solo-inóculo fornecendo 200 esporos/pote de *Gigaspora albida* (UFPE 01), multiplicado em solo + composto orgânico (9:1 v/v), utilizando-se painço como hospedeiro; o inóculo foi seco e mantido a 4 °C por seis meses, antes de ser utilizado (Kim *et al.*, 2002)

Tabela 1. Caracterização química dos substratos utilizados para produção de mudas de maracujazeiro-doce

	Substratos			
	Solo	Solo:TV (9:1 v/v)	Solo:EB (9:1 v/v)	Solo:PC (9:1 v/v)
MO (g kg ⁻¹)	38,17	40,96	40,03	39,10
pH (H ₂ O-1:2,5)	5,40	5,40	5,50	5,50
P* (mg dm ⁻³)	5,00	12,00	33,00	5,00
Ca** (cmol _c dm ⁻³)	3,20	3,20	3,30	2,90
Mg** (cmol _c dm ⁻³)	0,90	0,90	1,50	0,60
CTC (cmol _c dm ⁻³)	8,40	8,36	8,97	7,06
V (%)	51,00	53,00	63,00	53,00

MO= matéria orgânica; CTC= capacidade de troca catiônica; V= saturação de bases; TV= terra vegetal; EB= esterco bovino; PC= palha de coco; *Mehlich I; ** KCl 1M.

Após 15 dias, foi feito o transplântio para sacos pretos de polietileno contendo 1 Kg do respectivo substrato. Nos tratamentos controle foram adicionados 2 mL de filtrado (45 µm), oriundo do peneiramento do inóculo de *G. albida*, visando restaurar a microbiota do solo, com exceção dos FMA. O experimento foi mantido em telado, sob condições ambientais de luminosidade, temperatura (T_{max} : 36,15 °C; T_{min} : 27,84 °C) e umidade (UR_{max} : 80,40 %; UR_{min} : 38,90 %).

O delineamento experimental foi do tipo inteiramente casualizado em arranjo fatorial de 4×2 , sendo 4 tipos de substrato (Tabela 1): (a) solo (controle); (b) solo e esterco bovino maturado; (c) solo e terra vegetal; (d) solo e palha de coco (material fibroso, oriundo da trituração do mesocarpo do coco e usado como condicionador de solo), os três últimos na proporção 9:1 (v/v) \times 2 tratamentos de inoculação (inoculado ou não com *G. albida*) em 4 repetições, totalizando 32 parcelas experimentais. Após mistura, os substratos foram deixados em repouso por 15 dias antes de serem utilizados.

O experimento foi colhido 46 dias após a inoculação, ocasião em que houve emissão de gavinhas, caracterizando a muda como apta para transplântio, sendo avaliados: altura, nº de folhas, área foliar, diâmetro do caule a 3 cm do solo, massa seca da parte aérea, colonização micorrízica total, hifálica e arbuscular (McGonigle *et al.*, 1990), respiração microbiana (Grisi, 1978) e atividade de hidrólise do diacetato de fluoresceína (enzimática geral do solo) (Swisher & Carrol, 1980). A colonização micorrízica foi estimada após diafanização das raízes em KOH (10 % p/v) e coloração com Chlorazol black-E (Brundrett *et al.*, 1984). A massa seca foi obtida após secagem em estufa de circulação de ar (60 °C) até peso constante.

Para análise, os dados de colonização arbuscular e hifálica foram transformados em arco seno ($\sqrt{x}/100$) e colonização total em \sqrt{x} . Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), utilizando o programa Sanest.

Resultados

Houve efeito significativo ($P < 0,05$), mas sem interação, do tipo de substrato e da inoculação para massa seca da parte aérea, área foliar, diâmetro do caule, evolução de CO₂. Para os demais parâmetros avaliados (altura, produção foliar, colonização micorrízica total, hifálica e arbuscular e atividade de hidrólise do diacetato de fluoresceína) foi registrada interação significativa entre os dois fatores (tipos de substrato e inoculação) (Tabela 2). As

mudas cultivadas em solo adubado com esterco bovino apresentaram maior área foliar, diâmetro do caule e massa seca da parte aérea do que as dos demais tratamentos (Tabela 3).

A micorrização favoreceu a formação de mudas mais desenvolvidas (Tabelas 4 e 5). Formação de gavinhas foi constatada apenas nas plantas associadas a *G. albida* e cultivadas em solo adubado com esterco bovino.

Tabela 2. Níveis de significância para adubação, fungos e interação entre as variáveis avaliadas

Parâmetro	Substratos (1)	Inoculação (2)	1 × 2
Massa seca da parte aérea	**	**	ns
Área foliar	**	**	ns
Diâmetro do caule	**	**	ns
Nº de folhas	**	**	**
Altura	**	**	*
Colonização micorrízica total	**	**	**
Colonização micorrízica hifálica	**	**	*
Colonização micorrízica arbuscular	**	**	**
Atividade enzimática geral	**	**	**
Respiração microbiana	**	*	ns

** (P < 0,01); * (P < 0,05); ns (não significativo).

Tabela 3. Influência da composição do substrato na área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA), diâmetro do caule (DC) e respiração microbiana (RM), em mudas de maracujazeiro-doce independentemente da micorrização com *Gigaspora albida*, 46 dias após inoculação, em casa-de-vegetação

Tratamentos	Parâmetros			
	AF (cm ²)	MSPA (g)	DC (mm)	RM*
Solo	146,98 B	0,44 B	0,18 B	3,30 B
Solo:TV (9:1 v/v)	151,14 B	0,45 B	0,20 B	4,12 B
Solo:EB (9:1 v/v)	378,04 A	1,21 A	0,25 A	8,00 A
Solo:PC (9:1 v/v)	194,62 B	0,56 B	0,18 B	7,80 A
CV %	29,20	38,07	12,61	14,58

TV= terra vegetal; EB= esterco bovino; PC= palha de coco. *µg C-CO₂ g solo seco dia⁻¹

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

Tabela 4. Influência da micorrização com *Gigaspora albida* na área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA), diâmetro do caule (DC) e respiração microbiana (RM), em mudas de maracujazeiro-doce 46 dias após inoculação, em casa-de-vegetação

Tratamentos	Parâmetros			
	AF (cm ²)	MSPA (g)	DC (mm)	RM*
Controle	115,50 B	0,31 B	0,16 B	5,31 B
	319,92 A	1,02 A	0,24 A	6,30 A
CV %	29,20	38,07	12,61	14,58

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

*µg C-CO₂ g solo seco dia⁻¹

Com exceção do tratamento com palha de coco, a incorporação das demais fontes orgânicas não resultou em diferenças significativas na colonização micorrízica total nas raízes do maracujazeiro, quando comparado ao substrato solo (Figura 1). A adubação favoreceu a formação de arbúsculos no córtex radicular, com a produção de tais estruturas variando em função do substrato empregado (Figura 1). A colonização por hifas (Figura 1) não foi afetada pela incorporação de fontes orgânicas ao substrato de cultivo das mudas.

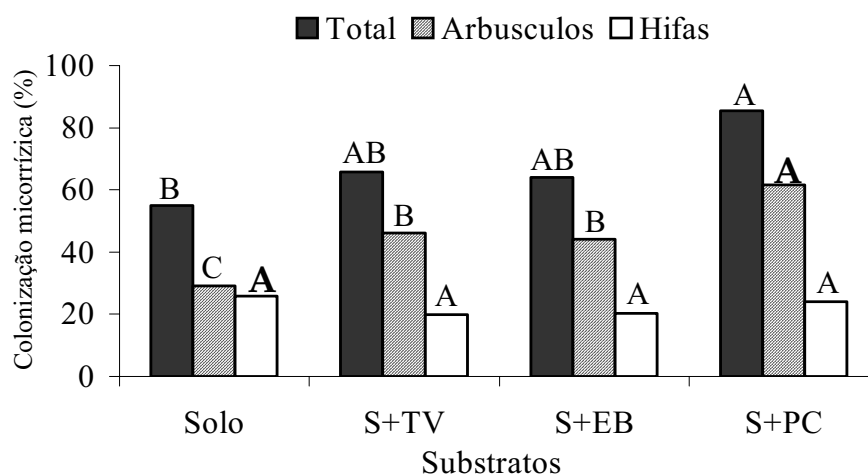


Figura 1. Colonização micorrízica total, arbuscular e hifálica de *Gigaspora albida* nas raízes de *Passiflora alata* cultivada em solo, solo e terra vegetal (S+TV), solo e esterco bovino (S+EB) e solo e palha de coco (S+PC), 46 dias após inoculação. Barras seguidas da mesma letra, entre os tipos de substrato, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

A evolução de CO₂ foi estimulada (>150 %) pela adição de esterco e palha de coco (Tabela 3), com o FMA contribuindo no processo (Tabela 4).

A micorrização em geral interferiu na atividade enzimática geral do solo, estimada pela hidrólise do FDA, que foi estimulada pela incorporação de matéria orgânica, com maiores valores obtidos em solo com palha de coco, seguido pelos substratos à base de esterco bovino e com terra vegetal, que não diferiram entre si (Tabela 5). Apenas quando o substrato foi constituído por adubo orgânico houve aumento da atividade de hidrólise do FDA em função da presença do FMA (Tabela 5).

Tabela 5. Influência da composição do substrato de cultivo e da micorrização com *Gigaspora albida* na atividade enzimática geral do solo, altura e produção foliar de mudas de maracujazeiro-doce, 46 dias após inoculação, em casa-de-vegetação

Tratamentos de inoculação	Substratos			
	Solo	Solo:TV (9:1 v/v)	Solo:EB (9:1 v/v)	Solo:PC (9:1 v/v)
Altura (cm)				
Controle	4,25 bB	5,40 bB	7,95 aB	6,02 abB
<i>G.albida</i>	8,60 bA	7,80 bA	13,75 aA	8,77 bA
CV % 15,01				
Produção foliar				
Controle	3,75 cB	4,25 cB	8,50 aA	6,00 bB
<i>G.albida</i>	8,25 aA	9,00aA	9,50 aA	8,50 aA
CV % 13,76				
Atividade enzimática geral (μg FDA hidrolisado g^{-1} solo seco h^{-1})				
Controle	5,95 cA	13,24 bB	15,03 bB	22,34 aB
<i>G.albida</i>	4,18 cA	19,56 bA	23,84 bA	29,02 aA
CV % 13,76				

TV= terra vegetal; EB= esterco bovino; PC= palha de coco.

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Discussão

O emprego de FMA selecionados pode favorecer o desenvolvimento de mudas de maracujazeiro-doce (Silva *et al.*, 2004), como também observado no presente ensaio. Mudas dessa fruteira apresentam características para transplântio ao campo em 104 dias, quando cultivadas em sacos de polietileno com 1 L de substrato (Borges *et al.*, 1995), porém, o presente trabalho mostrou que o uso combinado de FMA e substrato à base de esterco bovino pode formar mudas prontas aos 46 dias. Esse sistema mostrou-se mais eficiente do que o utilizado por Anjos *et al.* (2005), combinando FMA e fertilizante fosfatado quando foram necessários 65 dias para formação de mudas de maracujazeiro-doce, cultivadas em sacos de polietileno com 1,7 kg de solo.

Resíduos orgânicos são comumente empregados na formação de mudas de maracujazeiro-doce (Leonel & Pedroso, 2005; Manica, 2005), sendo importante a escolha do substrato para se atingir resposta máxima à micorrização (Vosátka *et al.*, 1992). Isso foi confirmado no presente estudo, com o esterco bovino apresentando-se como o adubo mais promissor para desenvolvimento das mudas. Zenke *et al.* (2003) mencionaram que o desenvolvimento de videiras micropropagadas e micorrizadas foi dependente do tipo de fonte orgânica empregada na composição do substrato de aclimatização das mudas. Silva *et al.* (2001) também observaram que o benefício da micorrização para o maracujazeiro-amarelo era relacionado à composição do substrato.

A adição de 10 % de esterco ao solo constitui alternativa promissora na formação de mudas de maracujazeiro-doce micorrizadas, reduzindo em 60 % a dose de adubo orgânico recomendada nesta fase (Lima *et al.*, 1995). Além disso, poderia dispensar a aplicação de superfosfato simples e de cloreto de potássio, comumente recomendados na composição do substrato (Manica, 2005).

Sinergismo positivo do uso combinado de FMA e adubos orgânicos no crescimento vegetal tem sido registrado (Caravaca *et al.*, 2002). Há relatos de efeito sinérgico do uso de 10 % de esterco bovino e inoculação de *Glomus* Tulasne & Tulasne para formação de mudas de maracujazeiro-amarelo (Silveira *et al.* 2003). Mesmo não havendo interação significativa dos fatores estudados (adubação e FMA) (Tabela 2), as mudas cultivadas em substrato à base de esterco bovino só apresentaram maior desenvolvimento e características ideais para transplântio ao campo, quando associadas a *G. albida*. É possível que as hifas externas do FMA tenham propiciado maior aproveitamento do fósforo, presente em elevada concentração nesse resíduo (Tabela 1), tal como sugerido por Caravaca *et al.* (2003) em situação semelhante.

Em geral, elevados teores de P em substratos orgânicos minimizam os benefícios da simbiose micorrízica arbuscular (Estaún *et al.*, 1999), mas isso não ocorreu em relação ao substrato com esterco bovino, que foi o mais favorável à formação das mudas, embora apresentasse 33 mg P dm^{-3} , teor comparativamente maior em relação aos demais substratos testados (Tabela 1). Esse resíduo orgânico também não inibiu a atuação de FMA sobre o crescimento de outras culturas como o mamoeiro (Trindade *et al.*, 2000) e a bananeira (Lins *et al.*, 2003), em substratos com 10 e 5 % de esterco, respectivamente.

Teores de 2 e $0,8 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ de Ca e Mg, respectivamente, associado a 56% de saturação por bases (V), foram considerados como ideais para o cultivo do maracujazeiro-doce (Prado *et al.*, 2004); com valores mais elevados (Tabela 1), o substrato com esterco bovino favoreceu a formação de mudas sadias.

O estabelecimento da fase intraradicular e a formação de arbúsculos dos FMA pode ser favorecida pela utilização de fontes orgânicas (Muthukumar & Udaiyan, 2000; Cavender *et al.*, 2002), mas, a heterogeneidade dos materiais empregados pode interferir no estabelecimento do fungo na raiz (Borie *et al.*, 2002) (Figura 1). Entre os resíduos testados, apenas a palha de coco estimulou a colonização micorrízica total. A maior produção de arbúsculos, registrada no tratamento com este substrato, não foi relacionada ao aumento no crescimento do maracujazeiro-doce, embora tais estruturas sejam relacionadas à funcionalidade e à eficiência da simbiose (Smith & Read, 1997). Baby & Manibhushanrao (1996) também verificaram que o uso de resíduo de coco no substrato para cultivo de arroz favoreceu a colonização arbuscular por fungos nativos. A incorporação de celulose ao substrato também estimulou a produção de arbúsculos em raízes de *Plantago lanceolata* L. (Gryndler *et al.*, 2002). A produção de hifas intraradiculares nas raízes estudadas não foi afetada pela adubação, que em alguns casos parece não ter efeito sobre a micorrização (Caravaca *et al.*, 2002).

Aumento na evolução de CO_2 , nos substratos testados, ocorreu nos tratamentos com esterco bovino e palha de coco. É possível que a matéria orgânica tenha sido melhor utilizada como fonte de energia para os processos oxidativos, que resultam em elevadas taxas de CO_2 emitido (Marinari *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 1998). A respiração microbiana, empregada em estudos sobre a qualidade do solo (Hernández & Garcia, 2003) aumenta com a fertilização orgânica (Abdelhamid *et al.*, 2004), dependendo da fonte aplicada (Ghini *et al.*, 2002). Por outro lado, os exsudados radiculares, produzidos em função do melhor desenvolvimento vegetal em solo com adubo orgânico, podem contribuir para aumentar as taxas de respiração microbiana (Pascual *et al.*, 1999). Também há registro do aumento da taxa de respiração com

a introdução de FMA. Wamberg *et al.* (2003) mencionaram que a inoculação com *Glomus intraradices* Schenck & Smith favoreceu a atividade microbiana na rizosfera de *Pisum sativum* L., quando as plantas estavam no estágio de floração. No caso do maracujazeiro-doce, a inoculação com *G. albida* aumentou a atividade respiratória na fase vegetativa, em todos os substratos usados para cultivo das mudas. Essa contribuição dos FMA provavelmente se deve à respiração das hifas presentes no solo e ao aumento do metabolismo com a utilização, pelo fungo, de N e P orgânicos do substrato (Hodge *et al.* 2001; Feng *et al.*, 2003), resultando em maior emissão de CO₂. Em sistemas ectomicorrízicos, Garcia *et al.* (2000) também verificaram a contribuição do fungo no aumento da respiração basal em solo cultivado com *Pinus halepensis* Miller.

Os resíduos orgânicos contribuem para aumentar o metabolismo microbiano e a produção de enzimas (García-Gil *et al.*, 2004), favorecendo também a atividade hidrolítica do solo (Ghini *et al.*, 2002), como observado no presente trabalho, porém os benefícios variaram com a fonte orgânica empregada, tal como evidenciado por Pankhurst *et al.* (2005). A maior atividade enzimática registrada nos tratamentos com adubo, pode ser decorrente da presença de microrganismos e do acúmulo de enzimas extracelulares complexadas aos colóides da matéria orgânica utilizada como adubo (Pascual *et al.*, 1998).

A contribuição do fungo micorrízico no aumento da atividade enzimática, foi dependente da fertilização do solo, que provavelmente atuou no estímulo da produção de micélio (Frey e Ellis, 1997) e/ou na secreção de enzimas pelas hifas. Caravaca *et al.* (2004) relataram que a inoculação com *Glomus deserticola* Trappe, Bloss & Menge aumentou a atividade da β -glicosidade, desidrogenase e urease, em solo adubado com resíduo de beterraba utilizado para o cultivo de *Dorycnium pentaphyllum* L.

Conclusão

O substrato composto por solo e esterco bovino (9:1 v/v) pode ser indicado para formação de mudas micorrizadas de maracujazeiro-doce, favorecendo o seu crescimento e aumentando a atividade respiratória e enzimática do solo.

Referências Bibliográficas

ADBELHAMID, M.T.; HORIUCHI, T.; OBA, S. Composting of rice straw with oilseed rape cake poultry manure and its effects on faba bean (*Vicia faba* L.) growth and soil properties. *Bioresource Technology*, v.93, p.183-189, 2004.

- ANJOS, E.C.T.; CAVALCANTE, U.M.T.; SANTOS, V.F.; MAIA, L.C. Produção de mudas de maracujazeiro-doce micorrizado em solo desinfestado e adubado com fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p. 345-351, 2005.
- BABY, U.I.; MANIBHUSHANRAO, K. 1996. Influence of orbanic amendment on arbuscular mycorrhizal fungi in relation to rice sheath blight disease. **Mycorrhiza**, v.6, p. 201-206, 1996
- BORGES, A.L.; LIMA, A.A.; CALDAS, R.C. Adubação orgânica e química na formação de mudas de maracujazeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.17, p.17-22, 1995.
- BORIE, F.; REDEL, Y.; RUBIO, R.; ROUANET, J.L.; BAREA, J.M. Interactions between crop residues application and mycorrhizal development and some root interface properties and mineral acquisition by plants in an acidic soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.36, p.151-160, 2002.
- BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V. Uso potencial de outras espécies do gênero *Passiflora*. **Informe Agropecuário**, v.21, p.72-75, 2000.
- BRUNDETT, M.C; PICHE, Y.; PETERSON, R.L. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Canadian Journal of Botany**, v.62, p.2128-2134, 1984.
- CANÇADO JÚNIOR, F.L.; ESTANISLAU, M.L.L.; PAIVA, B.M. Aspectos econômicos da cultura do maracujá. **Informe Agropecuário**, v.21, p.10-17, 2000.
- CARAVACA, F.; ALGUACIL, M.M.; AZCÓN, R.; DÍAZ, G.; ROLDÁN, A. Comparing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and *Aspergillus niger* to enhance field performance of the leguminous shrub *Dorycnium pentaphyllum* L. **Applied Soil Ecology**, v.25, p.169-180, 2004.
- CARAVACA, F.; BAREA, J.M.; FIGUEROA, D.; ROLDÁN, A. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. **Applied Soil Ecology**, v.20, p.107-118, 2002
- CARAVACA, F.; FIGUEROA, D.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M.; ROLDÁN, A. Medium-term effects of mycorrhizal inoculation and composted municipal waste addition on the establishment of two Mediterranean shrubs species under semiarid field conditions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.97, p.95-105, 2003.
- CAVALCANTE, U.M.T.; MAIA, L.C.; MELO, A.M.M.; SANTOS, V.F. Influência da densidade de fungos micorrizicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.643-649, 2002.

- CAVENDER, N.D.; ATIYEH, R.M.; KNEE, M. Vermicompost stimulates mycorrhizal colonization of roots *Sorghum bicolor* at expense of plant growth. **Pedobiologia**, v.47, p.85-89, 2003.
- DUPONNOIS, R.; COLOMBET, A.; HIEN, V.; THIOULOUSE, J. The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holoserica*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.1760-1768, 2005.
- ESTAÚN, V.; CALVET, C.; CAMPRUBÍ, A.; PINOCHET, J. Long-term effects of nursery starter substrate and AM inoculation of micropropagated peach x almond hybrid rootstock GF 677. **Agronomie**, v.19, p.483-489, 1999.
- FENG, G.; SONG, Y.C.; LI, X.L.; CHRISTIE, P. Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to utilization of organic sources of phosphorus by red clover in a calcareous soil. **Applied Soil Ecology**, v.22, p.139-148, 2003.
- FREY, J.R.; ELLIS, J.R. 1997. Relationship of soil properties and soil amendments to response of *Glomus intraradices* and soybeans. **Canadian Journal of Botany**, v.75, p.483-491, 1997.
- GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; ROLDAN, A. ALBALADEJO, J.; CASTILLO, V. Organic and mycorrhizal inoculation as a practice in afforestation of soils with *Pinus halepensis* Miller: effect on their microbial activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1173-1181, 2000.
- GARCÍA-GIL, J.C.; PLAZA, C.; BRUNETTI, G.; POLO, A. Effects of sewage sludge amendment on humic acids and microbiological properties of a semiarid Mediterranean soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.39, p.320-328, 2004.
- GHINI, R.; SCHOENMARKER, I.A.S.; BETTIOL, W. Solarização do solo e incorporação de fontes de matéria orgânica no controle de *Pythium* sp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.1253-1261, 2002.
- GRISI, B.M. Método químico de medição da respiração edáfica: alguns aspectos técnicos. **Ciência e Cultura**, v.30, p.82-88, 1978.
- GRYNDLER, M.; VOSÁTKA, M. HRSELOVÁ, H; CHVÁTALOVÁ, I.; JANSÁ, J. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and cellulose in growth substrate. **Applied Soil Ecology**, v.19, p.279-288, 2002.
- HERNÁNDEZ, T.; GARCIA, C. Estimación de la respiración micorrbiana del suelo. In: IZQUIERDO, C.G.; SOTRES, F.G.; FERNÁNDEZ, T.H.; CEPEDA, C.T. (Ed.). **Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos y biomassa microbiana**. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, 2003. p. 9-21.

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

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

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**, v.238, p.267-272, 2002.

LEONEL, S.; PEDROSO, C.J. Produção de mudas de maracujazeiro-doce com o uso de biorregulador. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.107-109, 2005.

LIMA, A.A.; BORGES, A.L.; CALDAS, R.C. Substratos para produção de mudas de maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.17, p.127-129, 1995.

LINS, G.M.L.; TRINDADE, A.V.; ROCHA, H.S. Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estádios de enraizamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.143-147, 2003.

MANICA, I. Produção das mudas. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2005. p. 47-63.

MANICA, I.; OLIVEIRA JR., M.E. Maracujá no Brasil. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2005. p.11-26.

MARINARI, S.; MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B.; GREGO, S. 2000. Influence of organic and mineral fertilizers on biological and physical properties. **Bioresource Technology**, v.72, p.9-17, 2000.

MC GONIGLE, T.P.; MILLER, M.H.; EVANS, D.G.; FAIRCHILD, G.L.; SWAN, J.A. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.115, p.495-501, 1990.

MELLETI, L.M.M. A cultura do maracujazeiro em São Paulo. **O Agrônomo**, v.53, p.18-20, 2001.

MUTHUKUMAR, T.; UDAIYAN, K. Influence of organic manures on arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. in relation to tissue nutrients and soluble carbohydrate in roots under field condition. **Biology and Fertility of Soils**, v.31, p.114-120, 2000.

- PANKHURST, C.E.; BLAIR, B.L.; MAGAREY, R.C.; STIRLING, G.R.; BELL, M.J.; GARSIDE, A.L. Effect of rotation breaks and organic matter amendments on the capacity of soils to develop biological suppression towards soil organisms associated with yield decline of sugarcane. **Applied Soil Ecology**, v.28, p.271-282, 2005.
- PARIS, F.; PETRY, R.D.; REGINATTO, F.H.; GOSMANN, G.; QUEVEDO, J.; SALGUEIRO, J.B.; KAPCZINSKI, F.; GONZÁLEZ, O.G.; SCHENKEL, E.P. 2002. Pharmacochemical study of aqueous extracts of *Passiflora alata* Dryander and *Passiflora edulis* Sims. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, p.5-8, 2002.
- PASCUAL, J.A.; GARCÍA, C.; HERNANDEZ, T. Lasting microbiological and biochemical effects of the addition of municipal solid waste to an arid soil. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.1-6, 1999.
- PASCUAL, J.A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; AYUSO, M. Enzyme activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experiment. **Bioresouce Technology**, v.64, p.131-134, 1998.
- PRADO, R.M.; NATALE, W.; CORRÊA, M.C.; BRAGHIROLI, L.F. Efeitos da aplicação de calcário no desenvolvimento, no estado nutricional e na produção de matéria seca de mudas de maracujazeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p.145-149, 2004.
- RODRÍGUEZ, A.M.; HURTADO, M.; PRAGER, M.S. Inoculación de granadilla *Passiflora ligulares* L. con MVA. **Acta Agronomica**, v.45, p.89-98, 1995.
- RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; DURIGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K.; FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.P. **Maracujá para exportação: aspectos técnicos da produção**. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria de Desenvolvimento Rural, Programa de Apoio à Produção e Exportação de Frutas, Flores e Plantas Ornamentais. Brasília: Embrapa – SPI, 1996. 64p.
- SILVA, M.A.; CAVALCANTE, U.M.T.; SILVA, F.S.B.; SOARES, S.A.G.; MAIA, L.C. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) associadas a fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota). **Acta Botânica Brasilica**, v.18, p.981-985, 2004.
- SILVA, R.P.; PEIXOTO, J.R.; JUNQUEIRA, N.T.V. Influência de diversos substratos no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* DEG). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.377-381, 2001.

SILVEIRA, A.P.D.; SILVA, L.R.; AZEVEDO, I.C.; OLIVEIRA, E.; MELETTI, L.M.M. Desempenho de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo em diferentes substratos. **Bragantia**, v.62, p.1-12, 2003.

SMITH, S.E.; READ, D.J. 1997. **Mycorrhizal Symbiosis**. 2.ed. London: Academic Press, 605p.

SWISHER, R.; CARROL, G.C. Fluorescein diacetate hydrolisis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial Ecology**, v.6, p.217-226, 1980.

TRINDADE, A.V.; LINS, G.M.L.; MAIA, I.C.S. Substrato e fungo micorrízico arbuscular em mudas micropropagadas de bananeira na fase de aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.137-142, 2003.

VASCONCELOS, C. A.; FIGUEIREDO, A, P.H.D.; FRANÇA, G.E.; COELHO, A.M.; BRESSAN, W. Manejo do solo e a atividade microbiana em latossolo vermelho-escuro da Região de Sete Lagoas, MG. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.33, p.1897-1905, 1998.

VOSATKA, M.; GRYNDLER, M.; PRIKRYL, Z. Effect of the rhizosphere bacterium *Pseudomonas putida*, arbuscular mycorrhizal fungi and substrate composition on the growth of strawberry. **Agronomie**, v.12, p.859-863, 1992.

WAMBERG, C.; CHRISTENSEN, S.; JAKOBSEN, I.; MÜLLER, A.K.; SORESEN, S.J. The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, p.1349-1357, 2003.

ZENKE, J.M.; PEREIRA, F.; LOVATO, P.E.; SILVA, A.L. Avaliação de substratos para inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de videira micropropagadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.11, p.1309-1315, 2003.

Capítulo 8

Produtividade e qualidade de frutos de maracujazeiro-doce em cultivo associado com fungos micorrízicos arbusculares, no Vale do Submédio São Francisco-PE

Artigo enviado para publicação no periódico Pesquisa Agropecuária Brasileira

Produtividade e qualidade de frutos de maracujazeiro-doce em cultivo associado com fungos micorrízicos arbusculares, no Vale do Submédio São Francisco-PE

Fábio Sérgio Barbosa da Silva¹; Adriana Mayumi Yano-Melo¹; Nataniel Franklin de Melo²; Geraldo Milanez de Resende²; Maryluce Albuquerque da Silva¹ & Leonor Costa Maia^{1*}

¹Laboratório de Micorrizas, Depto. Micologia, UFPE, Cidade Universitária, CEP. 50670-420, Recife, PE, Brasil. (fsbsbarbosa@bol.com.br), (amymelo17@hotmail.com), (marylucealbuquerque@bol.com.br), (leonorcmaia@yahoo.com.br).

²Embrapa Semi-Árido, C.P. 23, CEP. 56302-970, Petrolina, PE, Brasil. (nataniel@cpatsa.embrapa.br), (gmlanez@cpatsa.embrapa.br).

*autor para correspondência

Resumo - (Produtividade e qualidade de frutos de maracujazeiro-doce em cultivo associado com fungos micorrízicos arbusculares, no Vale do Submédio São Francisco-PE). Foi conduzido experimento em campo visando determinar se a condição de multiplicação do inóculo micorrízico (*Gigaspora albida*) afeta a produtividade e a qualidade de frutos do maracujazeiro-doce, em cultivo químico e orgânico. Mudanças recebendo inóculo multiplicado em solo ou em solo + 10% de composto orgânico foram transplantadas para covas adubadas com vermicomposto ou com fertilizantes químicos. O delineamento experimental foi em blocos casualizados em fatorial 2 (tratamentos de inoculação) \times 2 (tipos de adubação) e cinco repetições. Dez meses após a instalação do cultivo avaliou-se produtividade e características dos frutos. Em solo com fertilizantes químicos, maior número de frutos (64.777 frutos ha⁻¹) com reduzida acidez (0,75 % de ácido cítrico g⁻¹ polpa), elevada °Brix/acidez (24,32) e maior produtividade (11,08 t ha⁻¹) foram registrados em plantas com inóculo produzido em solo + composto orgânico. Nos tratamentos com vermicomposto, maior produtividade (3.83 t ha⁻¹) e °Brix (21,58) dos frutos ocorreram em plantas recebendo inóculo multiplicado em solo. O cultivo do maracujazeiro-doce associado a *G. albida* (multiplicado em solo + composto orgânico) em solo com fertilizantes químicos é alternativa para aumento do número de frutos com reduzida acidez e elevada °Brix/acidez, no semi-árido brasileiro.

Termos para indexação

Passiflora alata; *Gigaspora albida*; Glomeromycota; adubação orgânica, semi-árido.

Abstract- A field experiment was performed to determine if multiplication condition of the mycorrhizal inoculum (*Gigaspora albida*) affects yield and quality of sweet passion fruits receiving organic and mineral fertilizers. Seedlings with inoculum multiplied in soil or in soil + 10% organic compost were transplanted to plots receiving vermicompost or mineral fertilizer. The experimental design was in blocks at random, in factorial 2 (inoculation treatments) \times 2 (fertilizer treatments), and five replicates. Ten months after crop installation, yield and fruit characteristics were evaluated. In soil with mineral fertilizers, higher number of fruits ($64,777 \text{ ha}^{-1}$) with low acidity ($0,75 \text{ \% citric acid g}^{-1}$ pulp), high °Brix/acidity (24,32) and higher productivity (11.08 t ha^{-1}) were obtained in plants with inoculum produced in soil + organic compost. In treatments with vermicompost, higher productivity ($3,83 \text{ t ha}^{-1}$) e °Brix (21,58) were obtained in plants receiving inoculum multiplied in soil. Cultivation of sweet passion fruit associated to *G. albida* (multiplied in soil + organic compost) in mineral fertilized soil, constitute an alternative to increase production of high quality fruits (reduced acidity and high °Brix/acidity) in the brazilian semiarid.

Index terms

Passiflora alata; *Gigaspora albida*; Glomeromycota; organic amendment; semiarid.

Introdução

Microrganismos do solo podem atuar como promotores do crescimento de vegetais de interesse agrônomo; entre esses, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem melhorar o aporte nutricional do hospedeiro, que resulta na maior tolerância a estresses de natureza biótica ou abiótica. Na simbiose micorrízica não há especificidade hospedeira, mas diferenças na eficiência dos FMA podem ser intra ou interespecíficas (Munkvold *et al.*, 2004). Assim, a seleção prévia de inoculantes para aplicação na agricultura é recomendada (Abbott *et al.*, 1994).

Segundo Graham *et al.* (1982), FMA fisiologicamente superiores em promover o crescimento vegetal são obtidos quando o fungo é multiplicado na condição edáfica em que será utilizado, sendo o desempenho diferenciado decorrente da adaptação fisiológica e genética do fungo (Caravaca *et al.*, 2005). Nesse aspecto, melhores respostas de FMA previamente adaptados a certas condições edáficas têm sido registradas (González-Chavez *et al.*, 2002).

O componente micorrízico deve ser considerado na geração de tecnologia em agrossistemas sustentáveis, o que inclui o uso de adubos orgânicos de qualidade e em quantidades adequadas (Salami & Osonubi, 2002). Nesse contexto, o emprego de fungos condicionados à adubação orgânica pode constituir alternativa para incrementar o crescimento e a produtividade de vegetais sob cultivo orgânico, devendo ser selecionados FMA que promovam benefícios ao hospedeiro mesmo em condições de elevada fertilidade (Gianinazzi *et al.*, 1988). Considerando que a atuação de FMA em campo tem sido comprometida pela aplicação de elevadas doses de fertilizantes, a utilização de fungos adaptados a tais condições é necessária para o sucesso em programas de inoculação com FMA (Wood, 1991). O emprego de resíduos orgânicos é uma das práticas agrícolas que seleciona e mantém FMA mais eficientes em promover benefícios ao vegetal (Muthukumar & Udaiyan, 2002). Scullion *et al.* (1998), por exemplo, verificaram que a comunidade de FMA proveniente de áreas manejadas organicamente foi mais efetiva em promover o crescimento de *Allium amelloprasium* L. e *Trifolium repens* L. em relação a fungos proveniente de áreas com manejo convencional.

O maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) destaca-se pela aceitação no mercado europeu, norte-americano e canadense (Cançado Júnior *et al.*, 2000) e pelo elevado valor agregado dos frutos (Braga & Junqueira, 2000). Esta espécie é a segunda Passifloraceae economicamente importante no Brasil, sendo beneficiada pelo uso de FMA na fase de muda (Anjos *et al.*, 2005). Ensaios anteriores indicaram que a aplicação de *Gigaspora albida*

Schenck & Smith, multiplicado em substrato com composto orgânico, favoreceu o crescimento de mudas de *P. alata* cultivadas em solo + 10% de composto orgânico, mais do que o isolado multiplicado em solo. Todavia, para indicação desse isolado na formação de pomares de maracujazeiro-doce, estudos em campo são necessários para comprovar se este comportamento se mantém até a fase de produção de frutos.

O Vale do Submédio São Francisco é um dos maiores pólos de exportação de frutas brasileiras, especialmente uva e manga. Atualmente os produtores da região buscam culturas alternativas com valor agregado e potencial de exportação, como o maracujazeiro-doce (Silva *et al.*, 2004). Isso resulta na diversificação de culturas, constituindo fonte adicional de renda, especialmente na entressafra das culturas chave da região. Em condições irrigadas, essa passiflorácea pode ser produzida no semi-árido nordestino; o fotoperíodo acima de 11 horas diárias permite a produção durante todo o ano (Lima & Borges, 2002). Além disso, a condição climática da região (elevada temperatura e baixa precipitação pluviométrica) reduz o tempo decorrido entre a polinização à colheita dos frutos (Vasconcellos, 1991) e favorece a formação de frutos com maior relação SST/ATT (sólidos solúveis totais/acidez total titulável) e a reduzida ATT (Veras *et al.*, 2000). Devido à escassez de estudos com maracujazeiro-doce (Vasconcelos *et al.*, 2001a), é necessária a geração de informações técnicas, como recomendações de adubação, que possibilitem a instalação de cultivo desta passiflorácea no semi-árido pernambucano.

Desta forma, testou-se a hipótese de que FMA multiplicados em substrato com adubo orgânico (alta fertilidade) teriam melhor atuação na produtividade do hospedeiro, quando este é cultivado em solo com fertilizantes orgânicos. Foi avaliada, portanto, a influência da condição de multiplicação do inóculo micorrízico na produtividade e qualidade de frutos do maracujazeiro-doce, sob cultivo orgânico e químico.

Material & métodos

Área experimental

O experimento foi conduzido no Campo Experimental de Bebedouro (Embrapa Semi-árido, Petrolina-PE), no período de 15-12-2003 a 15-10-2004, sendo avaliado o primeiro pico da produção anual do maracujazeiro-doce. O clima da região é classificado, segundo Köppen, como tipo BswH [Clima Semi-Árido, com temperaturas altas ($> 22^{\circ}\text{C}$) e chuvas escassas no inverno ($< 250\text{ mm}$)]. Durante o experimento, o índice pluviométrico foi 801,1 mm e a temperatura média 18,1 $^{\circ}\text{C}$ (mínima) e 32,1 $^{\circ}\text{C}$ (máxima). O solo da área experimental é do tipo Argissolo-Amarelo-Eutrófico (Embrapa, 1999).

FMA

Foi escolhido o FMA *Gigaspora albida* (UFPE 01), pelo fato deste fungo ter sido o mais eficiente, na produção de mudas de maracujazeiro-doce (Silva *et al.*, dados não publicados). Foi utilizado inóculo de *G. albida* proveniente de um ciclo de multiplicação (60 dias) em dois substratos: a) solo (S) e b) solo + 10% composto orgânico (Org) (Tabela 1). Como hospedeiro para multiplicação do fungo foi utilizado o painço (*Panicum miliaceum* L.) e o solo-inóculo (esporos e raízes colonizadas) foi seco e estocado a 4 °C, por três meses, antes de ser utilizado (Kim *et al.*, 2002).

Tabela 1. Caracterização química dos substratos utilizados para: a) multiplicação de *Gigaspora albida*; b) preparo das mudas de *Passiflora alata*; c) do vermicomposto utilizado na adubação orgânica para cultivo do maracujazeiro-doce

Substratos	pH	P*	C	N	CTC	C/N
	(H ₂ O-1:2,5)	(mg dm ⁻³)	(g Kg ⁻¹)		(cmol _c dm ⁻³)	
FMA						
Solo	4,6	4	13,3	1,2	1,69	11,08
Solo+10% CO	5,6	53	26,1	2,0	9,89	13,05
Preparo das mudas						
Solo+10% VC	7,1	74	15,56	1,41	6,08	11,03
Adubação orgânica						
Vermicomposto	7,0	1450	124,41	11,31	12,00	11,00

CO=composto orgânico;VC=vermicomposto; CTC=capacidade de troca catiônica;*Mehlich I.

Pré-inoculação das mudas de *Passiflora alata*

Sementes de maracujazeiro-doce (*P. alata*), obtidas de frutos maduros adquiridos comercialmente, foram desinfestadas com NaOCl-20% (2% cloro ativo) por 2 minutos, lavadas em água destilada e colocadas para germinar em bandejas de células contendo areia e vermiculita previamente esterilizadas (121 °C/1 atm/30 min.). Plântulas com duas folhas definitivas foram inoculadas, separadamente, com solo-inóculo contendo 200 esporos de *G. albida*, multiplicado em solo (S) ou em solo + 10% composto orgânico (Org); após inoculação, as plântulas foram transferidas para sacos contendo 1 kg de solo (Argissolo-Amarelo-Eutrófico) + 10% de vermicomposto (Tabela 1). Aos 46 dias da inoculação, mudas com oito folhas definitivas foram transplantadas ao campo. Nesse momento, raízes de 10

mudas, selecionadas ao acaso, de cada tratamento de inoculação (S e Org), foram clarificadas e coradas com Clorazol Black-E (Brundrett *et al.*, 1984) para estimativa da percentagem de colonização micorrízica. Nos dois tratamentos, registrou-se 70% de colonização nas raízes.

Adubação

Foram testados dois tipos de adubação: a) Química: antes do transplântio foram aplicados por cova 50 g de superfosfato simples; após 90 dias fez-se a adubação com 45g de uréia + 21g de cloreto de potássio, sendo este procedimento repetido no início (180 dias após transplântio) e 60 dias após a floração; b) Orgânica: foram aplicados 20 litros de vermicomposto/cova (Tabela 1) fracionados em quatro aplicações: na fundação, 90, 180 e 240 dias após o transplântio.

Preparo da área experimental

Foram retiradas 20 amostras de solo, na profundidade de 0-20 e 20-40 cm, que constituíram duas amostras compostas, uma para cada profundidade; ambas foram enviadas para caracterização química e física (Embrapa, 1979) e recomendação para adubação da cultura. Antes do transplântio das mudas, a área foi arada, gradada, sendo preparadas covas (40×40×40 cm) que receberam os fertilizantes recomendados para adubação. Foram aplicados 700 kg ha⁻¹ de calcário dolomítico, para elevar o pH do solo, além dos teores de cálcio e magnésio, conforme análise do solo. Após aplicação dos adubos e corretivos, a área foi irrigada por 15 dias por gotejamento.

Condução do experimento

Foi utilizado espaçamento de 5 m entre plantas × 3 m na fileira (densidade de 660 plantas ha⁻¹), sendo adotado sistema de condução em espaldeira com dois fios (nº 12), um a 1,6 m e outro a 2,0 m do solo. A irrigação foi feita por gotejamento semi-automático (dois gotejadores espaçados 20 cm entre si), por 6 horas, em dias alternados (8,4 L H₂O planta⁻¹ h⁻¹). Podas de formação foram feitas quando a planta atingiu o fio superior e repetidas semanalmente após seis meses da instalação do cultivo. Nesse período, a floração foi iniciada e diariamente as plantas eram polinizadas artificialmente e marcadas, para se determinar o tempo decorrido entre a abertura da flor e a frutificação.

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, em arranjo fatorial de 2×2, compreendendo dois tratamentos de inoculação (plantas pré-inoculadas com *G. albida* multiplicado em solo e em solo + 10% composto orgânico) × dois tipos de adubação (química e orgânica) com cinco repetições. Cada parcela experimental foi constituída por quatro plantas.

Parâmetros avaliados e análise dos dados

Dez meses após a instalação do plantio, foram avaliadas: produtividade ($t\ ha^{-1}$), número de frutos por hectare e características do fruto como comprimento longitudinal e transversal do fruto (cm) e da cavidade ovariana, espessura da casca (mm), comprimento longitudinal e transversal da cavidade ovariana (cm), peso do fruto (g), peso da polpa (g), rendimento em polpa (%), número de sementes/fruto, sólidos solúveis totais-SST ($^{\circ}Brix$), acidez total titulável-ATT (% ácido cítrico g^{-1} polpa), pH do suco e relação SST/ATT. Para se avaliar essas características, foram selecionados dez frutos por planta, em estágio ideal para a colheita (base amarelada) (Vasconcellos, 2000). As características físicas do fruto foram avaliadas com paquímetro digital; os SST foram determinados com auxílio de refratômetro de bolso e expressos em $^{\circ}Brix$; o pH em potenciômetro, após diluição de 1mL de suco em 50 mL de H_2O destilada e a ATT foi determinada por titulometria, utilizando-se a fenolftaleína como indicador de pH, e expressa em % ácido cítrico g^{-1} polpa (Instituto Adolf Lutz, 1985). Os dados de contagem foram transformados ($\sqrt{x + 0,5}$) para satisfazer a homogeneidade de variância e posteriormente submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5 %), utilizando-se o programa Sanest.

Resultados e Discussão

O maior número de frutos por hectare (64.777) e produtividade ($11,08\ t\ ha^{-1}$) do maracujazeiro-doce ocorreu em solo adubado com fertilizantes químicos (Figura 1). O emprego de fontes orgânicas favorece a dinâmica física, química e biológica do solo (Caravaca *et al.*, 2004); entretanto, no presente ensaio, a possível melhoria nas condições do solo não se traduziu por incrementos em produção. Morangueiros cultivados em sistema de produção convencional (com uso de fertilizantes químicos) tiveram maior produção foliar e de frutos do que àqueles cultivados em sistema orgânico (Gleissman *et al.*, 1990). Como sugerido pelos autores, existe necessidade de fase (Lag) para mineralização dos nutrientes presentes no resíduo. Isso possivelmente retarda o efeito da adubação orgânica. Mäder *et al.* (2002) consideraram que o uso de sistemas orgânicos pode reduzir em até 20% a produtividade em relação ao cultivo em sistemas convencionais.

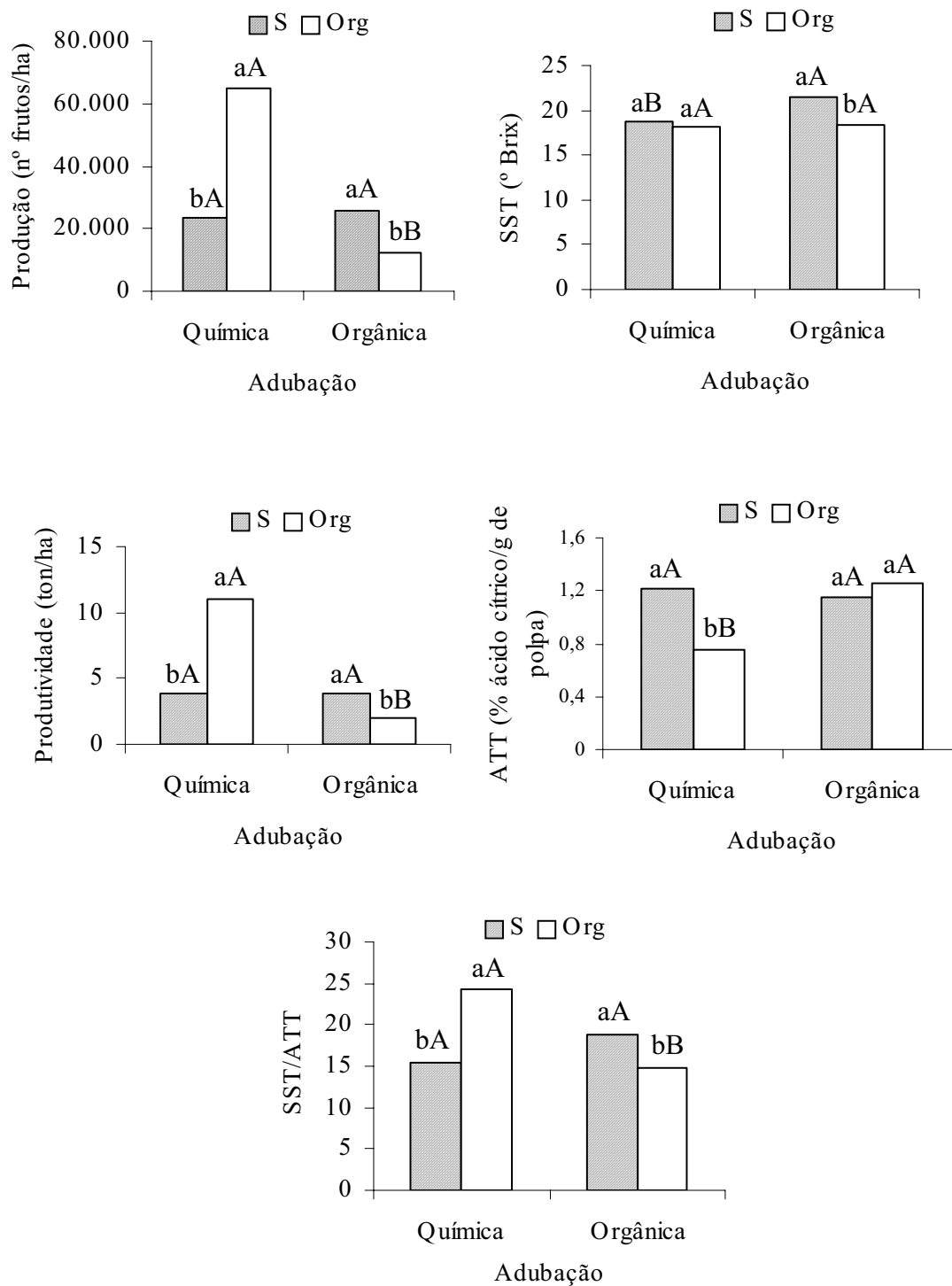


Figura 1. Número de frutos por hectare, produtividade, sólidos solúveis totais (SST), acidez total titulável (ATT) e relação SST/ATT de frutos de maracujazeiro-doce, pré-inoculados com *Gigaspora albida* provindo da multiplicação em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico e cultivado em solo com adubo químico ou orgânico. Médias seguidas da mesma letra, minúscula entre os tratamentos de inoculação dentro de cada tipo de adubação e maiúsculas entre os tratamentos de adubação dentro de cada tratamento de inoculação, não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A ausência de cultivares comerciais, de densidades diferenciadas de plantas por hectare e de práticas distintas de adubação resultam em plantios de maracujazeiros com produtividades não uniformes (Martins *et al.*, 2003), que mesmo assim podem alcançar de 15-20 t ha⁻¹ (Vasconcellos *et al.*, 2001b). A combinação *G. albida* (inóculo Org) + adubação química proporcionou a produção de 11,08 t ha⁻¹ de frutos (Figura 1). Esse sistema é eficiente, pois o valor é referente apenas ao primeiro pico da produção anual. A produtividade de 17 t ha⁻¹ e 20 t ha⁻¹, obtida, respectivamente, por Silva *et al.* (2004) e Damatto Jr. *et al.* (2005), foi calculada a partir dos dois picos de produção anual da cultura. Além disso, reflete valores médios do 1º e do 2º ano de produção, quando se observa maior produção de frutos (Junqueira *et al.*, 2005). Portanto, comparativamente, o sistema testado também se mostrou eficiente.

Em geral, no primeiro ano de cultivo, obtém-se rendimento na produção de frutos em torno de 15-20 kg planta⁻¹ ano⁻¹ (Junqueira *et al.*, 2005). Quando as plantas estavam associadas ao FMA proveniente de multiplicação em adubo orgânico e foram cultivadas em solo com adubo químico foi registrada produção de 98 kg planta⁻¹. Foram obtidos cerca de quatro vezes mais frutos que o esperado para o primeiro ano de produção da cultura, o que mostra a eficácia do sistema adotado para produção do maracujá-doce.

No tratamento mais promissor, nesse estudo, foram aplicados apenas 50g de superfosfato simples + 63 g de cloreto de potássio + 135 g de uréia, o que traduz economia de cerca de 20 vezes na adubação fosfatada recomendada no plantio (Sanzarowicz & Andrade, 2005), sendo dispensável o uso de esterco bovino. Adicionalmente, não foi necessária aplicação de superfosfato simples na adubação para produção, como sugerido por Sanzarowicz & Andrade (2005). A redução na quantidade de adubo aplicado minimizou os custos de produção e favoreceu a atuação do fungo micorrízico, conhecido por aumentar o crescimento vegetal em solos com baixa fertilidade (Kahiluoto *et al.*, 2001).

A maior produtividade registrada no experimento foi obtida nas plantas associadas ao FMA provindo da multiplicação em substrato com adubo orgânico que apresentava elevada fertilidade (Tabela 1), mostrando que esse tipo de substrato pode selecionar e manter fungos mais eficientes (Muthukumar & Udaiyan, 2002). Esses dados contrariam a hipótese de Johnson (1993), o qual sugere que a fertilização seleciona fungos menos eficientes, e concordam com os obtidos por Scullion *et al.* (1998), os quais registraram que fungos de áreas com manejo orgânico foram mais eficientes em melhorar a nutrição fosfatada de *Allium ameloprasum* e de *Trifolium repens*, quando comparado ao efeito produzido por fungos de áreas sem aplicação de fertilizantes orgânicos. Stürmer (2004) também mencionou que FMA

provindos de áreas com 24 mg P dm^{-3} promoveram mais benefícios em soja (*Glycine max* L.) do que aqueles oriundos de solos com 15 mg P dm^{-3} .

O tipo de adubação aplicada (química ou orgânica) no cultivo afetou o desempenho do FMA. Em solo submetido à fertilização química, plantas associadas a *G. albida* multiplicado em solo + composto orgânico produziram duas vezes mais frutos, em relação às micorrizadas com o outro isolado de FMA (S) (Figura 1). Por outro lado, quando as plantas foram mantidas em cultivo orgânico, maior produtividade foi alcançada com o FMA multiplicado em solo (Figura 1). Esse resultado não suporta a hipótese inicial do trabalho e contraria dados obtidos em casa-de-vegetação, que indicaram que FMA adaptados têm melhor desempenho quando submetidos à condição edáfica em que foi propagado (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2002); Os isolados usados nesse estudo haviam sido testados na formação de mudas do maracujazeiro-doce em casa de vegetação, mas as respostas obtidas não se repetiram em campo. Por outro lado, em condições de campo, a inoculação com FMA nativos favoreceu o crescimento e nutrição mineral de *Olea europaea* L., *Rethama sphaerocarpa* (L.) Boissier e *Rhamnus lycioides* L. mais do que a aplicação do FMA alóctone *Glomus claroideum* Schenck & Smith (Caravaca *et al.*, 2005). Melhor atuação desses FMA nativos (adaptados) foi sobre parâmetros de crescimento do vegetal (biomassa e conteúdo nutricional) (Caravaca *et al.*, 2005). No presente trabalho, o melhor desempenho de *G. albida*, foi verificado em termos de produção de frutos. Confirma-se a necessidade de ensaios em campo para validação de dados observados na fase de muda, pois em condições de campo, outros fatores, tal como a população nativa de FMA na área, podem interferir nas respostas do hospedeiro.

A duração do experimento (10 meses) pode não ter sido suficiente para se confirmar a hipótese inicial do trabalho (*G. albida* multiplicado em substrato orgânico com melhor desempenho em solo com adubo orgânico), pois Requena *et al.* (2001) só observaram que FMA nativos (adaptados) foram mais eficientes no estabelecimento de *Anthyllis cytisoides* L. em áreas desertificadas em relação ao FMA não adaptado *Glomus intraradices* Schenck & Smith após três anos de transplantio.

Quando multiplicado em solo com elevados teores de P (42 mg dm^{-3}) *G. albida* foi mais eficiente em solo com adubo químico e com baixa quantidade de P ($4,35 \text{ g P planta}^{-1}$). Em contrapartida, maior eficiência do outro isolado (S), produzido em solo com baixo teor de P (4 mg dm^{-3}), foi registrada no solo adubado com vermicomposto ($31,9 \text{ g P planta}^{-1}$). Este resultado indica que *G. albida* teve melhor atuação em condição de solo diferente daquela em que foi propagado. A plasticidade funcional nos FMA, decorrente da presença de núcleos distintos, evidenciada em espécies de *Glomus* Tulasne & Tulasne (Weissenhorn *et al.*, 1994),

poderia explicar o melhor desempenho de *G. albida* em condições diferentes daquelas em que foi multiplicado.

Nos frutos de maracujazeiro-doce, os sólidos solúveis totais (SST) variam entre 15,3-24,7 °Brix (Veras *et al.*, 2000) e a acidez total titulável entre 0,6-1,8% de ácido cítrico (Vasconcellos *et al.*, 1993). Todos os tratamentos utilizados produziram frutos com teores entre esses limites (Figura 1), porém o uso de vermicomposto favoreceu a formação de frutos com teores mais elevados de SST e ATT ($P < 0,01$). Resultados similares foram obtidos por Damatto Jr. *et al.*, (2005), os quais evidenciaram que o uso de vermicomposto favoreceu a formação de frutos com elevados SST (24 °Brix) e ATT (2,21 g ácido cítrico 100 g polpa⁻¹), sendo os efeitos atribuídos a maior disponibilidade de nutrientes no substrato.

No cultivo orgânico, o uso de *G. albida* multiplicado em solo favoreceu a produção de frutos com elevado SST, quando comparado ao tratamento com o outro isolado (Figura 1). É possível que o referido isolado mesmo provindo de solo com baixo P (Tabela 1), tivesse habilidade diferenciada para absorver fósforo, requerido em elevadas concentrações na via de formação de açúcares, considerando que em maracujá, os SST são constituídos principalmente por carboidratos (Folegatti & Matsuura, 2002). Na biossíntese de outros compostos que necessitam de elevadas concentrações de P nas vias metabólicas, como por exemplo, óleos essenciais, o papel do FMA no processo é conhecido (Kapoor *et al.*, 2002); no entanto, devido à elevada acidez encontrada nos frutos, os elevados valores de SST encontrados não se traduziram em aumento na relação SST/ATT (Figura 1).

No tratamento com fertilizantes químicos a origem do FMA não afetou os SST (Figura 1), mas, o emprego do isolado provindo da multiplicação em solo + 10% de composto orgânico favoreceu a produção de frutos com melhor qualidade (reduzida acidez e maior relação SST/ATT). Kapoor *et al.* (2004) também evidenciaram que o uso combinado de fertilizantes químicos (20 kg KH₂PO₄ ha⁻¹) e *Glomus fasciculatum* (Thaxter) Gerdemann & Trappe emend. Walker & Schenck melhorou a qualidade dos óleos essenciais em *Foeniculum vulgare* Mill. Mesmo que a combinação (adubo orgânico + FMA multiplicado em solo) tenha promovido a formação de frutos com elevados teores de SST, o tratamento de adubação química + FMA multiplicado em adubo orgânico favoreceu a produção de frutos com elevada relação SST/ATT (Figura 1). Esta é uma característica desejável, indicando que os frutos são mais doces e menos ácidos, sendo, portanto mais apreciados.

Algumas características dos frutos são determinadas pelo genótipo do vegetal, não sendo influenciadas pela presença do fungo micorrízico na raiz, que teria maior atuação na fisiologia do hospedeiro. Talvez por isso não tenham sido detectadas diferenças nos demais

parâmetros observados (tamanho do fruto e da cavidade ovariana, espessura da casca, peso do fruto e da polpa, rendimento em polpa, nº sementes/fruto, pH do suco e tempo de abertura da flor até o ponto de colheita) (Tabela 2).

Tabela 2. Níveis de significância para adubação e fungos e interação dos parâmetros avaliados na produtividade do maracujazeiro-doce no Vale de São Francisco, Petrolina, PE

Parâmetro	Adubação (1)	FMA (2)	1 × 2	CV(%)
CLF (cm)	ns	ns	ns	4,11
CTF (cm)	ns	ns	ns	6,58
CLCO (cm)	ns	ns	ns	6,78
CTCO (cm)	ns	ns	ns	9,47
Espessura da casca (mm)	ns	ns	ns	13,46
Peso médio dos frutos (g)	ns	ns	ns	12,69
Peso médio da polpa (g)	ns	ns	ns	24,44
Rendimento em polpa (%)	ns	ns	ns	10,94
TAF (dias)	ns	ns	ns	5,58
Nº de sementes/fruto	ns	ns	ns	14,23
pH do suco	ns	ns	ns	2,99
Produção (nº frutos ha ⁻¹)	**	**	**	9,36
Produtividade (ton ha ⁻¹)	**	**	**	14,15
SST (°Brix)	**	**	**	4,26
ATT (% ácido cítrico g ⁻¹ polpa)	**	**	**	5,16
Relação SST/ATT	**	*	**	13,91

CLF= comprimento longitudinal dos frutos; CTF= comprimento transversal dos frutos; CLCO= comprimento longitudinal da cavidade ovariana; CTCO= comprimento transversal da cavidade ovariana; SST= sólidos solúveis totais; ATT= acidez total titulável; TAF= tempo decorrido da abertura da flor até o ponto de colheita. ns= não significativo; * ($P < 0,05$); ** ($P < 0,01$).

Os frutos de maracujazeiro-doce atualmente comercializados apresentam elevada variação morfológica (Vasconcellos *et al.*, 2001b), devido à recente exploração da cultura e à propagação quase exclusivamente por semente (Osipi & Nakagawa, 2005), o que gera desuniformidade nos pomares. No entanto, os dados de peso médio, comprimento, nº de sementes/fruto e de pH do suco estão de acordo com o padrão (Oliveira *et al.*, 1982); embora tenha sido registrado maior rendimento em polpa. O tempo decorrido da abertura entre a flor e

a colheita dos frutos foi similar ao registrado por Martins *et al.* (2003); entretanto, os autores encontraram frutos com cavidade ovariana longitudinal e transversal, menor e maior, respectivamente, do que o evidenciado no presente estudo (Tabela 3). Observa-se, portanto, que de modo geral, no Vale do Submédio São Francisco podem ser produzidos frutos que se enquadram dentro dos valores referenciados para outras regiões brasileiras onde também se cultiva o maracujazeiro-doce (Martins *et al.*, 2003).

Tabela 3. Valores médios para as características de frutos de maracujazeiro-doce, micorrizado com *Gigaspora albida* (produzido em solo com (Org) ou sem (S) 10% de composto orgânico) e cultivado em solo adubado com fertilizantes químicos ou orgânicos

Parâmetros	Tratamentos			
	Adubação química		Adubação orgânica	
	S	Org	S	Org
CLF (cm)	9,63	9,74	9,73	9,79
CTF (cm)	6,75	6,68	6,32	6,80
CLCO (cm)	6,97	6,52	7,10	6,98
CTCO (cm)	5,26	4,91	4,81	5,16
Espessura da casca (cm)	0,77	0,88	0,77	0,79
Peso médio dos frutos (g)	164,87	171,05	151,91	153,90
Peso médio da polpa (g)	33,71	35,27	33,47	38,78
Rendimento em polpa (%)	23,43	22,96	23,67	27,44
TAF (dias)	57	60	58	55
Nº de sementes/fruto	149	151	141	199
pH do suco	3,56	3,67	3,51	3,57

CLF= comprimento longitudinal dos frutos; CTF= comprimento transversal dos frutos; CLCO= comprimento longitudinal da cavidade ovariana; CTCO= comprimento transversal da cavidade ovariana; TAF= tempo decorrido da abertura da flor até o ponto de colheita.

O maracujazeiro-doce iniciou a floração em junho/julho (seis meses após o transplântio) com pico de produção de frutos em agosto/setembro. Assim, a produção no Vale do Submédio São Francisco nos meses de agosto/setembro constitui mercado adicional e competitivo para a comercialização desta fruteira. Em São Paulo, Estado que detém a maior produtividade nacional (Manica & Oliveira Jr., 2005), os picos de produção são em dezembro/janeiro e em junho/julho (Vasconcellos *et al.*, 2001a).

Conclusões

A condição de multiplicação do inóculo micorrízico interfere na produção e na qualidade de frutos do maracujazeiro-doce, com as respostas moduladas pelo tipo de adubação empregada.

Em condições de campo, o efeito da micorrização pode ser observado na fase produtiva do hospedeiro, mesmo se o FMA inoculado é oriundo de substrato com diferentes condições de fertilidade.

O cultivo em solo com fertilizantes químicos de maracujazeiros-doce micorrizados com isolado de *G. albida* multiplicado em solo + 10% de composto orgânico pode constituir alternativa para maior produção de frutos com reduzida acidez e elevada SST/ATT, no Vale do Submédio São Francisco.

Referências bibliográficas

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; GAZEY, C. Selection of inoculant vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. In: NORRIS, J.R.; READ, D.; VARMA, A.K. (Ed.). **Techniques for Mycorrhizal Research**. San Diego: Academic Press, 1994. p.461-481.
- ANJOS, E.C.T.; CAVALCANTE, U.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**, v. 40, p. 345-351, 2005.
- BRAGA, M.F.; JUNQUEIRA, N.T.V. Uso potencial de outras espécies do gênero *Passiflora*. **Informe Agropecuário**, v.21, p. 72-75, 2000.
- BRUNDRETT, M.C.; PICHÉ, Y.; PETERSON, R.L. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. **Canadian Journal of Botany**, v.62, p.2128-2134, 1984.
- CANÇADO JÚNIOR, F.L.; ESTANISLAU, M.L.L.; PAIVA, B.M. Aspectos econômicos da cultura do maracujá. **Informe Agropecuário**, v.21, p.10-17, 2000.
- CARAVACA, F. ALGUALCIL, M.M.; AZCÓN, R.; DÍAZ, G.; ROLDÁN, A. Comparing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and *Aspergillus niger* to enhance field performance of the leguminous shrub *Dorycnium pentaphyllum* L. **Applied Soil Ecology**, v. 25, p.169-180, 2004.
- CARAVACA, F.; ALGUALCIL, M.M.; BAREA, J.M.; ROLDÁN, A. Survival of inocula and native AMF fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p.227-233, 2005.

DAMATTO JÚNIOR, E.R.; LEONEL, S.; PEDROSO, C.J. Adubação orgânica na produção e qualidade de frutos de maracujá-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.188-190, 2005.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise do solo**. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solo, 1979. 235p.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.

FOLEGATTI, M.I.S.; MATSUURA, F.C.A.U. Produtos. In: MATSUURA, F.C.A.U.; FOLEGATTI, M.I.S. (Ed.). **Maracujá Pós-colheita**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.42-47.

GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; TROUVELOT, A. Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. In: WHIPPS, J.M.; R.D. LUMSDEN, R.D (Ed.). **Biotechnology of fungi for improving plant growth**. New York: Cambridge University Press, 1988. p. 41-54.

GLEISSMAN, S.R.; SWEZEY, S.L.; ALLISON, J.; COCHRAN, J.; FARREL, J.; KLUSON, R.; ROSADO-MAY, F.; WERNER, M. Strawberry production systems during conversion to organic matter. **California Agriculture**, v.44, p.5-7, 1990.

GONZALEZ-CHAVEZ, C.; D'HAEN, J.; VANGRONSVELD, J.; DODD, J.C. Copper sorption and accumulation by arbuscular mycelium of different *Glomus* spp. (arbuscular mycorrhizal fungi) isolated from the same polluted soil. **Plant and Soil**, v.246, p.287-297, 2002.

GRAHAM, J.H.; LINDERMAN, R.G.; MENGE, J.A. Development of external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus* spp. in relation to root colonization and growth of troyer citrange. **New Phytologist**, v.91, p.183-189, 1982.

INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: IAL, 1985. 371p.

JOHNSON, N.C. Can fertilization of soil select less mutualistic mycorrhizae? **Ecological Applications**, v.3, p.749-757, 1993.

JUNQUEIRA, N.T.V.; PEIXOTO, J.R.; BRANCHER, A.; JUNQUEIRA, K.P.; FIALHO, J.F. Melhoramento genético do maracujá-doce. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2005. p. 39-46

- KAHILUOTO, H.; KETOJA, E.; VESTBERG, M.; SAARELA, I. Promotion of AM utilization through reduced P fertilization. 2. Field studies. **Plant and Soil**, v.231, p. 65-79, 2001.
- KAPOOR, R.R.; GIRI, B.; MUKERJI, K.G. *Glomus macrocarpum*: a potential bioinoculante to improve essential oil quality and concentration in Dill (*Anethum graveolens* L.) and Carum (*Trachyspermum ammi* (Linn.) Sprague). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.459-463, 2002.
- KAPOOR, R.R.; GIRI, B.; MUKERJI, K.G. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. **Bioresource Technology**, v.93, p.307-311, 2004.
- 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**, v.238, p.267-272, 2002.
- LIMA, A.A.; BORGES, A.L. Solo e clima. In: LIMA, A. A. (Ed.). **Maracujá produção: Aspectos Técnicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p.25-28.
- MÄDER, P.; FLIEßBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biochemistry in organic farming. **Science**, v.296, p.1694-1697, 2002.
- MANICA, I.; OLIVEIRA JR., M.E. Maracujá no Brasil. In: MANICA, I. (Ed.) **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Ed. Editora Cinco Continentes, 2005. p.11-26.
- MARTINS, M.R.; OLIVEIRA, J.C.; DIMAURO, A.O.; SILVA, P.C. Avaliação de populações de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) obtidas de polinização aberta. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.25, p.111-114, 2003.
- MUNKVOLD, L.; KJØLLER, R.; VESTEBERG, M. ROSENDAHL, S. & JAKOBSEN, I. High functional diversity within species of arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.164, p.357-364. 2004.
- MUTHUKUMAR, T.; UDAIYAN, K. Growth and yield of cowpea as influenced by changes in arbuscular mycorrhiza in response to organic manuring. **Journal of Agronomy & Crop Science**, v.188, p.123-132, 2002.
- OLIVEIRA, J.C.; RUGGIERO, C.; NAKAMURA, K. Variações observadas em frutos de *Passiflora alata* Ait. **Proceedings of the Tropical Region-American Society for Horticultural Science**, v.25, p.343-345, 1982.

- OSIPI, E.A.F.; NAKAGAWA, J. Avaliação da potencialidade fisiológica de sementes de maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryander) submetidas ao armazenamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.27, p.52-54, 2005.
- REQUENA, N.; PEREZ-SOLIS, E.; AZCÓN-AGUILAR, C.; JEFFRIES, P.; BAREA, J.M. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.495-498, 2001.
- SALAMI, A.O.; OSONUBI, O. Improving the traditional landuse system through agrobiotechnology: a case study of adoption of vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) by response poor farmers in Nigeria. **Technovation**, v.22, p. 725-730, 2002.
- SANZONOWICZ, C.; ANDRADE, L.M. Nutrição, adubação e irrigação. In: MANICA, I. (Ed.). **Maracujá-Doce: Tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Editora Cinco Continentes, 2005. p.77-80.
- SCULLION, J.; EASON, W.R.; SCOTT, E.P. The effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi from high input conventional and organic grassland and grass-arable rotations. **Plant and Soil**, v.204, p.243-254, 1998.
- SILVA, H.A.; CORRÊA, L.S.; BOLIANI, A.C. Efeitos do sistema de condução, poda e irrigação na produção do maracujazeiro doce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.26, p. 450-453, 2004.
- STÜRMER, S.L. Efeito de diferentes isolados fúngicos da mesma comunidade micorrízica no crescimento e absorção de fósforo em soja e trevo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do solo**, v. 28, p.611-622, 2004.
- VASCONCELLOS, M.A.S. **Biologia Floral do maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand.) nas condições de Botucatu-SP**. 1991. 98p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- VASCONCELLOS, M.A.S. Maracujazeiro-doce: sistema de produção. **Informe Agropecuário**, v.21, p. 76-80, 2000.
- VASCONCELLOS, M.A.S.; BRANDÃO FILHO, J.U.T.; VIEITES, R.L. Maracujá-doce. In: BRUCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. (Ed.). **Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agro-indústria, mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001a. p.33-49.
- VASCONCELLOS, M.A.S.; SAVAZAKI, E.T.; FILHO, H.G.; BUSQUET, R.N.B.; MOSCA, J.L. Caracterização física e quantidade de nutrientes em frutos de maracujá-doce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.690-694, 2001b.

VASCONCELLOS, M.A.S.; CEREDA, E.; ANDRADE, J.M.B.; BRANDÃO FILHO, J.V.T. Desenvolvimento de frutos do maracujazeiro ‘doce’ (*Passiflora alata* Dryand) nas condições de Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.15, p.153-158, 1993.

VERAS, M.C.M.; PINTO, A.C.Q.; MENESES, J.B. Influência da época de produção e dos estádios de maturação nos maracujás doce e ácido nas condições de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.959-966, 2000.

WEISSENHORN, I.; GLASHOFF, A.; LEYVAL, C.; BERTHELIN, B. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soil. **Plant and Soil**, v.167, p.189-196, 1994

WOOD, T. VA mycorrhizal fungi: challenges for commercialization. In: ARORA, D.K.; RAI, B.; MUKERJI, K.G.; KNUDSEN, G.R. (Ed.). **Handbook of Applied Mycology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p.823-847

Capítulo 9

Produção de glomalina e atividade microbiana na rizosfera de maracujazeiros-doce em função do uso de vermicomposto e fontes de inóculo micorrízico

*Artigo a ser submetido para publicação no periódico *Biology and Fertility of Soils**

Produção de glomalina e atividade microbiana na rizosfera de maracujazeiros-doce em função do uso de vermicomposto e fontes de inóculo micorrízico

Fábio Sérgio Barbosa da Silva¹ · Adriana Mayumi Yano-Melo¹ · Nataniel Franklin de Melo² · Geraldo Milanez de Resende² · Leonor Costa Maia^{1*}

¹Laboratório de Micorrizas, Depto. Micologia, UFPE, Cidade Universitária, CEP. 50670-420, Recife, PE, Brasil.

(fsbsbarbosa@bol.com.br; amymelo17@hotmail.com; leonorcmaia@yahoo.com).

²Embrapa Semi-Árido, C.P. 23, CEP. 56302-970, Petrolina, PE, Brasil.

(nataniel@cpatsa.embrapa.br; gmlanez@cpatsa.embrapa.br).

*autor para correspondência (Tel: +55-81-2126 8865; Fax: +55-81-2126 8482).

Resumo

O uso de adubos orgânicos na agricultura favorece as características e os microrganismos do solo, entre esses, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), que produzem uma glicoproteína (glomalina) relacionada à qualidade edáfica. Contudo, não se determinou se a produção de glomalina é afetada pela fertilização orgânica e pelo isolado de FMA. Mudanças de maracujazeiro-doce foram pré-inoculadas com *Gigaspora albida* multiplicado em solo (S) ou em solo + 10% de composto orgânico (Org) e transplantadas para covas adubadas com vermicomposto (20 L planta⁻¹) ou com fertilizantes químicos (50 g superfosfato simples + 135 g de uréia + 63 g de cloreto de potássio por planta). O delineamento experimental foi em 5 blocos casualizados em fatorial: 2 tratamentos de inoculação (S e Org) × 2 tipos de adubação (química e orgânica), com cada parcela experimental constituída por 4 plantas. Dez meses após a instalação do cultivo, avaliou-se: teores de P, de matéria orgânica (MO), pH e capacidade de troca catiônica (CTC) do solo, produção de glomalina total (GT) e facilmente extraível (GFE) em agregados de 1-2mm e < 1mm, evolução de CO₂, atividade enzimática geral do solo, esporulação de FMA e colonização micorrízica. Maiores valores para as variáveis estudadas foram obtidos com o uso do vermicomposto, em relação ao uso de fertilizantes químicos; por outro lado, interação entre fertilização e fonte de FMA afetou apenas a produção de glomalina (GFE), a evolução de CO₂ e a colonização micorrízica. As frações de glomalina foram positivamente correlacionadas com os teores de P (r= 0,87) e MO (r= 0,87), valores de CTC (r= 0,87), com a densidade de esporos (r= 0,55) e evolução de CO₂ (r= 0,72). Conclui-se que a produção de glomalina e a atividade microbiana do solo são favorecidas pelo uso de vermicomposto, mas os benefícios podem ser modulados pela fonte de inóculo micorrízico empregada na fase de formação de mudas de maracujazeiro-doce.

Palavras-chave - Adubação orgânica; glicoproteína; hidrólise de FDA; evolução de CO₂; Glomeromycota, *Passiflora alata*.

Introdução

A necessidade de sistemas agrícolas sustentáveis tem impulsionado a busca por práticas que favoreçam a produtividade de culturas, sem comprometer a qualidade do solo; nesse sentido, o uso de adubos orgânicos de qualidade e em doses adequadas é uma alternativa de baixo custo que melhora as características físicas, químicas, físico-químicas e microbiológicas do solo (Antolín *et al.* 2005).

A simbiose micorrizica arbuscular é influenciada por várias práticas agrícolas, entre elas a aplicação de adubos orgânicos, que podem favorecer os fungos micorrízicos arbusculares (FMA), aumentando a taxa de colonização intra e extraradicular (Bending *et al.* 2004), a reprodução (Gaur & Adholeya 2005) e a eficiência simbiótica do fungo (Lins *et al.* 2003).

No micélio externo dos FMA uma glicoproteína é produzida, denominada glomalina, que juntamente com a trama de hifas no solo aumenta a agregação de partículas (Nichols 2003) e o estoque de carbono (Rillig *et al.* 2003), contribuindo para melhoria da qualidade edáfica. Fatores como fertilidade do solo (Lovelock *et al.* 2004a), práticas de manejo (Knorr *et al.* 2003) e espécie vegetal (Bird *et al.* 2002) interferem na deposição deste composto. Apesar da estreita relação com os teores de carbono (Wright & Upadhyaya 1998), pouco se conhece sobre o impacto do uso de adubos orgânicos, sobre a produção de glomalina no solo. Recentemente, Wuest *et al.* (2005) sugeriram que a aplicação de 22,4 t ha⁻¹ ano⁻¹ de esterco favoreceu a produção dessa glicoproteína.

Rillig *et al.* (2005) registraram que espécies de FMA contribuem de modo diferenciado para a produção de glomalina, confirmando sugestões prévias de Wright *et al.* (1996). Porém, mesmo considerando que existem diferenças intraespecíficas entre FMA, na promoção do crescimento vegetal (Vivas *et al.* 2003), não se determinou se diferentes isolados de uma mesma espécie contribuem de modo distinto para a síntese de glomalina no solo. Esse conhecimento é importante na indicação de fungos eficientes em promover a agregação do substrato e conseqüente melhoria na qualidade do solo (Rillig 2004).

O emprego de fontes orgânicas na agricultura favorece a atividade dos microrganismos do solo, sendo freqüentemente registradas maiores taxas de respiração microbiana e atividade de enzimas em tais sistemas (Fernandes *et al.* 2005). Esses benefícios podem ser maximizados pelo emprego de materiais compostados, como apontado por Pascual *et al.* (2002).

O papel dos FMA na melhoria da qualidade edáfica também é conhecido (Duponis *et al.* 2005). Esses fungos podem afetar os demais microrganismos através da rede micelial e

seus subprodutos, bem como pela modificação nos rizodepósitos (Wamberg *et al.* 2003). A micorrização de *Dorycnium pentaphyllum* L. com *Glomus deserticola* Trappe, Bloss & Menge ou *Glomus.intraradices* Schenck & Smith favoreceu a atividade de enzimas (desidrogenase, urease, fosfatase ácida e β -glucosidase) em solo adubado com resíduo de beterraba + *Aspergillus niger* Tiegh + fosfato de rocha, em relação ao solo sem adubo, sendo os maiores valores observados quando as plantas estavam associadas a *G. deserticola*, indicando que os benefícios podem ser dependentes da espécie de FMA (Caravaca *et al.* 2004). Todavia, o impacto do uso de fontes distintas de inóculo da mesma espécie de FMA sobre tais processos não é conhecido.

Foi testada a hipótese de que a aplicação de adubo orgânico e a fonte de inóculo de FMA empregada na formação de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) interferem na produção de glomalina e na atividade microbiana do solo.

Material & métodos

Área experimental

O experimento foi conduzido no Campo Experimental de Bebedouro (Embrapa Semi-árido, Petrolina-PE), no período de dezembro-2003 a outubro-2004. O clima da região é do tipo Bswb [Clima Semi-Árido, com temperaturas altas ($> 22^{\circ}\text{C}$) e chuvas escassas no inverno ($< 250 \text{ mm}$)], segundo Köppen. Durante o experimento o índice pluviométrico foi de 801,1 mm e a temperatura atingiu médias mínimas e máximas de $18,11^{\circ}\text{C}$ e $32,10^{\circ}\text{C}$, respectivamente. O solo da área é do tipo Argissolo-Amarelo-Eutrófico (Embrapa 1999). Antes do transplântio das mudas, a área foi arada e gradeada e foram confeccionadas covas ($40 \times 40 \times 40 \text{ cm}$) que receberam os fertilizantes mediante recomendação de adubação. Foram aplicados 700 kg ha^{-1} de calcário dolomítico, visando elevar o pH do solo e os teores de cálcio e magnésio. Após aplicação dos adubos e corretivos, a irrigação foi mantida por 15 dias.

Material

Plântulas com duas folhas definitivas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) foram inoculadas, separadamente, com solo-inóculo fornecendo 200 esporos de *Gigaspora albida* Schenck & Smith, multiplicado em solo (S) ou em solo + 10% composto orgânico (Org) e acondicionadas em potes com capacidade de 200 g de substrato (solo do experimento de campo e 10% de vermicomposto). Após 15 dias, as plântulas foram transferidas para sacos contendo 1 Kg do mesmo substrato (Tabela 1). Aos 46 dias da inoculação, mudas com oito folhas definitivas foram transplantadas ao campo. Foram testados dois tipos de adubação:

química e orgânica. Na primeira, foram aplicados 50 g de superfosfato simples antes do transplântio; após 90 dias fez-se a adubação com 45 g de uréia + 21 g de cloreto de potássio, sendo este procedimento repetido no início (180 dias após o transplântio) e 60 dias após a floração. Na adubação orgânica foram aplicados 20 L de vermicomposto/cova (Tabela 1) fracionados em quatro aplicações iguais: na fundação, e aos 90, 180 e 240 dias após o transplântio.

Tabela 1. Caracterização química dos substratos utilizados para multiplicação de *Gigaspora albida*, preparo das mudas de *Passiflora alata* e como adubação orgânica para cultivo do maracujazeiro-doce

Substratos	pH	P*	C	N	CTC	C/N
	(H ₂ O-1:2,5)	(mg dm ⁻³)	(g Kg ⁻¹)		(cmol _c dm ⁻³)	
Multiplicação de FMA						
Solo	4,6	4	13,3	1,2	1,69	11,08
Solo+10% CO	5,6	53	26,1	2,0	9,89	13,05
Preparo das mudas						
Solo+10% VC	7,1	74	15,56	1,41	6,08	11,03
Adubação orgânica						
Vermicomposto	7,0	1450	124,41	11,31	12,00	11,00

CO=composto orgânico; VC=vermicomposto; CTC=capacidade de troca catiônica.* Mehlich I

Delineamento experimental

Foram testados dois fatores: adubação e fontes de inóculo micorrízico. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso em arranjo fatorial de 2×2 , constituindo de dois tratamentos de inoculação (plantas pré-inoculadas com *G. albida* multiplicado em solo ou em solo + 10 % de composto orgânico) \times dois tipos de adubação (química e orgânica), e cinco repetições. Cada parcela experimental foi constituída por 4 plantas.

Condução do experimento

Foi utilizado o espaçamento de 5×3 m, sendo adotado sistema de condução em espaldeira com dois fios (nº 12), um a 40 cm e outro a 2 m do solo. A irrigação foi feita por gotejamento semi-automático (dois gotejadores espaçados 20 cm entre si) por 6 horas em dias alternados (8,4 L H₂O planta⁻¹ h⁻¹). Podas de formação foram feitas quando a planta atingiu o

fio superior, e após seis meses da instalação do cultivo o procedimento foi realizado semanalmente.

Amostragem e parâmetros avaliados

Dez meses após a instalação do plantio foram retiradas amostras de solo (0-20 cm de profundidade) a 15 cm do caule, em quatro pontos equidistantes, para cada uma das quatro plantas da parcela experimental. As 16 amostras (quatro por planta) de cada parcela constituíram amostra composta. Parte foi enviada à Embrapa Semi-Árido para determinação do pH, da capacidade de troca catiônica (CTC) e dos teores de fósforo (P) e matéria orgânica (MO) (Embrapa 1979) e outra destinada à avaliação dos parâmetros bioquímicos e microbiológicos do solo. A atividade enzimática do solo foi estimada pela hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA) (Swisher & Carroll 1980); a respiração microbiana foi determinada por evolução de CO₂ (Grisi 1978); as frações de glomalina facilmente extraível (GFE) e total (GT) foram extraídas de duas classes de agregados: < 1 e 1-2 mm de diâmetro, sendo utilizada a metodologia de Wright & Upadhyaya (1998), contudo, para extração da fração GT foram necessários dois ciclos de extração em autoclave (121 °C/ 1 h), utilizando citrato de sódio (50mM; pH 8,0); para a dosagem protéica utilizou-se o método de Bradford (1976). A colonização micorrízica foi determinada pela técnica da interseção de quadrantes (Giovannetti & Mosse 1980), após diafanização das raízes (KOH 10%) e coloração com Clorazol Black 0,03% (Brundrett *et al.* 1984). Os esporos de FMA foram extraídos (Gerdemann & Nicolson 1963; Jenkins 1964) e quantificados em estereomicroscópio (40 ×).

Análise dos dados

Foram realizadas análises de correlação simples de Pearson (r) entre as variáveis estudadas. Os dados de densidade de esporos foram transformados em $\sqrt{x+0,5}$ e os de colonização micorrízica em $\arcseno \sqrt{x+0,5}$ para satisfazer a homogeneidade de variância, e posteriormente submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5 %), utilizando-se o programa Sanest.

Resultados e Discussão

Houve efeito da adubação para as características de fertilidade do solo (pH, CTC, P e MO), bem como para as frações de glomalina total, densidade de esporos e atividade enzimática geral do solo, porém não foi observado efeito dos tratamentos de micorrização

nem da interação com a adubação (Tabela 2). Por outro lado, para os demais parâmetros avaliados a interação entre adubação e micorrização foi significativa (Tabela 2).

Aumento no pH, na CTC e nos teores de P e MO foram evidenciados quando se utilizou vermicomposto como alternativa de adubação (Tabela 3). Essa melhoria nas propriedades do solo é freqüentemente registrada quando se adiciona fertilizantes orgânicos ao solo (Mäder *et al.* 2002; Antolín *et al.* 2005).

Tabela 2. Níveis de significância para adubação, fungos e interação entre as variáveis estudadas, em cultivo do maracujazeiro-doce no Vale de São Francisco, Petrolina, PE

Parâmetro	Adubação (1)	FMA (2)	1 × 2	CV (%)
pH	**	ns	ns	2,18
P	**	ns	ns	20,40
Matéria orgânica	**	ns	ns	15,57
CTC	**	ns	ns	10,17
FDA	**	ns	ns	53,91
Emissão de CO ₂	**	ns	**	8,22
GFE (< 1 mm)	**	ns	**	7,65
GFE (1-2 mm)	ns	**	*	11,26
GT (< 1 mm)	**	ns	ns	10,11
GT (1-2 mm)	**	ns	ns	17,26
% colonização micorrízica	**	**	**	6,04
Densidade esporos	**	ns	ns	6,96

CTC= capacidade de troca catiônica; GFE= glomalina facilmente extraível; GT= glomalina total. ns= não significativo; * ($P<0,05$); ** ($P<0,01$).

Quando o solo recebeu adubo orgânico foram registrados incrementos de cerca de 150 % na atividade de hidrólise do FDA (enzimática geral do solo), em relação ao tratamento com fertilizantes químicos (Tabela 4). Com resultados semelhantes, Pérez Sarmentero *et al.* (1994) verificaram que a aplicação de 20 t ha⁻¹ de composto orgânico incrementou a atividade de hidrólise do FDA em relação ao controle sem adubação, ou à aplicação de adubos químicos. Pankhurst *et al.* (2005) também observaram que a aplicação de resíduos orgânicos no cultivo de cana-de-açúcar favoreceu a atividade hidrolítica do FDA. Este benefício pode ser atribuído ao fornecimento de substratos para atividade microbiana e à presença de microrganismos metabolicamente ativos e enzimas aderidas ao vermicomposto aplicado (Caravaca *et al.* 2005;

Izquierdo *et al.* 2005). Além disso, em solos adubados com fertilizantes orgânicos, ocorre redução na densidade aparente, que resulta em aumento na porosidade, contribuindo para o melhor desenvolvimento do vegetal e conseqüente exsudação, que serve de fonte energética para os microrganismos rizosféricos (Marinari *et al.* 2000; Izquierdo *et al.* 2005).

Tabela 3. Influência da fertilização química e orgânica nas características químicas do solo após cultivo durante dez meses do maracujazeiro-doce associado a *Gigaspora albida*

Adubação	Características químicas			
	pH (1:2,5 H ₂ O)	P* (mg dm ⁻³)	MO (g kg ⁻¹)	CTC (cmol _c dm ⁻³)
Química	6,98 b	13,40 b	6,08 b	2,40 b
Orgânica	7,18 a	36,00 a	10,51 a	3,46 a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey P<0,05.

*Mehlich

A produção de esporos de FMA na rizosfera de *P. alata* foi beneficiada pela presença de vermicomposto (Tabela 4). O aumento na reprodução dos fungos pode ser relacionado ao estímulo na esporulação, quando fontes orgânicas são aplicadas ao solo (Gaur & Adholeya 2005). Isso decorre da alteração na concentração dos nutrientes do solo, pela adubação (Muthukumar & Udaiyan 2002).

No solo adubado com vermicomposto houve incremento de 80 e 90% na produção de glomalina total, em relação ao tratamento com fertilizantes químicos (Tabela 4).

Tabela 4. Influência da fertilização química e orgânica na concentração de glomalina total (GT) em duas classes de agregados (<1 e 1-2 mm), na densidade de esporos de FMA (DE) e na atividade enzimática geral (AEG) de solo após cultivo do maracujazeiro-doce associado a *Gigaspora albida* durante dez meses

Adubação	Parâmetros			
	GT		DE	AEG
	(mg g agregado ⁻¹) (< 1mm)	(1-2 mm)	(esporos 100 g ⁻¹)	(µg FDA hidrolisado g ⁻¹ solo seco h ⁻¹)
Química	0,73 b	0,99 b	211 b	6,43 b
Orgânica	1,34 a	1,89 a	278 a	12,25 a

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A glomalina no solo é positivamente relacionada com a produção de hifas (Treseder *et al.* 2004), que é estimulada pela adubação orgânica do substrato (Gryndler *et al.* 2002). Assim, é possível que a síntese desta proteína tenha sido estimulada pelo aumento na fertilidade do solo, como apontado por Lovelock *et al.* (2004b). Nessas condições ocorre maior produção de micélio externo, que apresenta glomalina como componente de parede (Driver *et al.* 2005). Além disso, a glomalina presente em esporos de FMA (Wright *et al.* 1996), que foram produzidos em maior quantidade no solo com vermicomposto (Tabela 4), pode ter contribuído para as maiores estimativas obtidas no tratamento com adubo orgânico.

A aplicação de vermicomposto favoreceu a colonização micorrízica, em relação ao uso de fertilizantes químicos (Figura 1), situação que tem sido relatada em outros sistemas (Mader *et al.* 2002; Bending *et al.* 2004). Ryan *et al.* (1994) constataram que trigo cultivado em sistema orgânico teve as raízes três vezes mais colonizadas que aquele mantido em sistema convencional, fato que Kurle & Pfleger (1994) atribuem ao aumento nos teores de matéria orgânica do solo em áreas orgânicas.

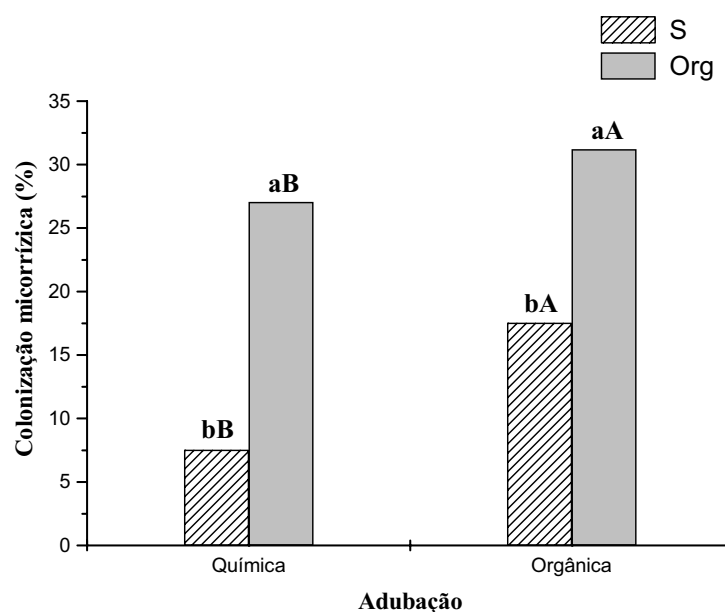


Figura 1. Colonização micorrízica por *Gigaspora albida* multiplicado em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico, em raízes de *Passiflora alata* cultivada em solo adubado com fertilizantes químicos e orgânicos, no Vale do Submédio São Francisco, Petrolina, PE.

Barras com letras iguais, maiúsculas entre os tratamentos de adubação dentro de cada tipo de inóculo e minúsculas entre os tratamentos de inoculação dentro de cada tipo de adubação, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Apesar dos elevados teores de P prejudicarem a fase intra-radicular da simbiose (Dann *et al.* 1996), esse não foi o fator principal para redução na formação de micorriza no cultivo químico do maracujeiro-doce, em relação a aplicação de adubo orgânico (Figura 1), visto que os maiores teores de P foram registrados nos solos com vermicomposto (Tabela 3). Joner (2000) sugeriu que o uso de fertilizantes orgânicos tem efeito menos deletério que a aplicação de doses equivalentes de adubos minerais (NPK), visto que o P orgânico presente nos adubos orgânicos, mesmo em elevadas concentrações, não inibe o desenvolvimento de FMA (Linderman & Davis 2001).

A forma de produção do inóculo de *G. albida* interferiu na extensão da colonização radicular de *P. alata*: nos dois tratamentos de adubação, as plantas previamente inoculadas com o fungo produzido em substrato com adubo orgânico (Org), tiveram maiores taxas de colonização micorrízica, em relação a associação com o outro isolado de *G. albida* (multiplicado em solo) (Figura 1). Com resultados semelhantes, Scullion *et al.* (1998) verificaram que fungos provindos de áreas com manejo orgânico produziram mais estruturas no córtex radicular de *Trifolium repens* L. e *Allium ameloprasum* L., em relação àqueles de áreas com manejo convencional. Além disso, a adubação orgânica tem sido apontada por selecionar e manter FMA mais eficientes em promover o crescimento vegetal (Muthukumar & Udaiyan 2002). No presente estudo, foi verificado que a adoção desta prática, na fase de produção do inóculo micorrízico, permitiu a propagação de fungos com elevada capacidade de colonização do hospedeiro.

O estímulo da aplicação de vermicomposto e a contribuição diferenciada das fontes de inóculo foram verificados nas duas classes de agregados avaliadas (Figuras 2 e 3), indicando que além da fração comumente utilizada para extração (1-2 mm) desta proteína (Rillig 2004), agregados menores (< 1mm) também podem ser empregados, sem comprometimento das respostas obtidas.

Os maiores depósitos protéicos na rizosfera do maracujazeiro-doce cultivado em solo com vermicomposto ocorreram quando a muda foi previamente micorrizada com *G. albida* (Org), cujo inóculo foi produzido em substrato com adubo orgânico (Figura 3). É provável que a multiplicação em substrato adubado e com elevados teores de fósforo (42 mg P dm^{-3}) tenha permitido ao fungo se adaptar a condição de alta fertilidade, fornecida pela aplicação de vermicomposto, que resultou em maior produção de glomalina em relação ao tratamento usando inóculo de *G. albida* produzido em solo (4 mg P dm^{-3}). Em outras situações, o uso de FMA multiplicados na condição edáfica alvo foram mais eficazes que o emprego de fungos não adaptados (Stürmer 2004).

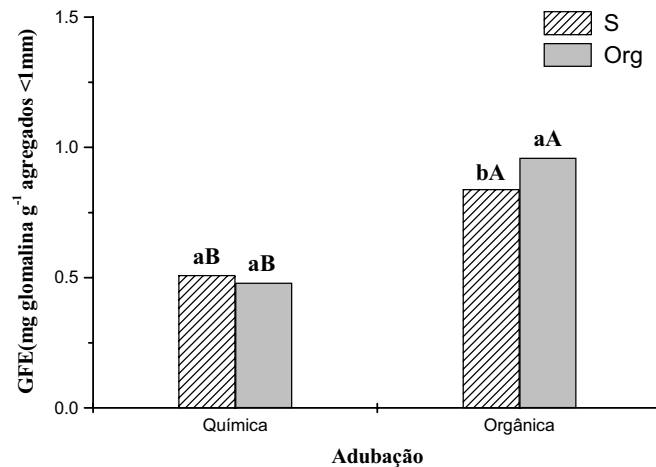


Figura 2. Glomalina facilmente extraível (GFE) de agregados (<1 mm) de solo adubado com fertilizantes químicos ou orgânicos, após cultivo por dez meses com maracujazeiro-doce associado a *Gigaspora albida*, multiplicado em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico, no Vale do Submédio São Francisco, Petrolina, PE.

Barras com letras iguais, maiúsculas entre os tratamentos de adubação dentro de cada tipo de inóculo e minúsculas entre os tratamentos de inoculação dentro de cada tipo de adubação, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

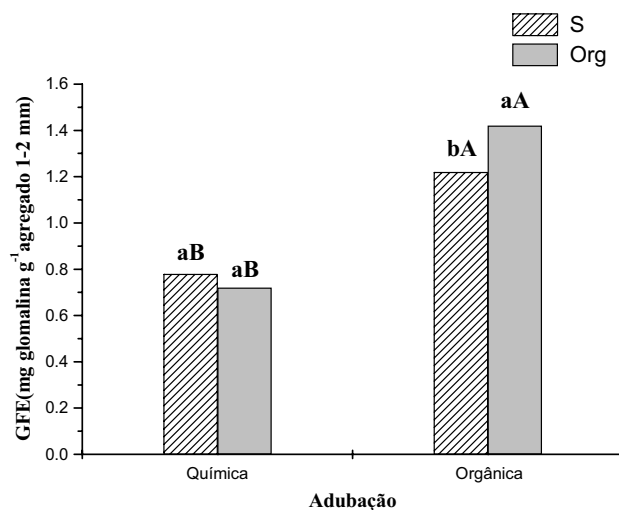


Figura 3. Glomalina facilmente extraível (GFE) de agregados (1-2 mm) de solo adubado com fertilizantes químicos ou orgânicos, após cultivo durante dez meses com maracujazeiro-doce associado a *Gigaspora albida*, multiplicado em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico, no Vale do Submédio São Francisco, Petrolina, PE.

Barras com letras iguais, maiúsculas entre os tratamentos de adubação dentro de cada tipo de inóculo e minúsculas entre os tratamentos de inoculação dentro de cada tipo de adubação, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

A produção de glomalina facilmente extraível (GFE) foi favorecida pelo uso de vermicomposto, sendo que neste tratamento se observaram diferenças entre os inóculos de FMA utilizados. A contribuição diferenciada de espécies de FMA na produção de glomalina é conhecida (Rillig *et al.* 2005). Neste estudo, verificou-se que embora o isolado de FMA fosse o mesmo, a forma de produção do inóculo foi diferenciada e interferiu na síntese dessa proteína. Este aspecto é importante na seleção de inoculantes micorrízicos para aplicação na agricultura (Miller & Jastrow 2000), visto que o uso de fungos com maior potencial para produção de glomalina é indicado por melhorar as condições edáficas e o crescimento do hospedeiro (Rillig 2004).

Nos dois tratamentos de micorrização a adubação com vermicomposto promoveu maior evolução de CO₂ em relação ao solo com fertilizantes químicos (Figura 4). Sistemas de cultivo orgânico, geralmente favorecem a atividade respiratória dos microrganismos do solo, quando comparado aos sistemas convencionais com adubos químicos (Chaoui *et al.* 2003). Tal aumento na evolução de CO₂ é decorrente da entrada de substâncias degradáveis pela adubação orgânica, que servem como fonte de energia para a microbiota edáfica (Caravaca *et al.* 2005). Esses benefícios sobre a atividade microbiana também podem ser atribuídos ao suprimento de fósforo, que fornece maior balanço nutricional em relação aos fertilizantes químicos (Marinari *et al.* 2000). Adicionalmente, o aumento na liberação de exsudados radiculares gerados pelo melhor desenvolvimento do vegetal, no solo fertilizado com vermicomposto, pode ter contribuído para a maior atividade respiratória obtida (Pascual *et al.* 1999).

A fonte de inóculo micorrízico influenciou a respiração microbiana apenas em solo adubado com vermicomposto, considerando que maiores taxas de emissão de CO₂ foram registradas em solo cultivado com o maracujazeiro-doce pré-inoculado com *G. albida* produzido em solo (S) (Figura 4). Com isso, observa-se que isolados da mesma espécie alteram de modo diferenciado esse processo. Nesse caso, os inóculos de *G. albida* testados podem ter contribuído para alterar a exsudação radicular do maracujazeiro-doce, pois o fungo influencia a liberação de carboidratos pelas raízes micorrizadas, afetando a atividade dos microrganismos rizosféricos (Wamberg *et al.* 2003), visto que os rizodepósitos servem de fonte de nutrientes para a microbiota do solo (Izquierdo *et al.* 2005). Esse é o principal mecanismo micorrízico para o aumento da atividade respiratória.

As frações de glomalina foram positivamente correlacionadas com os teores de P e MO e valores de CTC (Tabela 5). Teores de matéria orgânica também têm sido positivamente relacionados com a produção de glomalina em outras pesquisas (Lovelock *et al.* 2004a;

Wuest *et al.* 2005). Por outro lado, a relação linear positiva entre a produção de glomalina e o teor de P no solo (Tabela 5) contraria os resultados obtidos por Rillig *et al.* (2003) e Lovelock *et al.* (2004a), os quais registraram, respectivamente, relação nula ou negativa entre essas variáveis.

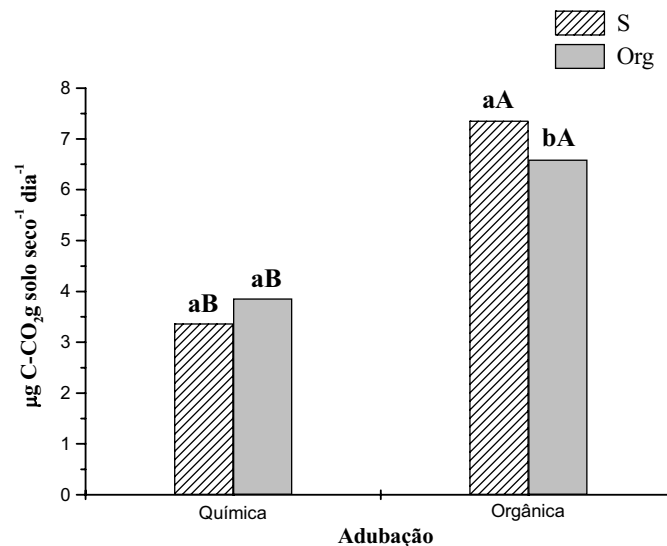


Figura 4. Evolução de CO₂ em solo adubado com fertilizantes químicos ou orgânicos e após cultivo durante dez meses com maracujazeiro-doce associado a *Gigaspora albida*, multiplicado em solo com (Org) ou sem (S) composto orgânico, no Vale do Submédio São Francisco, Petrolina, PE. Barras com letras iguais, maiúsculas entre os tratamentos de adubação dentro de cada tipo de inóculo e minúsculas entre os tratamentos de inoculação dentro de cada tipo de adubação, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

A produção de glomalina foi positivamente correlacionada com a densidade de esporos de FMA no solo (Tabela 5) e possivelmente a proteína presente na parede dos esporos foi também extraída. Wright *et al.* (1996) constataram a presença de glomalina na parede de esporos de FMA.

A evolução de CO₂ foi positivamente correlacionada com as frações de glomalina estudadas, indicando que a microbiota heterotrófica aeróbica foi hábil em utilizar a porção glicídica desta glicoproteína (Harner *et al.* 2005) nos processos oxidativos, como ressaltado por Rillig *et al.* (2003).

Em áreas agrícolas, estimativas de produção de glomalina facilmente extraível e total estão em torno de 0,5 e 3 mg g⁻¹ solo, respectivamente (Rillig *et al.* 2003), porém em regiões semi-áridas, os valores de produção são comparativamente baixos, não excedendo 0,3 e 0,6

mg g⁻¹ solo (Bird *et al.* 2002). No presente estudo, valores acima de 0,8 e 1 mg g⁻¹ de agregados foram obtidos quando o solo recebeu vermicomposto, indicando que a prática da adubação orgânica pode incrementar indiretamente a produção de glomalina.

Em sistemas orgânicos, correlações positivas entre a atividade de várias enzimas e a evolução de CO₂ geralmente são observadas (Antolín *et al.* 2005). No presente estudo, a atividade hidrolítica do FDA do solo e a respiração microbiana também foram positivamente correlacionadas (Tabela 5), tal como referido também por Araújo *et al.* (2003). Esses parâmetros foram positivamente correlacionados com as características químicas do solo (Tabela 5). Similarmente, foram mencionadas relações positivas com os teores de matéria orgânica (Perez Sarmentero *et al.* 1994) e com os teores de C e N do solo (Aon & Colaneri 2001). De modo geral, o aumento nos teores de MO (Fernandes *et al.* 2005) e nos valores de CTC (Frankenberger & Dick 1983), decorrente da aplicação de adubos orgânicos é positivamente correlacionado com a atividade enzimática no solo.

Tabela 5. Coeficientes de correlação simples (r) entre as variáveis estudadas (P<0,05).

Variáveis	MO	P	CTC	AEG	RM	DE	GT (1-2)	GT (<1)	GFE (1-2)	GFE (<1)
MO	-	0,86	0,93	0,76	0,83	0,56	0,89	0,94	0,87	0,89
P		-	0,84	0,56	0,78	0,53	0,84	0,86	0,84	0,89
CTC			-	0,71	0,82	0,47	0,86	0,90	0,84	0,87
AEG				-	0,73	0,51	0,47	0,71	0,51	0,56
RM					-	0,68	0,76	0,89	0,73	0,82
DE						-	0,54	0,60	0,55	0,68
GT (1-2)							-	0,91	0,97	0,92
GT (<1)								-	0,92	0,94
GFE (1-2)									-	0,91
GFE (<1)										-

MO= matéria orgânica; P= fósforo; CTC= capacidade de troca catiônica; AEG=atividade enzimática geral do solo (hidrólise de FDA); RM= respiração microbiana (emissão de CO₂); GT= glomalina total; GFE= glomalina facilmente extraível; (1-2)= agregados de 1-2 mm; (<1)= agregados menores que 1 mm; DE= densidade de esporos

Conclui-se que a produção de glomalina e a atividade microbiana do solo são favorecidas pelo uso de vermicomposto como alternativa de adubação para o maracujazeiro-

doce, melhorando a qualidade do solo; no entanto, os benefícios são dependentes da fonte de inóculo micorrízico empregada na fase de formação das mudas.

Referências Bibliográficas

- Antolín MC, Pascual I, García C, Polo A, Sánchez-Díaz M (2005) Growth, yield and solute content of barley in soils treated with sewage sludge under semiarid Mediterranean. *Field Crops Res* 94: 124-237
- Aon MA, Colaneri AC (2001) II-Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. *Appl Soil Ecol* 18: 255-270
- Araújo ASF, Monteiro RTR, Abarkeli RB (2003) Effect of glyphosate on the microbial activity of two brazilian soils. *Chemosphere* 52: 799-804
- Bending GD, Turner MK, Rayns F, Marx MC, Wood M (2004) Microbial and biochemical soil quality indicators and their rapid potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biol Biochem* 36: 1785-1792
- Bird SB, Herrick JE, Wander MM, Wright SF (2002) Spatial heterogeneity of aggregate stability and soil carbon in semi-arid rangeland. *Environ Pollut* 116: 445-455
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL (1984) A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can J Bot* 62: 2128-2134
- Caravaca F, Alguacil MM, Azcón R, Díaz G, Roldán A (2004) Comparing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and amendment with sugar beet, rock phosphate and *Aspergillus niger* to enhance field performance of the leguminous shrub *Dorycnium pentaphyllum* L. *Appl Soil Ecol* 25: 169-180
- Caravaca F, Alguacil MM, Barea JM, Roldán A (2005) Survival of inocula and native AMF fungi species associated with shrubs in a degraded Mediterranean ecosystem. *Soil Biol Biochem* 37: 227-233
- Chaoui HI, Zibilske LM, Ohno T (2003) Effects of earthworm casts and compost on soil microbial activity and plant nutrient availability. *Soil Biol Biochem* 35: 295-302
- Dann PR, Derrick JW, Dumaresk DC, Ryan MH (1996) The response of organic and conventionally wheat to superphosphate and reactive phosphate rock. *Aust J Exp Agric* 36: 71-78

- Duponnois R, Colombet A, Hien V, Thioulouse J (2005) The mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and rock phosphate amendment influence plant growth and microbial activity in the rhizosphere of *Acacia holoserica*. *Soil Biol Biochem* 37: 1460-1468
- Driver JD, Holben WE, Rillig M (2005) Characterization of glomalin as a hyphal wall component of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biol Biochem* 37: 101-106
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1979) Manual de métodos de análise do solo. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solo
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (1999) Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos
- Fernandes SAP, Bettiol W, Cerri CC (2005) Effect of sewage sludge on microbial biomass, basal respiration, metabolic quotient and soil enzymatic activity. *Appl Soil Ecol* 30: 65-77
- Frankenberger WT, Dick WA (1983) Relationship between activities and microbial growth and activity in soil. *Soil Sci Soc Am J* 47: 945-951
- Gaur A, Adholeya A (2005) Diverse response of five ornamental plant species to mixed indigenous and single isolate arbuscular mycorrhizal inocula in marginal soil amendment with organic matter. *J Plant Nutr* 28: 707-723
- Gerdemann JW, Nicolson T H (1963) Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br Mycol Soc* 46: 235-244
- Giovannetti M, Mosse B (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol* 84: 489-500
- Grisi BM (1978) Método químico de medição da respiração edáfica: alguns aspectos técnicos. *Cienc CultA* 30: 82-88
- Gryndler M, Vosátka M, Hrselová H, Chvátalová I, Jansa J (2002) Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and cellulose in growth substrate. *Appl Soil Ecol* 19: 279-288
- Harner MJ, Ramsey PW, Rillig MC (2005) Protein accumulation and distribution in floodplain soils and river foam. *Ecol Letters* 7: 829-836
- Izquierdo I, Caravaca F, Algualcil MM, Hernández G, Roldán A (2005) Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. *Appl Soil Ecol* 30: 3-10
- Jenkins WR (1964) A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. *Pl Dis Rep* 48: 692
- Joner, E.J. 2000. The effect of long-term organic or inorganic fertilizers on mycorrhiza-mediated phosphorus uptake in subterranean clover. *Biol Fertil Soils* 32: 435-440

- Knorr MA, Boerner REJ, Rillig MC (2003) Glomalin content on forest soils in relation to fire frequency and landscape position. *Mycorrhiza* 13: 205-210
- Kurle JE, Pflieger FL (1994) Arbuscular mycorrhizal fungus spore populations to conversions between low-input and conventional management practices in a corn-soybeans rotation. *Agron J* 86: 467-475
- Linderman RG, Davis EA (2001) Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth response to soil amendment with composted grape pomace or its water extract. *Hortechology* 11: 446-450
- Lins GML, Trindade AV, Rocha HS (2003) Utilização de *Gigaspora margarita* em plantas micropropagadas de bananeira em diferentes estádios de enraizamento. *Rev Bras Frutic* 25: 143-147
- Lovelock CE, Wright SF, Clarck DA, Ruess RW (2004a) Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *J Ecol* 92: 278-287
- Lovelock CE, Wright SF, Nichols KA (2004b) Using glomalin as an indicator for arbuscular mycorrhizal hyphae growth: an example from a tropical rain forest soil. *Soil Biol Biochem* 36: 1009-1012
- Mader P, Fließbach A, Dubois D, Gunst L, Fried P, Niggli V (2002) Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296: 1694-1697
- Marinari S, Masciandro G, Ceccanti B, Grego S (2000) Influence of organic and municipal fertilizers on soil biological and physical properties. *Bioresour Technol* 72: 9-17.
- Miller RM, Jastrow JD (2000) Mycorrhizal fungi influence soil structure. In: Kapulnik Y, Douds DD (eds) *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*. Kluwer Academic Publishers, pp. 3-18
- Muthukumar T, Udaiyan K (2002) Growth and yield of cowpea as influenced by changes in arbuscular mycorrhiza in response to organic manuring. *J Agron Crop Sci* 188: 123-132.
- Nichols KA (2003) Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi. PhD Thesis, University of Maryland, USA, 281p
- Pankhurst CE, Blair BL, Magary RC, Stirling GR, Bell MJ, Garside AL (2005) Effect of rotation breaks and organic matter amendments on the capacity of soils to develop biological suppression towards soil organisms associated with yield decline of sugarcane. *Appl Soil Ecol* 28: 271-282
- Pascual JA, García C, Hernandez T (1999) Lasting microbiological and biochemical effects of the municipal waste to an arud soil. *Biol Fertil Soils* 30: 1-6

- Pascual JA, Moreno JL, Hernández T, García C (2002) Persistence of immobilized and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. *Bioresour Technol* 82: 73-78
- Pérez Sarmantero J, Molina A, Colmenares R (1994) Influencia del abonado com compost y fertilizantes solubles sobre la actividad enzimática del suelo y la cualidad del cultivo avenaveza em uma finca de la alta montaña madrileña. In: *Practicas Agrícolas para una Agricultura de Calidad*, I Congreso de la Sociedad Española de Agricultura Ecológica. Toledo, pp. 47-56
- Rillig MC (2004) Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Can J Soil Sci* 84: 355-363
- Rillig MC, Lutgen ER, Ramsey PW, Klironomos JN, Gannon JE (2005) Microbiota accompanying arbuscular mycorrhizal fungal isolates influence soil aggregation. *Pedobiologia* 49: 251-259
- Rillig MC, Ramsey PW, Morris S, Paul EA (2003) Glomalin, an arbuscular-mycorrhizal fungal soil protein, responds to land-use change. *Plant Soil* 253: 293-299
- Ryan MH, Chilvers GA, Dumaresq DC (1994) 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 Soil* 160: 33-40
- Scullion J, Eason WR, Scott EP (1998) The effectivity of arbuscular mycorrhizal fungi high input conventional and organic grassland and grass-arable rotation. *Plant Soil* 204: 243-254
- Stürmer SL (2004) Efeito de diferentes isolados fúngicos da mesma comunidade micorrízica no crescimento e absorção de fósforo em soja e trevo vermelho. *Rev Bras Ci solo* 28: 611-622
- Swisher R, Carroll GC (1980) Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. *Microb Ecol* 6: 217-226
- Treseder KK, Mack MC, Cross A (2004) Relationships among fires, fungi and soil dynamics in Alaskan boreal forests. *Ecol Appl* 16: 1826-1838
- Vivas A, Vöros A, Biró B, Barea JM, Ruiz-Lozano JM, Azcón R (2003) Beneficial effects of indigenous Cd-tolerant and Cd-sensitive *Glomus mosseae* associated with a Cd-adapted strain of *Brevibacillus* sp. in improving plant tolerance to Cd contamination. *Appl Soil Ecol* 24: 177-186
- Wamberg C, Christensen S, Jakobsen J, Müller AK, Sørensen SJ (2003) The mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) affects microbial activity in the rhizosphere of pea plants (*Pisum sativum*). *Soil Biol Biochem* 35: 1349-1357

Wright SF, Upadhyaya A (1998) A survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil* 198: 97-107

Wright SF, Franke-Snyder M, Morton JB, Upadhyaya A (1996) Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant Soil* 181: 193-203

Wuest SB, Caesar-TonThat TC, Wright SF, Williams JD (2005) P organic matter addition, N, and residue burning effects on infiltration biological and physical properties of an intensively tilled silt-loam soil. *Soil Til Res* 84: 154-167

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

Nas condições experimentais utilizadas, conclui-se que:

A incorporação de tampão Tris-HCl e resíduos orgânicos (terra vegetal e composto orgânico) no substrato de cultivo é alternativa viável para produção de inóculo de FMA, pois incrementa a esporulação e favorece a manutenção da infectividade dos fungos após armazenamento;

A presença de glomalina no meio não afeta a germinação de *G. albida*, mas estimula o crescimento micelial, com as respostas variando em função da concentração e da fonte de inóculo testados;

A fonte do inóculo de *G. albida*, bem como o tipo e a dose de adubo orgânico no substrato afetam o desenvolvimento da fase pré-simbiótica, não sendo recomendada a adubação com esterco bovino não maturado, pois prejudica essa fase de desenvolvimento;

O uso de composto orgânico favorece a formação de mudas de maracujazeiro-doce apenas quando associado a micorrização, sendo o máximo benefício obtido quando as plantas estão associadas a *G. albida*, cujo inóculo foi multiplicado em substrato com resíduo orgânico, havendo redução em 60% no tempo necessário para o transplântio ao campo;

A utilização de substrato à base de esterco bovino maturado favorece o crescimento de mudas micorrizadas de *P. alata* e a atividade microbiana do solo;

A condição de multiplicação de inóculo micorrízico interfere na produção e na qualidade de frutos do maracujazeiro-doce, com as respostas moduladas pelo tipo de adubação empregada;

O uso de *G. albida*, multiplicado em solo + 10% de composto orgânico, na formação de mudas de maracujazeiros-doce, associado ao cultivo químico, pode constituir alternativa para produção de frutos com qualidade, no Vale do Submédio São Francisco;

A produção de glomalina e a atividade microbiana do solo são favorecidas pelo uso de vermicomposto como alternativa de adubação para o maracujazeiro-doce, melhorando a qualidade do solo; no entanto, os benefícios são dependentes da fonte de inóculo micorrízico empregada na fase de formação das mudas.

Considerações Finais

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de fungos micorrízicos arbusculares visando o aumento no crescimento e na produtividade de culturas não constitui tecnologia inovadora, pois esse efeito é bastante relatado em trabalhos científicos. No entanto, a tecnologia micorrízica não é utilizada como deveria, sendo a produção de inoculante em larga escala um dos empecilhos para a efetiva aplicação desses fungos. Portanto, a otimização nos processos de produção, armazenamento e comercialização do inóculo constitui um dos principais desafios da micorrizologia. Esse problema tem bastante relevância no Brasil, visto que não se dispõe de inoculantes micorrízicos comerciais.

Os FMA podem ser propagados em potes de cultura em solo, e o inóculo produzido pode ser utilizado na micorrização de plantas de interesse agrícola e florestal. Porém, a manipulação da composição dos substratos para propagação dos fungos, pela incorporação de adubos orgânicos, pode interferir na fisiologia do fungo e da planta simbioticamente associada, como registrado neste trabalho.

A tecnologia gerada (uso de adubos orgânicos na composição do substrato para produção de inoculante micorrízico) é de baixo custo e, mesmo simples, incrementa a taxa de reprodução dos fungos, que mantêm a infectividade após armazenamento. Além disso, a multiplicação em tal condição interferiu no desenvolvimento da fase assimbiótica de *Gigaspora albida*, que em algumas situações teve maior taxa de germinação e produziu maior quantidade de micélio do que o fungo mantido apenas em solo. Por fim, a aplicação de inóculo produzido em condições orgânicas interferiu na fisiologia do hospedeiro (nesse caso o maracujazeiro-doce), resultando na redução no tempo de formação de mudas (60%) e na elevada produção de frutos com características mais apreciáveis (reduzida acidez e elevada SST/ATT). Essa metodologia constitui, ainda, oportunidade para propagação de espécies de *Gigaspora*, que geralmente não estão presentes em formulações de inoculantes comerciais.

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que a micorrização de mudas de maracujazeiro-doce com *G. albida* produzido em solo suplementado com apenas 10% de resíduo orgânico incrementa a produtividade em mais de 200%, em relação ao uso do fungo multiplicado de modo convencional (em solo). Por se tratar de uma fruta que apresenta elevado valor agregado (US\$ 1,00/fruto), o emprego dessa tecnologia é viável, pois o valor bruto da produtividade por hectare, utilizando mudas inoculadas com o fungo produzido em solo adubado é US\$ 64.777, enquanto, com o uso da outra fonte de inóculo o valor é comparativamente menor (US\$ 23.277), o que resulta em aumento de lucratividade da ordem

de US\$ 41.500. Isso indica que o emprego de tecnologias simples pode maximizar os benefícios da micorrização, tornando o uso de FMA mais atrativo para os agricultores. Além disso, a instalação de cultivo de maracujazeiros-doce micorrizados com esta fonte de inóculo, no Vale do Submédio São Francisco, pode constituir fonte adicional de renda para os produtores, especialmente na entressafra de culturas chaves da região.

O uso dessa metodologia (solo + 10% de composto orgânico) permite a produção de 20 esporos g^{-1} solo de *G. albida*, sendo necessários 10g para inoculação de uma muda de maracujá-doce (200 esporos). Cerca de sete quilos de inóculo são suficientes para a inoculação de mudas em um hectare (densidade 666 plantas ha^{-1}). O custo adicional para produção do inóculo (sem considerar instalações, como telado, solo e sementes de painço) é devido à aquisição do adubo orgânico (25 kg de composto orgânico custam R\$ 4,00). Como o substrato é constituído por 10% de composto orgânico, será necessário menos de 1 kg de adubo orgânico para produzir inóculo necessário para micorrização das mudas em um hectare, ou seja, o custo adicional é da ordem de R\$ 0,16/ha. Isso indica que se o agricultor optar por essa tecnologia, a produção de mudas aptas para transplante ao campo será antecipada e a produtividade incrementada, com custo adicional de apenas 0,20 centavos de real por hectare, o que no final torna-se de menor monta, considerando a economia gerada pela antecipação na produção de mudas.

Além dos benefícios para o hospedeiro, o emprego do “edafotipo” propagado em substrato com adubo orgânico, melhorou a qualidade edáfica via maior deposição de glomalina, favorecendo a agregação do solo.

Em síntese, o uso de adubos orgânicos favorece a produção de inóculo de FMA, que tem a infectividade mantida após estocagem. Os fungos produzidos podem apresentar elevada taxa de germinação e crescimento micelial assimbiótico, trazem mais benefícios para o hospedeiro e produzem mais glomalina, quando comparados aos multiplicados em meio sem fertilizantes orgânicos.

Perspectivas para trabalhos futuros

PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

A formulação de substratos para cultivo de FMA usando adubos orgânicos mostrou-se alternativa promissora para produção de inoculante de FMA. No entanto, deve-se testar outros meios (por exemplo, argila expandida + adubos orgânicos), visando reduzir a densidade do veículo utilizado para propagação dos fungos. Como forma de reduzir os custos na aquisição de inóculo micorrízico, incentiva-se a produção de inóculo na propriedade agrícola, sendo sugerido o emprego de fertilizantes orgânicos para estimular a reprodução dos fungos. Ensaios devem ser conduzidos para recomendação do uso de adubos orgânicos para produção de inoculante em campo.

Buscam-se meios de propagação que favoreçam a reprodução e a manutenção da infectividade dos FMA. No presente estudo, o uso de resíduos orgânicos favoreceu a produção de inóculo, que se manteve infectivo após armazenamento por 120 dias; no entanto, é necessário determinar se o potencial infectivo é alterado após longos períodos de armazenamento (por exemplo, 24 meses).

O prejuízo do uso de alguns adubos orgânicos sobre a fase assimbiótica de *Gigaspora albida* foi verificado, confirmando a necessidade de se determinar o efeito dessa prática agrícola sobre as etapas assimbióticas de outras espécies de FMA. Do mesmo modo, a influência da glomalina sobre a fase pré-simbiótica de *G. albida*, que foi estudada *in vitro*, deve ser avaliada em outros FMA e em condições mais próximas daquelas em que os FMA ocorrem.

Os esporos de *G. albida*, multiplicados em solo + 10% de composto orgânico, formaram micélio com células auxiliares com morfologia diferenciada daquelas característica do gênero. É necessário aprofundar os estudos para definir se as alterações observadas são decorrentes de retardo no desenvolvimento dessas estruturas, ocasionado pela condição de multiplicação ou se o meio de propagação além de interferir na fisiologia, afeta a morfologia do micélio dessa espécie de FMA. Nesse caso, são necessárias avaliações do desenvolvimento da fase assimbiótica de *G. albida* a partir de inóculo multiplicado sucessivamente em substrato adubado.

O cultivo de FMA em substrato com adubos orgânicos permitiu a propagação de fungos com fisiologia diferenciada daquele multiplicado apenas em solo. Entretanto, trata-se do mesmo fungo cultivado em condições diferentes, sendo necessários ensaios de compatibilidade vegetativa para definir se a propagação do fungo em condições edáficas específicas permite a produção de isolados distintos.

A propagação de FMA em substratos com adubos orgânicos maximizou a eficiência do fungo em promover o crescimento de mudas orgânicas de maracujazeiro-doce. Estudos da eficiência desse inóculo na produção orgânica de outras fruteiras devem ser delineados. Além disso, deve-se averiguar se a eficiência de FMA multiplicados em substrato adubado é alterada quando os mesmos voltam a ser propagados em solo.

O uso de *G. albida*, produzido em substrato com adubo orgânico, na formação de mudas de maracujazeiro-doce aumentou a produtividade e a qualidade de frutos no primeiro ano da cultura (safrinha), sendo importante constatar se o benefício desse “edafotipo” é mantido no 2º e 3º anos de produção desta fruteira.

Anexos

Silva, Fábio Sérgio Barbosa da

Fase assimbiótica, produção, infectividade e efetividade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em substratos com adubos orgânicos / Fábio Sérgio Barbosa da Silva. – Recife : O Autor, 2006.

291 folhas : il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2006.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Biologia de fungos – Micorrizas. 2. Micorriza arbuscular – Adubação orgânica – Produção de inóculo. 3. Qualidade do solo – Glomalina – Enzimas do solo. 4. Maracujazeiro-doce – Eficiência micorrízica – Produtividade. 5. FMA (Fungos micorrízicos arbusculares) – Infectividade e estocagem de inóculo – Germinação. I. Título.

**582.281.2
579.53**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2006-583**

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope](#)
- [Instructions to authors of papers to be submitted to the Acta Botanica Brasilica](#)

Scope

Acta Botanica Brasilica publishes original articles dealing with all areas of basic and applied Botany, in Portuguese, Spanish or English. The research should contemplate theoretical aspects of the subject in question, and be based on a central query that indicates originality and potential interest, keeping in mind the broad spectrum of readers in Brazil and elsewhere.

Instructions to authors of papers to be submitted to the Acta Botanica Brasilica

1. *Acta Botanica Brasilica* publishes original articles dealing with all areas of basic and applied Botany, in Portuguese, Spanish or English. The research should contemplate theoretical aspects of the subject in question, and be based on a central query that indicates originality and potential interest, keeping in mind the broad spectrum of readers in Brazil and elsewhere.
2. The articles should be concise **with at the most 25 typed pages** (equivalent to 15 printed pages) including illustrations and tables. Four copies of the paper should also be included with the a 3.5" diskette, for revision by the Editorial board. The format must be in Times New Roman, size 12, 1.5 spacing between lines on A4 sized paper, with all margins 1.5 cm, using the Word processing package Microsoft Word for Windows, version 6 or above. All pages should be numbered consecutively. Longer papers might be accepted but the extra-cost should be sponsored by the authors.
3. Latin or Greek words in the title or text, such as *in vivo*, *in vitro*, *in loco*, *et al.*, should be in italics.
4. The title should be centralized and written with only the first letter capitalized.
5. The names of the authors should have only the first letter capitalized, below the title, and justified to the right. References to footnotes should be in Arabic numerals, after the authors' names, indicating the complete address and data and information about the work (part of a thesis etc.), where necessary, after the title. The footnote should be separated from the main text

by a horizontal line.

6. The manuscript format should contain:

- **RESUMO** and **ABSTRACT**: Use capitalized letters and bold for these subtitles). It should occupy a single paragraph with about 200 words, followed by up to five keywords besides the title. It should be a concise summary in Portuguese, of the objectives, material and methods, results and conclusions. The same rules apply to the abstract, written in English and followed by the keywords. The English abstract is obligatory and should follow the same rules.

- **Introduction**: It should have only the first letter capitalized, in bold, justified to the left and give a clear and concise view of: a) revision of studies relevant to the objective of the work; b) issues that lead the author to conduct the research; c) objectives.

- **Material and methods**: Only the first letter in bold justified to the left and should contain a brief description of the work, enough to permit the research to be repeated, and any techniques published should be cited and not described.

- **Results and discussion**: It should have the first letter only capitalized, in bold, justified to the left and could contain tables and figures (charts, photographs, drawings, maps and illustrations) only when essentially needed to understand the text. Depending on the work, results and discussion can be joined or presented separately. Tables and Figures should be numbered in independent series, in Arabic numerals placed at the bottom right and should be presented on separate sheets (one for each Table or Figure) at the end of the text (original plus three copies). The Figures should be no more than twice the size that in press. The area available for them, including the legend is 17.5 cm wide and 23.5 cm high, with a scale placed at the left side of the figure.

Numbers and letters should be sufficiently large to be easily legible when reduced. Letters should be placed below and to the right of the drawing.

Photographs should be on glossy black and white paper.

Color photos can be accepted by the Editorial Board but the authors should sponsor the costs.

Tables and Figures must be referred to in the text in abbreviated form (singular) with the initial letter in capital (Fig., Tab.).

Abbreviations and symbols, when used for the first time, should be preceded by their meaning in full. E.g.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Measures should be abbreviated and a space separates it from the number (eg.: 11 cm; 2,4 µm), except for percentage (e.g. 90%).

For taxonomic and flora work only the botanical vouchers examined which are representative of the taxon in question should be cited in the following order:

COUNTRY (capitalized and bold). State (**bold**): Municipality, date (the month in roman numerals), phenology (where possible), collector's name and number (*italics*), and the herbarium code. Eg: **BRASIL. São**

Paulo: Santo André, 3/XI/1997, fl. fr., *Milanez 435* (SP).

In case of more than 3 collectors, cite the first followed by *et al.* E.g.: Silva *et al.*

Character keys should be indented and the author's name of the taxa should not appear. The taxa in the keys when cited in the text, should be numbered in alphabetic order. Example:

1. Terrestrial plants
 2. Orbicular leaves, more than 10 cm diam.
.....2. ***S. orbicularis***
 2. Sagittal leaves, less than 8 cm diam.
.....4. ***S. sagittalis***
 1. Aquatic plants
 3. White flowers1.
- S. albicans***
3. Red flowers.....3. ***S. purpurea***

The taxonomic treatment should use italics and bold together only for valid names. Basonyms and synonymes should be in italics only. Authors of scientific names should be abbreviated, according to the current taxonomic list of the group (eg. Brummit & Powell 1992, for plant names).

1. ***Sepulveda albicans*** L., Sp. pl. 2: 25. 1753.
Pertencia albicans Sw., Fl. bras. 4: 37, t. 23, f. 5. 1870.
Fig. 1-12

Subtitles within Materials and methods and Results should be written with the initial letter in capital, followed by a dash and the text in the same line. Eg. Study area - localized

Results and discussion should include the conclusions.

- **Acknowledgements** (with the initial letter in capital, bold, and left justified): should be brief, with complete names.

- **Bibliographic references**

- Within the text: first author, then the date. eg. Silva (1997), Silva & Santos (1997), Silva *et al.* (1997) or Silva (1993; 1995), Santos (1995; 1997) or (Silva 1975; Santos 1996; Oliveira 1997).

- At the end of the article: the initial letter in capitals, and left justified; in alphabetical and chronological order of the authors; the names of journals and book titles should be written in bold and in full. Examples:

Santos, J. 1995. Estudos anatômicos em Juncaceae. Pp. 5-22. In: **Anais do XXVIII Congresso Nacional de Botânica.**

Aracaju 1992. São Paulo, HUCITEC Ed. v.I.

Santos, J.; Silva, A. & Oliveira, B. 1995. Notas palinológicas. Amaranthaceae. **Hoehnea** **33**(2): 38-45.

Silva, A. & Santos, J. 1997. Rubiaceae. Pp. 27-55. In: F.C. Hoehne (ed.). **Flora Brasílica.** São Paulo, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo.

For more details consult the most recent issues of the

journal or the internet link: **www.botanica.org.br**. and also the on line articles in **www.scielo.br/abb**.

Abstracts of scientific meetings **will not be accepted** as bibliographic references. Citations of dissertations and theses should be avoided; when needed, they should be included in the text. E.g. J. Santos, data not published or J. Santos, personal communication.

[\[Home\]](#) [\[About this journal\]](#) [\[Editorial board\]](#) [\[Subscription\]](#)

© 2006 *Sociedade Botânica do Brasil*

Acta Botanica Brasilica
Caixa Postal 4005
01061-970 São Paulo SP Brasil
Tel. Fax.: +55 11 5058 5644



acta@botanica.org.br