

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES  
AUTÓCTONES DE PARREIRAIS DA SERRA GAÚCHA E OTIMIZAÇÃO DE  
MÉTODOS DE MULTIPLICAÇÃO EM ESPÉCIES AROMÁTICAS PARA  
APLICAÇÃO NA FRUTICULTURA

Samar Velho da Silveira  
Eng. Agrônomo, M.Sc./UFRGS

Tese apresentada com um dos  
requisitos à obtenção do Grau de  
Doutor em Fitotecnia  
Área de Concentração Horticultura

Porto Alegre (RS), Brasil  
Março de 2006

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, por ter me permitido conhecer o mundo da investigação científica.

À minha mãe, Martha M. F. Velho, por seu amor e seu apoio incondicional.

Às Manas, Marta I. V. Da Silveira e Stela M. V. Da Silveira, por confiarem em mim e por estarem sempre ao meu lado.

Ao primo Manoel Antônio Cândido Velho, por sua amizade e sua imprescindível ajuda.

Ao professor Paulo Vitor Dutra de Souza, pelos ensinamentos e pela orientação nas fases de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado.

À Rosilaine Carrenho, por seus ensinamentos sobre caracterização morfológica de FMA.

Ao professor Sergio Francisco Schwarz, por sua amizade e seus sábios conselhos.

À profa. Ingrid B. I. Barros, pela transmissão de conhecimentos sobre plantas aromáticas.

Ao professor Otto Carlos Koller, por propor desafios a nós, seus alunos.

A José Miguel Barea e Rosario Azcón G. de Aguilar, por terem me recebido em seu grupo de pesquisa e sua generosa hospitalidade em Granada/ESP.

À Nuria Ferrol Gonzáles e à Concepción Azcón G. de Aguilar, pela orientação e co-orientação, respectivamente, na Espanha.

Aos amigos Fritz Ohel e Ewald Sieverding pela inestimável colaboração na identificação morfológica de FMA.

Aos amigos Custodia Cano, Albert Bago, Pablo Cornejo e Javier Palenzuela pelos conhecimentos transmitidos.

Aos amigos Paulo Roberto da Silva, José L. da Silva Nunes e Denis S. Guerra pelo coleguismo.

A todos os bolsistas de Iniciação Científica que colaboraram nos experimentos com plantas aromáticas e frutíferas desta tese (Rochelle, Thomaz, Klaiton, Thaís, Rafael, Bernadete e Eduardo).

À EMATER e aos seus funcionários, pela ajuda na coleta de solo nos parreirais da Serra Gaúcha.

À Roberta Boscato, por colaborar com a coleta de amostras de solo nos parreirais de sua família no município de Nova Pádua.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e na Espanha.

# CARACTERIZAÇÃO DE MICORRIZAS ARBUSCULARES AUTÓCTONES DE PARREIRAIS DA SERRA GAÚCHA E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODOS DE MULTIPLICAÇÃO EM ESPÉCIES AROMÁTICAS PARA APLICAÇÃO NA FRUTICULTURA<sup>1</sup>

Autor: Samar Velho da Silveira  
Orientador: Paulo Vitor Dutra de Souza  
Co-orientadora: Rosilaine Carrenho

## RESUMO

Este estudo teve por objetivos realizar a caracterização morfológica e molecular dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) autóctones de parreirais da Serra Gaúcha; a otimização do método de produção de inóculos de FMA em plantas aromáticas; além de verificar a eficiência destes inóculos em porta-enxertos de plantas frutíferas. Coletou-se solo rizosférico e raízes secundárias de videira em vinte parreirais distribuídos em cinco cidades da Serra Gaúcha (Bento Gonçalves, Caxias, Garibaldi, Nova Pádua e Farroupilha), amostrando-se quatro parreirais por município. A identificação morfológica dos esporos presentes nas amostras foi realizada através de microscopia óptica. A caracterização molecular foi realizada por PCR-TTG e seqüenciamento da região rDNA 18S dos esporos previamente identificados pela microscopia. Para a PCR foi utilizado DNA oriundo dos esporos isolados e também de macerado de raízes. Pelo método morfológico, identificaram-se 33 espécies distribuídas em 8 gêneros distintos de FMA. Obtiveram-se quatro perfis moleculares por PCR -TTGE do rDNA 18S de raízes e cinco perfis moleculares por PCR -TTGE do rDNA 18S de esporos das espécies. Através do alinhamento de seqüências obtidas da região de rDNA 18S com as seqüências depositadas no banco de dados NCBI foi possível identificar 7 espécies de FMA. Foram testadas três espécies de plantas aromáticas, hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e melissa (*Melissa officinalis* L.) como multiplicadoras de três espécies de FMA (*Glomus clarum* Nicol. & Schenck, *Glomus etunicatum* Becker & Gerd. e *Acaulospora* sp.) em dois volumes de recipiente (bandeja de isopor com alvéolo de 40 ml e bandeja de isopor com alvéolo de 100 ml). Verificou-se a eficiência das plantas aromáticas para produzirem os inóculos destas três espécies de FMA, na colonização do sistema radicular e no desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de videira (cv. SO4), citros (cv. Citrange Troyer) e, como dados complementares, em pessegueiro (cv. Okinawa). As plantas aromáticas estudadas multiplicaram com sucesso as espécies de FMA, sendo o inóculo gerado pelas mesmas eficiente em colonizar os porta-enxertos Citrange Troyer, SO4 e Okinawa, propiciando, inclusive, melhor desenvolvimento vegetativo aos dois últimos.

---

<sup>1</sup>Tese de Doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (149p.) Março, 2006.

# CHARACTERIZATION OF NATIVE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI GRAPEVINES PLANTED IN THE 'SERRA GAÚCHA' AND OPTIMIZATION OF PRODUCTION IN AROMATIC PLANTS FOR APPLICATION IN FRUIT-GROWING<sup>1</sup>

Author: Samar Velho da Silveira  
Adviser: Paulo Vitor Dutra de Souza  
Co-Adviser: Rosilaine Carrenho

## ABSTRACT

The aim of this study was the morphological and molecular characterization of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from grapevines growing in the 'Serra Gaúcha' region of the Brazilian state of Rio Grande do Sul (RGS); to optimize the production of AMF inoculum in aromatic plants and to assess the efficiency of such inocula in grafting-stock of fruiting plants. Soil was collected from rhizospheres from 20 vineyards in five municipalities (Bento Gonçalves, Caxias, Garibaldi, Nova Pádua and Farroupilha) in the mountains of Southern Brazil, four vines being sampled in each municipality. Optical microscopy was used to morphologically identify the AMF based on reproductive structures and spores present in the soil samples. The spores of 16 species found in the samples were characterized by sequencing the 18S rDNA region. The AMF-colonized roots from each of the five municipalities and the 18S rDNA of the spores of six species of AMF were screened by polymerase chain reaction (PCR) and temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE). The morphological method identified 33 AMF species from eight genera while 18S rDNA sequencing identified seven AMF species based on alignment with sequences present in the NCBI databank. PCR-TTGE 18S rDNA produced four fingerprints for the roots and five fingerprints for the AMF species tested. The aromatic plants *Mentha piperita* L., *Origanum vulgare* L. and *Melissa officinalis* L. were tested as hosts for the AMF *Glomus clarum* Nicol. & Schenck, *Glomus etunicatum* Becker & Gerd. and *Aculospora scrobiculata* Trappe in 40 and 100 ml seedling trays. Results show that, under these growth conditions, all three aromatic plants were able to produce inocula of the three AMF tested. It was also evident that these inocula allowed the AMF to colonize the roots, which permitted the vegetative development of grape cultivar S04, citrus cultivar Citrange Troyer and peach cultivar Okinawa. The peach and vine cultivars showed enhanced vegetative development.

---

<sup>1</sup>Doctoral thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (149p.) March, 2006.

## SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS MICORRRÍZICOS ARBUSCULARES ISOLADOS DE PARREIRAIS DA SERRA GAÚCHA.....	5
2.1 Introdução.....	5
2.2 Material e Métodos.....	8
2.2.1 Coleta de amostras de solo rizosférico de videira.....	8
2.2.2 Multiplicação dos FMA em casa de vegetação.....	9
2.2.3 Caracterização morfológica de FMA presentes nos solos rizosféricos de videira e em cultivo armadilha.....	10
2.2.4 Caracterização molecular: seqüenciamento do rDNA dos esporos.....	11
2.2.5 Caracterização molecular: PCR-TTGE do rDNA de raízes colonizadas por FMA.....	14
2.3 Resultados e Discussão.....	15
2.3.1 Características dos parreirais amostrados.....	15
2.3.2 Espécies de FMA presentes nos solos rizosféricos de videira.....	20
2.3.3 Espécies de FMA multiplicados em casa de vegetação.....	21
2.3.4 Caracterização morfológica das espécies encontradas nos solos rizosféricos de videira e nos cultivos armadilha.....	23
2.3.5 Caracterização molecular: seqüenciamento do rDNA dos esporos.....	70
2.3.6 Caracterização molecular: PCR-TTGE do rDNA de raízes colonizadas por FMA.....	74
2.4 Conclusões.....	80
CAPÍTULO III - USO DE PLANTAS AROMÁTICAS COMO PRODUTORAS DE INÓCULO DE FMA.....	81
3.1 Introdução.....	81
3.2 Material e Métodos.....	83
3.3 Resultados e Discussão.....	87
3.4 Conclusões.....	108
CAPÍTULO IV - EFICIÊNCIA DOS INÓCULOS DE FMA PRODUZIDOS A PARTIR DE PLANTAS AROMÁTICAS EM PORTA-ENXERTOS DE PLANTAS FRUTÍFERAS.....	109
4.1 Introdução.....	109

	Página
4.2 Material e Métodos.....	111
4.2.1 Experimento 1: Inoculação do porta-enxerto SO4 com FMA.....	111
4.2.2 Experimento 2: Influência da quantidade de inóculo de FMA sobre o crescimento de citrangeiro ‘Troyer’.....	115
4.2.3 Experimento 3: Inoculação do porta-enxerto ‘Okinawa’ com FMA.....	117
4.3 Resultados e discussão.....	119
4.3.1 Experimento 1: Inoculação do porta-enxerto SO4 com FMA.....	119
4.3.2 Experimento 2: Influência da quantidade de inóculo de FMA sobre o crescimento de citrangeiro ‘Troyer’.....	127
4.3.3 Experimento 3: Inoculação do porta-enxerto ‘Okinawa’ com FMA.....	131
4.4 Conclusões.....	135
 CAPÍTULO V- CONCLUSÕES GERAIS.....	 136
 CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 137

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
2.1 Níveis de argila, pH, matéria orgânica (MO), fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) dos solos dos parreirais de videira amostrados para a análise da diversidade dos FMA nos cinco municípios estudados da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. 2004.....	16
2.2 Interpretação dos resultados de fósforo “extraível” do solo para as principais culturas no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Comissão de fertilidade do solo - RS e SC, 1994).....	17
2.3 Interpretação dos resultados de fósforo “extraível” do solo para as principais culturas no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Comissão de fertilidade do solo - RS e SC, 1994).....	18
2.4 Características dos parreirais de onde se retiraram as amostras de solo rizosférico nos cinco municípios amostrados da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. 2004.....	19
2.5 Espécies de FMA e número de esporos isolados nas amostras de solo rizosférico dos parreirais dos cinco municípios da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. 2005.....	20
2.6 Espécies de FMA e número de esporos isolados nas rizosferas das plantas armadilha inoculadas com solos dos parreirais dos cinco municípios da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. 2005.....	22
2.7 Índices de similaridade entre as seqüências de rDNA 18S de FMA, calculados através do programa ClustalW. Granada, Espanha. 2005.....	73
3.1 Número de folhas por planta (N.F./Planta) e análise qualitativa de raízes (AQR) em mudas de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), hortelã pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) e melissa ( <i>Melissa officinalis</i> ), inoculadas com três espécies de FMA em dois volumes de substrato. Porto Alegre, RS. 2003.....	87
3.2 Matéria fresca da parte aérea e de raízes de mudas de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), hortelã pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) e melissa ( <i>Melissa officinalis</i> ), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes de substrato. Porto Alegre, RS. 2003.....	89

3.3	Número de folhas por planta e área foliar por planta de mudas de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), hortelã pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) e melissa ( <i>Melissa officinalis</i> ), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.....	92
3.4	Matéria fresca da parte aérea e de raízes de plantas de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), hortelã pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) e melissa ( <i>Melissa officinalis</i> ), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.....	95
3.5	Matéria seca da parte aérea e de raízes e análise qualitativa de raízes (Bonitur) de mudas de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), hortelã pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) e melissa ( <i>Melissa officinalis</i> ), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.....	96
3.6	Presença de arbúsculos e vesículas no sistema radicular de mudas de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), hortelã pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) e melissa ( <i>Melissa officinalis</i> ), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.....	101
3.7	Presença de hifas internas e colonização (Col.) no sistema radicular de mudas de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), hortelã pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) e melissa ( <i>Melissa officinalis</i> ), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.....	102
3.8	Número de esporos em 100 g de substrato de cultivo de mudas de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ), hortelã pimenta ( <i>Mentha piperita</i> ) e melissa ( <i>Melissa officinalis</i> ), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.....	104
4.1	Altura da parte aérea, número de folhas e área foliar por planta de porta-enxertos de videira SO4, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.....	120
4.2	Presença de estruturas de FMA (hifas, arbúsculos, vesículas) e colonização das raízes de porta-enxertos de videira SO4, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.....	121

4.3	Quantidade de N, P, K (mg/planta) na parte aérea de porta-enxertos de videira SO4, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.....	123
4.4	Quantidade de Ca, Mg e S (mg/planta) na parte aérea de porta-enxertos de videira SO4, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de espécies de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.....	124
4.5	Quantidade de Zn, Fe, Mn e B (mg/planta) na parte aérea de porta-enxertos de videira SO4, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.....	125
4.6	Altura da parte aérea, matéria seca da parte aérea e de raízes e conteúdo em substâncias de reserva da parte aérea e de raízes do citrangeiro 'Troyer', inoculados com 2 espécies de FMA multiplicados em hortelã pimenta, aos 145 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.....	127
4.7	Presença de estruturas de FMA (Hifas, Arbúsculos, Vesículas) e colonização das raízes de porta-enxertos de citros (citrageiro 'Troyer'), inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 145 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.....	130
4.8	Altura, diâmetro do caule e área foliar do porta-enxerto de pessegueiro cv. Okinawa no momento da enxertia (360dias), inoculados com três espécies de FMA multiplicados em orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ). Porto Alegre, RS. 2004.....	132

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
2.1 (A) Esporo de <i>Acaulospora capsicula</i> . PE= parede externa; PI <sub>1</sub> = parede interna um; PI <sub>2</sub> : parede interna dois. (B) Esporo de <i>Acaulospora laevis</i> . PE= parede externa; PI <sub>1</sub> = parede interna um; PI <sub>2</sub> = parede interna dois. Basiléia, Suíça. 2005.....	62
2.2 (A) Esporo de <i>Acaulospora mellea</i> . PE= parede externa; PI <sub>1</sub> = parede interna um; PI <sub>2</sub> : parede interna dois. Basel, Suíça. 2005. (B) Esporo de <i>Acaulospora morrowiae</i> . PE= parede externa; PI <sub>1</sub> = parede interna um; PI <sub>2</sub> : parede interna dois. Basiléia, Suíça. 2005.....	62
2.3 (A) Esporo de <i>Acaulospora rehmi</i> . PE= parede externa; PI <sub>1</sub> +PI <sub>2</sub> = parede interna um + parede interna dois; OR= Ornamentação. (B) Esporo de <i>Acaulospora scrobiculata</i> . PE= parede externa; PI <sub>1</sub> = parede interna um; PI <sub>2</sub> = parede interna dois; OR= Ornamentação. Basiléia, Suíça. 2005.....	63
2.4 (A) Esporo de <i>Archaeospora trappei</i> . PE= parede externa; VM= Vesícula mãe. (B) Esporo de <i>Archaeospora</i> sp. (Nov. esp.); PE= parede externa. Basiléia, Suíça. 2005.....	63
2.5 (A) Esporo de <i>Entrophospora infrequens</i> . PE= parede externa; PI= parede interna; OR= Ornamentação; CI= Cicatriz. (B) Esporo de <i>Entrophora schenckii</i> . PE= Parede externa; HS= Hifa de sustentação; VM= vesícula mãe. Basiléia, Suíça. 2005.....	64
2.6 (A) Esporo de <i>Glomus aureum</i> . PE= parede do esporo; HS= Hifa de sustentação. (B) Esporo de <i>Glomus brohultii</i> . PE= parede do esporo; P= perfurações na parede; HS= Hifa de sustentação. Basiléia, Suíça. 2005.....	64
2.7 (A) Esporo de <i>Glomus caledonium</i> . PE= parede do esporo. (B) Esporo de <i>Glomus claroideum</i> . PE= parede do esporo; C <sub>1</sub> +C <sub>2</sub> = camada um + camada dois da parede do esporo; C <sub>3</sub> = camada três da parede do esporo. Basiléia, Suíça. 2005.....	65
2.8 (A) Esporo de <i>Glomus constrictum</i> . PE= parede do esporo; CO= constrição da hifa de sustentação; HS= hifa de sustentação. (B) Esporo de <i>Glomus fasciculatum</i> . PE= parede do esporo. Basiléia, Suíça. 2005.....	65
2.9 (A) Esporo de <i>Glomus hoi</i> . PE= parede do esporo; HS R= hifa de sustentação ramificada. (B) Esporo de <i>Glomus intraradices</i> . PE= parede do esporo. Basiléia, Suíça. 2005.....	66

- 2.10 (A) Esporo de *Glomus macrocarpum*. PE= parede do esporo. Basel, Suíça. 2005. (B) Esporo de *Glomus mosseae*. PE= parede do esporo. F= funil da hifa de sustentação; HS= hifa de sustentação. Basiléia, Suíça. 2005..... 66
- 2.11 (A) Esporocarpo de *Glomus sinuosum*. M= manto de hifas cenocíticas que recobrem todo o esporocarpo; E= esporo. (B) Esporo de *Pacispora coralloidea*. PE= parede externa; PI= parede interna. Basiléia, Suíça. 2005..... 67
- 2.12 (A) Esporo de *Pacispora dominikii* PE= parede externa; PI= parede interna. (B) Esporo de *Paraglomus occultum*. PE= parede externa; HS= hifa de sustentação. Basiléia, Suíça. 2005..... 67
- 2.13 (A) Esporo de *Scutelospora calospora* PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um + parede interna dois. (B) Esporo de *Scutelospora heterogama*. PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um; PI<sub>2</sub>= parede interna dois; PG= placa de germinação. Basiléia, Suíça. 2005..... 68
- 2.14 (A) Esporo de *Scutelospora pelucida*. PE= Parede Externa; PI<sub>1</sub> + PI<sub>2</sub>= parede interna um + parede interna dois; CS= célula suspensoróide. (B) Esporo de *Scutelospora pelucida*. PG= placa de germinação. Basiléia, Suíça. 2005..... 68
- 2.15 Alinhamento múltiplo das seqüências das espécies de FMA realizado através do programa CLUSTALW (1.83), por similaridade. Seqüências coloridas indicam regiões que não apresentam homologia devido a substituições de bases. Regiões com gap (-) indicam regiões com inserções ou deleções de bases. *Glomus mosseae*1 (Isolado Bento Gonçalves). Granada, Espanha, 2005..... 71
- 2.16 Árvore filogenética entre as espécies de FMA construída através do método da máxima parsimônia, pelo programa ClustalW. *Glomus etunicatum* (Isolado Caxias do Sul), *Glomus mosseae*' (Isolado Farroupilha), *Glomus mosseae* (isolado Bento Gonçalves), *Glomus constrictum* (Isolado Farroupilha), *Glomus fasciculatum* (Isolado Caxias do Sul), *Glomus caledonium* (Isolado Nova Pádua), *Glomus intraradices* (Isolado Bento Gonçalves), *Acaulospora laevis* (Isolado Nova Pádua). Granada, Espanha. 2005.. ..... 72
- 2.17 Análise por TTGE da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 de FMA colonizando raízes de trevo (*Trifolium repens*) e sorgo (*Sorghum vulgare*). Coluna 1 a Coluna 5, refere-se a análise de raízes inoculadas com solo rizosférico de Bento Gonçalves (Coluna 1), Caxias do Sul (Coluna 2), Nova Pádua (Coluna 3), Farroupilha (Coluna 4), e Garibaldi (Coluna 5). Coluna 6 a Coluna 12, refere-se a análise por TTGE da região 18S rDNA NS31-NS41 de esporos de FMA. *Glomus mosseae* (Coluna 6), *Paraglomus oculum* (Coluna 7), *Pacispora dominikii* (Coluna 8), *Entrophospora infrequens* (Coluna 9), *Entrophospora schenkii* (Coluna 10), *Glomus etunicatum* isolado Caxias do Sul, (Coluna 11), *Glomus etunicatum* isolado Bento Gonçalves (Coluna 12). Granada, Espanha. 2005..... 75

- 2.18 Análise por TTGE da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 de FMA colonizando raízes de trevo (*Trifolium repens*) e sorgo (*Sorghum vulgare*). Coluna 1 a Coluna 4 (da esquerda para direita) refere-se a análise de raízes inoculadas com solo rizosférico, Caxias do Sul (Coluna 1), Nova Pádua (Coluna 2), Farroupilha (Coluna 3), Garibaldi (Coluna 4). Coluna 5 a Coluna 10, refere-se a análise por TTGE da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 de esporos de FMA. *Entrophospora schenkii* (Coluna 5), *Glomus constrictum* (Coluna 6), *Glomus mosseae* (Coluna 7), *Acaulospora laevis* (Coluna 8), *Glomus fasciculatum* (Coluna 9), *Glomus etunicatum* (Coluna 10). Granada, Espanha. 2005. .... 77
- 3.1 Número de ramos/planta de plantas aromáticas inoculadas ou não com FMA. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan. Porto Alegre, RS. 2003..... 93
- 3.2 Aspecto geral das plantas medicinais. (A) Plantas de melissa (*Melissa officinalis*) inoculadas ou não com FMA, com 86 dias. (B) Plantas de orégano (*Origanum vulgare*) inoculadas ou não com FMA, com 118 dias. (C) Plantas de hortelã pimenta (*Mentha piperita*) inoculadas ou não com FMA, com 125 dias. Porto Alegre, RS. 2003..... 98
- 3.3 (A) Vista geral da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizada por *Glomus etunicatum*. a= arbúsculos colonizando o interior das células do córtex (Aumento de 200x). (B) Vista do córtex da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizado por *Acaulospora* sp. a = arbúsculos; h= hifas.(Aumento de 400x). Porto Alegre, RS. 2003..... 105
- 3.4 (A) Vista do córtex da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizado por *Acaulospora* sp.. a= arbúsculos colonizando; h= hifas (Aumento de 400x). (B) Vista do córtex da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizado por *Glomus etunicatum*. v= vesícula e h= hifas presentes no espaço intercelular (Aumento de 200x). Porto Alegre, RS. 2003..... 105
- 3.5 (A) Vista do córtex da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizada por *Glomus clarum* (Aumento de 200x). (B) Vista do córtex de hortelã pimenta (*Mentha piperita*) colonizado por *Glomus clarum*. V= vesículas presentes no espaço intercelular (Aumento de 400x). (C) Vista do córtex da raiz de hortelã pimenta (*Mentha piperita*) colonizada por *Acaulospora* sp. a= arbúsculos no interior das células (Aumento de 200x). Porto Alegre, RS. 2003..... 106
- 3.6 (A) Vista do córtex da raiz de melissa (*Melissa officinalis*) colonizado por *Glomus clarum*. v= Vesículas presentes no espaço intercelular (Aumento de 400x). (B) Vista do córtex da raiz de melissa (*Melissa officinalis*) colonizado por *Acaulospora* sp. a= arbúsculos colonizando o interior das células (Aumento de 400x). Porto Alegre, RS..... 107

- 3.7 (A) Vista de raiz de melissa (*Melissa officinalis*) colonizada por *Glomus clarum*. a = arbúsculo colonizando o interior da célula do córtex.;v = Vesícula presente no espaço intercelular do córtex. (Aumento de 400x). (B) Vista do córtex da raiz de melissa (*Melissa officinalis*) colonizada por *Glomus etunicatum*. v=vesícula e h= hifa presentes no espaço intercelular (Aumento de 400x). Porto Alegre, RS. 2003..... 107
- 4.1 Colonização radicular (%) por espécie de FMA (*Acaulospora sp.*, *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*) de plantas dos porta-enxertos de pessegueiro cv. Okinawa, no momento da enxertia (360 dias). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância..... 133
- 4.2 Colonização radicular (%) por espécie de FMA (*Acaulospora sp.*, *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*) de plantas dos porta-enxertos de pessegueiro cv. Okinawa, no momento da enxertia (360 dias). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância..... 133
- 4.3 Hifas, vesículas e arbúsculas presentes no sistema radicular de plantas dos porta-enxertos de pessegueiro cv. Okinawa, no momento da enxertia (360 dias). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância..... 134

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da videira tem relevância sócio-econômica no sul do país, sendo o Rio Grande do Sul o maior pólo vitivinícola do Brasil, responsável, em 2004, pelo processamento de 578,8 mil toneladas de uva, em uma área de cerca de 34 mil hectares de área de vinhedos, resultando em 356,6 milhões de litros de vinho e derivados. Do Estado saem em torno de 90% do vinho elaborado no país. A principal região produtora é a Serra do Nordeste, em que seis municípios (Bento Gonçalves, Caxias do Sul, Farroupilha, Flores da Cunha, Garibaldi e São Marcos) respondem por quase 90% do volume total da produção vinícola gaúcha (APEX, 2006).

A fruticultura moderna exige-se a produção de frutos com qualidade. Para tanto, torna-se fundamental a produção de mudas saudáveis, o que pode ser obtido através de um programa de multiplicação de matrizes de porta-enxertos e de produção de mudas certificadas em locais controlados e em substratos apropriados.

Dentro desse contexto, os fungos micorrízicos arbusculares (FMA) podem ser utilizados como ferramenta biológica, visando aumentar a proteção da muda contra a infecção por patógenos de solo (*Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia* spp.) e interagindo sinergicamente com microrganismos benéficos à rizosfera, como *Rhizobium*, bactérias solubilizadoras de fósforo, fungos saprofitos do gênero

*Trichoderma* e outras rizobactérias (Powell & Bagyaraj, 1984; Calvet et al., 1992; Chu, 1997; Pinochet et al., 1998). Para que este efeito seja benéfico, é necessário que o fungo micorrízico se estabeleça nos tecidos das raízes antes dos patógenos que atacam o sistema radicular, daí a importância da muda ser inoculada com FMA em nova fase de formação, antes de chegar ao pomar.

Este estudo insere-se em uma seqüência de trabalhos com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) do Departamento de Horticultura e Silvicultura (UFRGS), onde se pretende viabilizar e otimizar o uso destes organismos na fruticultura. Até o presente momento, resultados significativos foram obtidos no estudo da associação entre espécies exóticas de FMA e espécies de citros (Schmitz, 1988; Souza et al., 2003; Souza et al., 2005), abacateiro (Silveira, 1999; Silveira et al., 2002a) e videira (Büttenbender, 2001; Agostini, 2002; Carniel, 2004). Também, de identificação de espécies autóctones de FMA ocorrendo em cultivos de citros (Schmitz et al., 1999) e pessegueiro (Nunes et al., 2003), ambos no Estado do Rio Grande do Sul.

Além disso, estão sendo realizados trabalhos em conjunto com o Departamento de Fitossanidade (UFRGS), para estabelecer um protocolo de multiplicação de FMA, através do cultivo *in vitro* de raízes não transgênicas de tomateiro, hortelã pimenta e videira (Lopes, 2003; Cardono, 2005).

A necessidade, em conhecer as espécies de fungos micorrízicos arbusculares autóctones de uma determinada região, reside no fato de que estas já estão adaptadas às condições edafoclimáticas do meio onde se encontram e podem propiciar uma melhor resposta da planta (Cabello, 1999; Vivas et al., 2003). Por este motivo, a determinação de FMA autóctones vem crescendo no mundo e no nosso país nos últimos anos. Exemplos disso são os trabalhos realizados na Escócia com milho e triticale (Daniell et al., 2001); na França, Suíça e Alemanha, com milho e gramíneas nativas (Oehl & Sieverding, 2003); na Espanha com videira e em parques naturais (Bago, 2005; Barea,

2005; comunicações pessoais); e, na Argentina, em solos poluídos por metais pesados (Cabello, 1999).

No Brasil, têm sido realizados levantamentos em zonas produtoras de mandioca na Bahia (Alves et al., 1989); de café em Minas Gerais (Siqueira et al., 1989); de araucária em São Paulo (Bononi et al., 1989); de videira no Paraná (Gerola, 1998); de videira, goiabeira, pessegueiro e macieira em Santa Catarina (Lovato et al., 1989, Franke et al., 1989, Scharf et al., 1989, Silva Filho et al., 1989, respectivamente). No Rio Grande do Sul, além dos trabalhos já citados nas áreas de citros e pessegueiro, há estudos em áreas de araucária (Zandavalli, 2001) e erva-mate (Silveira, 2002).

Além do trabalho de identificação das espécies autóctones de FMA faz-se necessário a otimização de um método eficiente de produção de inóculo das mesmas e que seja economicamente viável para ser aplicado pelo viveirista, já que este organismo não se multiplica na ausência de raízes vivas (Allen, 1991), o que tem impossibilitado a produção comercial deste inóculo em larga escala.

Atualmente, o método mais utilizado de multiplicação dos FMA é realizado através do cultivo de plantas de ciclo rápido como aveia, trevo e sorgo, cujo sistema radicular e substrato servirão, posteriormente, para inoculação das mudas frutíferas (Cardoso & Lambais, 1992; Carniel, 2004). Porém, nestas condições, o cultivo destas plantas forrageiras serve apenas para a propagação dos FMA, sem que a parte aérea redunde em lucro, pois seu principal produto, a massa verde, é descartado. Nesse sentido, o uso de certas espécies de plantas aromáticas na multiplicação de propágulos de FMA representa uma alternativa viável, pois o viveirista poderá utilizar o sistema radicular como inóculo e comercializar a parte aérea como matéria prima para chá ou condimento.

Este trabalho está dividido em capítulos e os objetivos foram:

- a caracterização morfológica e molecular dos FMA autóctones de parreirais da Serra Gaúcha;
- a otimização do método de produção de inóculo de FMA em plantas aromáticas (*Mentha piperita* L., *Origanum vulgare* L., *Melissa officinalis* L.);
- verificar a eficiência destes inóculos em mudas de plantas frutíferas, com ênfase na cultura da videira.

As plantas aromáticas foram testadas na multiplicação de espécies exóticas de FMA. Dessa forma, os resultados gerados nestes experimentos servirão de subsídios para complementar a proposta inicial, ou seja, estabelecer um protocolo de multiplicação de espécies autóctones de FMA, através das plantas aromáticas.

## **CAPÍTULO II**

### **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE FUNGOS MICORRRÍZICOS ARBUSCULARES ISOLADOS DE PARREIRAIS DA SERRA GAÚCHA**

#### **2.1 INTRODUÇÃO**

O Brasil produziu em 2004 mais de 43 milhões de litros de vinhos de *Vitis vinífera* e a tendência é a ampliação de volumes, diante do aumento das regiões de plantio de 15% a 20% nos últimos quatro anos. O Rio Grande do Sul é o maior pólo vitivinícola do Brasil, sendo responsável, em 2004 – a maior vindima da história – pelo processamento de 578,8 mil toneladas de uva. Portanto, a importância social e econômica da vitivinicultura no Rio Grande do Sul e no Brasil é inquestionável, proporcionando trabalho e renda a mais de 52 mil pessoas ligadas diretamente a sua cadeia produtiva (Bütenbender, 2001; APEX, 2006)

Atualmente existem duas correntes principais de caracterização taxonômica de fungos micorrízicos arbusculares (FMA), representadas por Joseph B. Morton e Christopher Walker.

Segundo Morton, em INVAM (2005), os FMA pertencem ao reino Fungi, filo Glomeromycota, ordem Glomales, subordens Gigasporineae e Glomineae e famílias Glomaceae (*Glomus*), Acaulosporaceae (*Entrophospora* e *Acaulospora*), Archaeosporaceae (*Archaeospora*), Paraglomaceae (*Paraglomus*) e Gigasporaceae (*Gigaspora* e *Scutellospora*).

Segundo Walker e colaboradores, em Schüßler *et al.* (2001), os FMA pertencem ao reino Fungi, filo Glomeromycota, ordens Archaeosporales, Diversisporales, Glomerales e Paraglomerales, e famílias Archaeosporaceae (*Archaeospora*) Glomeraceae (*Glomus* grupo A e *Glomus* grupo B), Acaulosporaceae (*Entrophospora* e *Acaulospora*), Diversisporaceae (*Glomus* grupo C), Gigasporaceae (*Gigaspora* e *Scutellospora*), e Paraglomaceae (*Paraglomus*).

Por um lado, Joseph B. Morton baseia-se mais em uma taxonomia clássica, onde a evolução, morfologia e reprodução do fungo são mais importantes (MORTON, 2005). Por outro lado, Christopher Walker e colaboradores, em Schüßler *et al.* (2001), adicionaram a isso uma análise de filogenia, correlacionando as seqüências de rRNA da sub-unidade menor do ribossomo (SSU) entre 100 espécies de FMA. A consequência disso é que estes autores removeram os FMA do filo Zygomycota e o colocaram em um novo filo, Glomeromycota. Criaram três novas ordens (Archaeosporales, Paraglomerales e Diversisporales), além da ordem Glomerales já existente. Por fim, reorganizaram as famílias e seus respectivos gêneros dentro dessas quatro ordens, criando nova chave de classificação. Um resultado prático disso, por exemplo, é que as espécies do gênero *Glomus* foram divididas em três Grupos (A, B e C), de acordo com suas distâncias filogenéticas. As espécies dos grupos A e B estão dentro da família Glomeraceae pertencente à ordem Glomerales. Já as espécies do grupo C estão dentro da família Diversisporaceae, pertencente à ordem Diversisporales.

Apesar de apontar um caminho aparentemente lógico para a caracterização dos FMA, ainda há problemas a serem resolvidos. Um exemplo disso é o fato de *Glomus etunicatum* ter um isolado cuja seqüência da subunidade menor (SSU) rRNA está mais próxima do grupo B e outro isolado com seqüência da sub-unidade menor (SSU) rRNA que se aproxima mais do grupo C (Schüßler et al, 2001).

Portanto, observam-se algumas divergências nas duas principais linhas de caracterização taxonômica de FMA. Nas condições atuais, a melhor opção é a associação de ambas, já que uma só linha de caracterização taxonômica pode não contemplar todas as espécies presentes na área amostrada. Também, devem-se associar os estudos moleculares e morfológicos, agregando exatidão na identificação destes organismos.

A técnica do *temporal temperature gradient electrophoresis* (TTGE) faz parte das técnicas para detecção de mutação, em nível de uma simples base, assim como *denaturing gradient gel electrophoresis* (DDGE) (MA et al., 2005), porém sem a necessidade de um gradiente químico de desnaturação (Bio-Rad Laboratories, 1996). Portanto, se o teste tem potencial para detectar mutação, pode ser utilizado para diferenciar espécies de FMA. A técnica do TTGE consiste em separar seqüências específicas de rDNA que foram amplificadas por PCR, utilizando-se primers específicos que identificam FMA.

O princípio de separação do TTGE está baseado no comportamento da molécula de DNA no momento da separação. Em uma desnaturação em gel de poliacrilamida, a dupla fita de DNA é sujeita às condições que a separa em pequenos fragmentos chamados domínios de separação, sendo a temperatura de separação ( $T_s$ ) destes domínios específica para cada seqüência. Quando a ( $T_s$ ) mínima do domínio de separação é alcançada, a molécula de DNA começa a separar-se, originando duas fitas de DNA. O gel de poliacrilamida reduz a mobilidade de separação do DNA, tornando

possível, a obtenção de fragmentos de DNA de acordo com suas respectivas Ts e suas respectivas bandas no gel.

A caracterização molecular de FMA tem apresentado melhores resultados quando aliam-se mais de uma técnica. O seqüenciamento do DNA ribossômico de esporos destes fungos tem-se revelado uma técnica eficiente para a identificação de muitas espécies de FMA (Redecker, 2000; Daniell et al., 2001; Gollotte et al., 2004) e, por isso mesmo, foi utilizada juntamente com a técnica do PCR-TTGE para a caracterização molecular dos FMA autóctones da Serra Gaúcha.

O objetivo deste capítulo é a caracterização morfológica e molecular dos FMA autóctones de parreirais da Serra Gaúcha.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Coleta de amostras de solo rizosférico de videira**

Em janeiro de 2004 coletou-se solo rizosférico e raízes secundárias de videira em vinte parreirais distribuídos em cinco cidades da Serra Gaúcha (Bento Gonçalves, Caxias do Sul, Garibaldi, Nova Pádua e Farroupilha), amostrando-se quatro parreirais por município. Estas quatro amostras, uma por parreiral, originaram uma amostra composta por município. As amostras foram coletadas na projeção da copa das plantas a uma profundidade de 0 a 20 cm em dois pontos distintos de cada parreiral escolhidos ao acaso.

Em cada parreiral amostrado, realizou-se uma entrevista com o proprietário a respeito das características do parreiral, como variedades cultivadas, idade do parreiral, tratamentos fitossanitários realizados ao longo do ano, área cultivada e produtividade do parreiral. Em cada local, também foram realizadas observações a respeito do perfil do solo e do relevo, para caracterização do solo.

As amostras de solo coletadas foram secas à sombra, ao ar livre e temperatura ambiente, e levadas ao laboratório de Análises de Solo e Tecidos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para determinar os níveis de matéria orgânica, pH e macronutrientes, segundo metodologia proposta por Tedesco et al. (1995).

As amostras de solo rizosférico dos vinhedos, acondicionadas em sacos plásticos, foram levadas à Estación Experimental del Zaidín (Espanha) para determinação morfológica e molecular das espécies autóctones de FMA.

### **2.2.2 Multiplicação dos FMA em casa de vegetação**

Em setembro de 2004, na Estación Experimental del Zaidín (Granada, ES) procedeu-se a análise morfológica prévia dos morfotipos presentes nas áreas dos vinhedos. Para isso, retirou-se 50g de solo de cada amostra, seguindo-se a separação dos esporos mediante a técnica de peneiramento por via úmida e decantação (Gerdemann & Nicolson, 1963).

Para cada morfotipo, montaram-se esporos em lâminas, metade em PVLG e metade em PVLG + Melzer, de acordo com protocolo descrito em INVAM (2005).

Em virtude de não existir um número suficiente de esporos de cada espécie de FMA para obter uma caracterização morfológica confiável nas amostras originais, em outubro de 2004, iniciou-se a multiplicação destas espécies em cultivo armadilha em plantas cultivadas em casa de vegetação. O cultivo armadilha se estabeleceu em vasos de 250 ml de volume usando como substrato uma mistura estéril de solo Zaidín, areia e turfa (2:2:1; v:v:v; pH 6,3); e solo de Galicia e areia (1:1; v:v; pH 4,8). O solo Zaidín é caracterizado como LUVISOL Ócrico (FAO, 1999) e o solo de Galicia é caracterizado HUMBRISOL Húmico (FAO, 1999). O substrato utilizado foi previamente esterilizado em autoclave, a 105 °C por 1 hora, repetido três vezes em intervalo de 24 horas. O

inóculo micorrízico utilizado foi o solo nativo (25g/vaso), dispostos a uma profundidade de 5 cm nos vasos.

Como plantas armadilhas utilizaram-se trevo (*Trifolium repens* L.) e sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), semeando-se oito sementes da primeira cultura e duas sementes da segunda em cada vaso. As plantas foram cultivadas durante quatro meses em casa de vegetação com condição controlada de temperatura do ar (25°C). Passado este tempo, os cultivos foram transferidos para vasos de dois litros de volume, com a finalidade de obter um maior número de esporos.

### **2.2.3 Caracterização morfológica de FMA presentes nos solos rizosféricos de videira e em cultivo armadilha**

Para a caracterização morfológica de FMA presentes nos solos rizosféricos de videira tomaram-se 3 amostras de 50 g de solo rizosférico para realizar-se a extração dos esporos.

Seis meses após o início dos cultivos armadilha, tomaram-se 3 amostras de 80 g de solo rizosférico de cada tratamento para realizar-se a extração dos esporos e proceder-se à caracterização morfológica e molecular dos FMA.

As metodologias descritas a seguir são idênticas para as duas caracterizações morfológicas prodedidas: diretamente de solos rizosféricos de videira e de cultivo armadilha.

De cada amostra realizou-se a separação dos esporos pela técnica de peneiramento por via úmida e decantação (Gerdemann & Nicolson, 1963).

Para cada morfotipo, montaram-se esporos em lâminas, metade em PVLG e a outra metade em PVLG + Melzer. Também foram separados dois a três esporos de cada

morfotipo, os quais foram postos em tubos de 0,2 ml de volume, para posterior análise molecular.

Procedeu-se a identificação morfológica dos esporos ao microscópio óptico segundo o manual de Schenck & Pérez (1988), descrições contidas nos *sites* do INVAM (2005), Blaszkowski (2005), artigos relacionados e, também, contou-se com o auxílio de taxonomistas da UNIBAS (Basiléia, Suíça). Avaliaram-se os seguintes caracteres: diâmetro dos esporos, espessura das paredes externa e interna, número de paredes, tipo de ornamentação, cor das paredes nos diferentes tipos de reativos (PVLG e PVLG + Melzer), forma dos esporos, presença de células auxiliares, vesícula-mãe, célula suspensoróide e placa de germinação. Além disso, foram avaliadas as principais características da hifa de sustentação, como forma, largura, cor, composição de paredes e oclusão do poro.

#### **2.2.4 Caracterização molecular: seqüenciamento do rDNA dos esporos**

Para a obtenção das seqüências de rDNA 18S AM1-NS31 de esporos de FMA seguiu-se o protocolo descrito a seguir.

##### **Amplificação do rDNA 18S com primers universais**

- Coloca-se o esporo em um tubo contendo 23 µl de água e se macera.
- Adiciona-se 1 µl do primer NS31 (5' TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC 3') (25 µM) e 1 µl do primer NS41 (5' CCC GTG TTG AGT CAA ATT A 3') (25 µM).
- Agita-se em vortex, em velocidade máxima, durante 40 s.
- Adiciona-se uma solução de Puretaq<sup>TM</sup> que contém 200 µM DNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl e 1,5 mM Mg.
- Agita-se em vortex e aplica-se um pulso na centrifuga de 80 s.

- Com isto, consegue-se um volume final de 25 µl e com esta solução é feita a reação de PCR, cujos tempos e temperaturas são as que seguem: desnaturação inicial por cinco minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos com desnaturação por 30 s a 94 °C, anelamento por 45 s a 50 °C e extensão por um minuto, a 72 °C e uma extensão final por sete minutos a 72 °C.

### **Visualização dos produtos da amplificação (eletroforese)**

- Para visualização utilizou-se gel de agarose à 1,6 % em tampão TAE 1X.
- Coloca-se o gel em uma cubeta coberta com Tampão TAE 1X.
- Dessa forma, o gel está pronto para ser carregado com o produto da PCR junto com o tampão de carga.
- Realiza-se a eletroforese a 100 v, durante 45 min.

### **Purificação do DNA presente no gel de agarose**

- O DNA no gel foi visualizado por coloração com brometo de etídio e visualizado sob luz UV (260 nm).
- A banda de DNA de interesse foi cortada do gel com uma lâmina fina.
- Utiliza-se o Kit QUIAEX II – Gel extração Kit (150).
- Ao fragmento do gel de agarose contendo o DNA se adicionam 500 µl de Tampão QX1.
- Adicionam-se 10 µl de resina ao fragmento do gel.
- Agita-se em vortex.
- Incuba-se a 50 °C, durante 10 min e agita-se a mistura a cada dois minutos.
- Centrifuga-se a máxima velocidade, durante 30 s.
- Retira-se o sobrenadante.
- O sedimento, que contém a resina com o DNA, é lavado com 500 µ de Tampão QX1.

- Agita-se em vortex.
- Centrifuga-se durante 30 s a máxima velocidade e retira-se o sobrenadante.
- Adicionam-se 500 µl do Tampão PE ao sedimento.
- Agita-se em vortex.
- Centrifuga-se durante 30 s, a máxima velocidade.
- Elimina-se o sobrenadante.
- Agregam-se mais 500 µl do Tampão PE.
- Agita-se em vortex e centrifuga-se.
- Retira-se o sobrenadante.
- Agita-se e elimina-se o resto de Tampão PE.
- Seca-se a resina durante meia hora à temperatura ambiente.
- Adicionam-se 10 µl de água estéril.
- Agita-se em vortex.
- Espera-se cinco minutos de incubação.
- Centrifuga-se durante 30 s, a máxima velocidade.
- O sobrenadante (10 µl), que contém o DNA, é transferido a um tubo novo.
- Adicionam-se 10 µl de água à resina e agita-se em vortex.
- Incuba-se durante cinco minutos.
- Centrifuga-se durante 30 s e o sobrenadante retido é transferido ao tubo que contém os 10 µl purificados anteriormente.

### **PCR com primers específicos**

- O DNA purificado do gel é diluído em água, na proporção de 1:10.
- A reação de PCR é preparada usando-se o Kit Ready-To-Go PCR. Para isso, em um tubo do Kit se adiciona 1 µl do DNA eluído, 22 µl de água, 1 µl do primer AM1 (5'GTT CCC GTA AGG CGC CGA A3') (5 µm) e 1 µl do primer NS31 (5 µm).

- Com isso consegue-se um volume final de 25 µl e com esta solução procede-se uma reação de PCR, cujos tempos e temperaturas são os que seguem: desnaturação inicial por cinco minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de desnaturação durante 45 s, a 94 °C, anelamento por um minuto a 58 °C, extensão por um minuto a 72 °C, e uma extensão final durante sete minutos a 72 °C.

- As bandas obtidas após migrar o produto do PCR em um gel de agarose foram purificadas (segundo o protocolo descrito anteriormente) e enviadas para seqüenciamento no instituto López-Neyra (CSIC). As seqüências obtidas foram comparadas por BLASTn com seqüências presentes na base de dados NCBI. O alinhamento das seqüências foi realizado pelo programa CLUSTALW. A árvore filogenética foi construída pelo método da máxima parcimonia pela interface do programa BioEdit.

### **2.2.5 Caracterização molecular: PCR-TTGE do rDNA de raízes colonizadas por FMA**

O objetivo principal da técnica de PCR-TTGE é diferenciar espécies de FMA pelas diferenças de seqüências da região 18s rDNA.

Com o objetivo de identificar os FMA que estavam colonizando as raízes das plantas armadilhas, extraiu-se o DNA das mesmas, utilizando-se o Dneasy Plant Mini Extraction Kit (Quiagen), e amplificou-se por PCR um segmento da subunidade ribossômica 18S, utilizando-se os primers NS31 e AM1.

O produto obtido do PCR foi eluído e submetido a uma segunda PCR com os primers NS31-GC (primer NS31 com um GC-clamp para dar estabilidade ao produto de PCR na análise de TTGE) e Glo1 (5' GCC TGC TTT AAA CAC TCT A 3').

O DNA obtido nesta segunda reação de PCR foi carregado em um gel de agarose 1,6% e o fragmento de DNA de interesse ( $\pm 300$  pb) foi eluído do gel, como indicado anteriormente.

O DNA purificado foi analisado por *Temporal Temperature Gradient Electrophoresis* (TTGE).

A análise do TTGE foi realizada utilizando-se o *DCode universal mutation detection Kit* (BioRad Laboratories, 1996) e gel de poliacrilamida com dimensões de 16 cm x 16 cm x 1mm. Para separação dos fragmentos de PCR NS31-GC/AM1 realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida;bisacrilamida (37.1:1; w:v) com 6% de concentração e uréia (8M) com Tampão TAE 1,5X (1X TAE = 40 mM Tris acetato, 20 mM ácido acético, 1mM EDTA, pH 8,3), em uma voltagem constante de 130 V. O tempo necessário para realização da análise do TTGE foi de sete horas, sendo que a temperatura inicial foi de 54 °C e a final de 61 °C. Portanto, a variação de temperatura ao longo do processo foi de 1 °C por hora. A quantidade de produto de PCR depositado nas células do gel foi de 3  $\mu$ l por amostra.

A presença ou ausência de bandas no gel foi analisada por três pessoas separadamente. Após, o gel foi fotografado com câmera digital (Nikon, 5.0 ).

## **2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.3.1 Características dos parreirais amostrados**

Na Tabela 2.1 observa-se que não há variações importantes nos níveis nutricionais nas amostras de solo dos distintos municípios analisados neste estudo.

Essa homogeneidade provavelmente está relacionada com as correções de fertilidade que os agricultores efetuam normalmente para obter melhores produtividades.

TABELA 2.1 Níveis de argila, pH, matéria orgânica (MO), fósforo (P), potássio (K), alumínio (Al), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) dos solos dos parreirais de videira amostrados para a análise da diversidade dos FMA nos cinco municípios estudados da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. 2004.

Localidade	Argila %	pH (H <sub>2</sub> O)	MO %	P mg dm <sup>-3</sup>	K mg dm <sup>-3</sup>	Al Ca Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )
Farroupilha	25	6,3	9,5	>100	251	25 6,3 6,3
Garibaldi	22	6,3	9,7	<100	297	22 6,3 6,5
Caxias do Sul	39	6,6	7,6	>100	224	39 6,6 6,6
Bento Gonçalves	29	6,4	8,7	>100	304	29 6,4 6,4
Nova Padua	38	6,1	9,8	>100	307	38 6,1 6,2

Na tabela 2.2 consta a interpretação dos níveis de fósforo “extraível” no solo de acordo com a Comissão de fertilidade do solo - RS e SC (1994). Analisando os dados da Tabela 2.1, através da Tabela 2.2, verificamos que para todas as amostras de solo os níveis de fósforo são elevados. A absorção do fósforo tem relação direta com o crescimento da planta, sendo que quando este atinge concentrações próximas da adequada, a colonização das raízes é inibida por mecanismos auto-regulatórios da simbiose, tornando os FMA desnecessários e incompatíveis com as condições de excesso de nutrientes no solo (Powell & Bagyaraj, 1984; Siqueira & Franco, 1988). Portanto, nestas condições, pode-se esperar uma supressão dos FMA, tanto pela diminuição do número de espécies de FMA presentes no habitat, quanto nos números de esporos por espécie.

Vários autores destacam a importância dos FMA na absorção de P, principalmente, em condições tropicais, onde os solos apresentam baixos teores de P disponível, devido a sua alta capacidade de fixação nos colóides do solo (Colozzi-Filho & Balota, 1994; Rosand & Dias, 1985). Este trabalho, no entanto, propicia o estudo dos FMA em níveis elevados de P no solo, em consequência das correções de fertilidade que os agricultores efetuam normalmente em seus parreirais. Servindo,

portanto, de referência para comparações com estudos deste organismo em áreas de baixa fertilidade, principalmente no que diz respeito à riqueza de espécies e gêneros de FMA.

TABELA 2.2 Interpretação dos resultados de fósforo “extraível” do solo para as principais culturas no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Adaptado de Comissão de fertilidade do solo - RS e SC, 1994).

	Classes de solo*					
	1	2	3	4	5	6
	----- mg dm <sup>-3</sup> -----					
Limitante	≤ 1,0	≤ 1,5	≤ 2,0	≤ 3,0	≤ 4,0	-
Muito Baixo	1,1 - 2,0	1,6 - 3,0	2,1 - 4,0	3,1 - 6,0	4,1 - 8,0	-
Baixo	2,1 - 4,0	3,1 - 6,0	4,1 - 9,0	6,1 - 12,0	8,1 - 16,0	≤ 3,0
Médio	4,1 - 6,0	6,1 - 9,0	9,1 - 14,0	12,1 - 18,0	16,1 - 24,0	3,1 - 6,0
Suficiente	> 6,0	> 9,0	> 14,0	> 18,0	> 24,0	> 6
Alto	> 8,0	> 12,0	> 18,0	> 24,0	> 30,0	-

\* Classe 1: >55 % argila e/ ou solos Erexim, Durox, Vacaria, Santo Ângelo, Aceguá, Pouso Redondo, boa Vista etc.

Classe 2 : 41 a 55 % de argila e/ ou solos Passo Fundo franco-argiloso e argiloso, Estação, Oásis, Ciriáco, Associação Ciriáco-Charrua, São Borja, Vila, Farroupilha, Rancho Grande, Içara etc.

Classe 3 : 26 a 40 % de argila e/ ou solos Passo Fundo franco-arenoso e arenoso, Júlio de Castilhos, São Jerônimo, Alto das Canas, São Gabriel, Canoinhas, Jacinto Machado, Lages etc.

Classe 4 : 11 a 25 % de argila e/ ou solos Cruz Alta, Tupanciretã, Rio Pardo, Camaquã, Bagé, Bexigoso, Pelotas, São Pedro, Santa Maria, Pinheiro Machado, etc.

Classe 5 : ≤ 10 % argila e/ ou solos Bom Retiro, Tuia, Vacacaí etc.

Classe 6 : solos alagados ( arroz irrigado por inundação).

Na tabela 2.3 consta a interpretação dos níveis de pH, matéria orgânica, cálcio, magnésio e potássio no solo de acordo com a Comissão de fertilidade do solo - RS e SC (1994). Analisando os dados da Tabela 2.1, através da Tabela 2.3, verifica-se que, para todas as amostras de solo, os níveis de potássio, cálcio, magnésio e matéria orgânica, que é fonte de nitrogênio para as plantas, estão muito acima do que seria necessário, o que também contribui para a inibição do desenvolvimento dos FMA (Siqueira & Franco,1988; Silveira,1992; Berbara & Fonseca, 1996).

TABELA 2.3 Interpretação geral dos resultados de análise do solo para o Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Adaptado de Comissão de fertilidade do solo - RS e SC, 1994).

Teor no solo	Determinações					
	pH Água	Matéria Orgânica	Cátions trocáveis			
		%(m/v)	Ca	Mg	Ca+Mg	K
			-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----			(mg dm <sup>-3</sup> )
Limitante	—	—	—	—	—	≤20
Muito Baixo	≤5,0	—	—	—	—	21-40
Baixo	5,1-5,5	≤2,5	≤2,0	≤0,5	≤2,5	41-60
Médio	5,6-6,0	2,6-5,0	2,1-4,0	0,6-1,0	2,6-5,0	61-80
Suficiente	—	—	—	—	—	81-120
Alto	>6,0	>5,0	>4,0	>1,0	>5,0	>120

Unidades: % (m/v) = relação massa/volume; cmol /l (centimol de carga por litro de solo) = me/100 ml ou me/L ; mg/L (miligrama por litro de solo) = ppm (massa/volume).

A análise das características dos parreirais onde se retiraram as amostras de solo rizosférico indica que os parreirais amostrados nos municípios de Farroupilha e Garibaldi apresentavam menor número de variedades do enxerto de videira, enquanto os parreirais amostrados nos municípios de Nova Pádua e Bento Gonçalves possuíam maior número de variedades do enxerto (Tabela 2.4). Além disso, os parreirais dos diferentes municípios receberam aplicações em diferentes quantidades de produtos químicos na parte aérea. Assim, os de Nova Pádua foram os que receberam menores quantidades destes compostos, enquanto os de Garibaldi foram os que receberam quantidades maiores.

Em relação aos tipos de solos predominantes nas áreas amostradas, observa-se a ocorrência de dois tipos de solos: CHa<sub>2</sub>= CAMBISSOLO HÚMICO alumínico e RLd1= NEOSSOLO LITÓLICO distrófico. Enquanto os dois tipos de solos foram identificados nas áreas amostradas nos municípios de Nova Pádua e Garibaldi, nos parreirais amostrados no município de Farroupilha identificou-se somente o tipo CHa<sub>2</sub>, enquanto nos municípios de Bento Gonçalves e Caxias do Sul identificou-se somente o

tipo RLd<sub>1</sub>. Apesar de serem solos muito semelhantes em suas características pedológicas, o tipo RLd<sub>1</sub> foi identificado em áreas com solso mais rasos, presença mais acentuada de afloramentos rochosos e relevo mais fortemente ondulado, em relação às áreas onde se identificou os solos do tipo CHa<sub>2</sub>.

TABELA 2.4 Características dos parreirais de onde se retiraram as amostras de solo rizosférico nos cinco municípios amostrados da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. 2004.

	Farroupilha	Nova Pádua	Bento Gonçalves	Caxias do Sul	Garibaldi
Variedade do enxerto <sup>1</sup>	Isabel	Isabel C. Sauvignon Niágara Branca Merlot	Isabel C. Sauvignon Couderc noir Pirovano 65	Isabel C. Sauvignon Niágara Branca	Isabel Niágara Branca
Variedade do porta-enxerto <sup>2</sup>	Isabel 101-14 Paulsen 1103	Isabel Paulsen 1103 Niágara	Isabel 101-14 Paulsen 1103 Couderc	Isabel 101-14 SO4 Paulsen 1103	Isabel Paulsen 1103
Média de Idade dos parreirais (anos)	39,25	11	22	19,25	12,7
Tipo de cobertura	Vegetação Nativa	Azevém, Trevo branco, Cornichão, Aveia branca	Vegetação Nativa	Vegetação Nativa, Trevo branco	Vegetação Nativa, Aveia branca, Azevém
Média de aplicações de herbicida/ano	2X	1,25X	1X	2,5X	1,5X
Tipo de solo predominante <sup>3</sup>	CHa <sub>2</sub>	RLd <sub>1</sub> e CHa <sub>2</sub>	RLd <sub>1</sub>	RLd <sub>1</sub>	RLd <sub>1</sub> e CHAa <sub>2</sub>
Número de pulverizações/ano <sup>5</sup>	7,5	3,5	7,8	8,5	9,7
Sistema de condução do parreiral <sup>6</sup>	Latada (4)	Latada (2) Espaladeira (2)	Latada (4)	Latada(4)	Latada(4)
Área do parreiral (há)	0,85	0,81	0,42	0,40	0,29
Produtividade (t/ha)	24,2	39,0	17,0	21,0	45,3

<sup>1</sup> Isabel (*Vitis labrusca* L.); Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.); Couderc (*V. rupestris* Scheele x *V. vinifera* de acordo com Galet, 1985; *V. labrusca* x *V. vinifera* x *V. rupestris* de acordo com Pommer, 2003); Niágara branca (Provável hibridação entre *V. labrusca* x *V. vinifera* de acordo com Pommer, 2003); Pirovano 65 (cv. Bicane X cv. Muscat de Hambourg, de acordo com Galet, 1985; *V. vinifera* x espécie desconhecida, de acordo com Pommer, 2003); Merlot (*Vitis vinifera* segundo Pommer, 2003; origem desconhecida segundo Galet, 1985). <sup>2</sup> Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri* Planc. x *V. rupestris*); SO4 (*V. berlandieri* Planchon x *V. riparia* Michaux); 101-14 (*V. riparia* x *V. rupestris*). <sup>3</sup> CHa<sub>2</sub>= CAMBISSOLO HÚMICO aluminico; RLd<sub>1</sub>= NEOSSOLO LITÓLICO distrófico. <sup>4</sup> Média anual de aplicações de glifosato/parreiral. <sup>5</sup> Média do número de vezes ao ano em que se aplicaram produtos químicos para o controle de doenças da parte aérea/parreiral. <sup>6</sup> Número de parreirais amostrados que utiliza o referido sistema de condução.

### 2.3.2 Espécies de FMA presentes nos solos rizosféricos de videira

Na Tabela 2.5 observa-se um grande número de espécies de FMA encontrados nos solos dos vinhedos dos cinco municípios amostrados. O número de espécies nestas amostras variou pouco, de 13 a 15, assim como variou pouco o número de esporos por espécie entre as amostras. Porém há uma variação maior na ocorrência das espécies de FMA, onde algumas aparecem em todas as áreas e outras em poucas ou apenas uma área.

TABELA 2.5 Espécies de FMA e número de esporos isolados nas amostras de solo rizosférico dos parreirais dos cinco municípios da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul. 2005<sup>1</sup>.

Espécies de FMA	Municípios				
	Caxias	Bento Gonçalves	Nova Pádua	Farroupilha	Garibaldi
<i>Acaulospora capsicula</i>	5		3		4
<i>A. laevis</i>	4	3	5		4
<i>A. mellea</i>		5	5	3	
<i>A. morrowiae</i>		6			
<i>A. rehmi</i>				5	
<i>A. scrobiculata</i>	3		4	2	3
<i>A. spinosa</i>		3			
<i>Archaeospora gerdemannii</i>				4	
<i>A. trappeii</i>		6			5
<i>Archaeospora</i> sp.	3				
<i>Entrophospora infrequens</i>	5		3	6	4
<i>Gigaspora gigantea</i>			4		
<i>Glomus aggregatum</i>	9				
<i>G. aureum</i>	3	4		2	
<i>G. brohultii</i>			4		
<i>G. claroideum</i>		5	8		
<i>G. constrictum</i>	5			6	
<i>G. etunicatum</i>			9		
<i>G. fasciculatum</i>		5		2	3
<i>G. geosporum</i>				12	
<i>G. hoi</i>				4	
<i>G. macrocarpum</i>	4	2	5	3	7
<i>G. mosseae</i>	6				9
<i>G. sinuosum</i>	3	2		5	3
<i>Pacispora coralloidea</i>	3	4	2	1	4
<i>P. dominikii</i>			1	3	2
<i>Paraglomus occultum</i>	8	12			
<i>Scutellospora calospora</i>	5				
<i>S. heterogama</i>		4			
<i>S. pellucida</i>	3		6		2
Número de esporos	69	61	59	58	50
Total de espécies (30)	15	13	13	14	13

<sup>1</sup> Esporos isolados em 50 g de substrato. Média de três repetições.

As espécies de FMA encontradas estão divididas em 8 gêneros, destacando-se o gênero *Glomus*, com 12 espécies; o gênero *Acaulospora* com 7 espécies, além de *Archaeospora*, *Pacispora* e *Scutellospora* com 3 espécies cada; e *Entrophospora*, *Gigaspora* e *Paraglomus* com uma espécie cada. Estes resultados indicam que existe uma boa diversidade destes organismos na região tradicional vitícola do sul do Brasil. Isto sugere um excelente potencial para produção de inóculos puros destes fungos e seu posterior emprego na produção de mudas, posto que uma planta micorrizada apresenta uma melhor nutrição mineral e uma melhor resistência tanto a estresses bióticos como abióticos (Barea et al., 2005).

Esses dados, por si só, evidenciam a grande riqueza de espécies presentes na região e devem estimular o surgimento de novos trabalhos de identificação de espécies autóctones de FMA associadas a outras culturas na região.

A riqueza de fertilidade dos solos amostrados (Tabela 2.1) não influenciou negativamente no número de espécies e de gêneros de FMA por área amostrada (Tabela 2.5), posto que foi identificado um grande número de espécies e de gêneros destes fungos por amostra, comparando-se com outros trabalhos de identificação de FMA autóctones de espécies frutíferas (Schmitz et al., 1999; Ávila, 2004; Focchi et al., 2004). No entanto, a alta fertilidade é a causa mais provável para o baixo número de esporos por espécie verificado (Tabela 2.5), já que incrementos nos níveis de fósforo, superiores aos requeridos pelas plantas, podem prejudicar a produção de esporos e a colonização das raízes (Powell & Bagyaraj, 1984; Siqueira & Franco, 1988).

### **2.3.3 Espécies de FMA multiplicados em casa de vegetação**

A Tabela 2.6 apresenta as espécies de FMA, bem como o número de esporos em 80 g de substrato obtidos a partir do cultivo das plantas armadilha. Observa-se que o

número de esporos por amostra foi baixo em geral e que se destaca o gênero *Glomus*, apresentando 10 espécies dentre os isolados. Outro fator a destacar é que nenhuma espécie ocorreu em todas as amostras, somente *Glomus caledonium* esteve presente em 4 municípios e, as demais, apareceram em 1, 2 ou 3 municípios.

Além disso, observa-se um menor número de espécies nos solos dos cultivos armadilha (Tabela 2.6) que nos solos nativos (Tabela 2.5). Nos cultivos armadilha encontrou-se 18 espécies, contra 30 isolados originalmente. O pouco tempo de cultivo (6 meses) desde a implantação dos cultivos das plantas nos vasos até a avaliação é a causa mais provável para este efeito. Também se observa que houve uma variação no número de esporos de acordo com as espécies de FMA, onde as espécies pertencentes a *Glomus* (em especial *Glomus geosporum* e *Glomus etunicatum*) apresentam maior número de esporos em comparação com os demais gêneros.

TABELA 2.6 Espécies de FMA e número de esporos isolados nas rizosferas das plantas armadilha inoculadas com solos dos parreirais dos cinco municípios da Serra Gaúcha, Rio Grande do Sul, 2005<sup>1</sup>.

Espécies de FMA	Municípios				
	Caxias	Bento Gonçalves	Nova Pádua	Farroupilha	Garibaldi
<i>Acaulospora laevis</i>	3		2		4
<i>A capsicula</i>	9				
<i>A mellea</i>				6	
<i>Archaeospora trappei</i>			5		6
<i>Entrophospora schenkii</i>				4	
<i>E. infrequens</i>		6		2	5
<i>Glomus geosporum</i>	20	17			
<i>G. mosseae</i>		6	5	5	
<i>G. macrocarpum</i>		5		3	
<i>G. etunicatum</i>	10	8			
<i>G. claroideum</i>	4		4		
<i>G. intraradices</i>	3	4		2	
<i>G. fasciculatum</i>		3			2
<i>G. caledonium</i>		2	3	2	3
<i>G. hoi</i>				3	
<i>G. constrictum</i>				6	
<i>Pacispora dominikii</i>					4
<i>Paraglomus occultum</i>	15				
Número de esporos	64	51	19	33	24
Total de espécies	6	8	5	9	6

<sup>1</sup> Esporos isolados em 80 g de substrato. Média de três repetições.

Comparando-se a Tabela 2.6 com a tabela 2.5, evidencia-se a importância de realizar duas análises morfológicas em conjunto: uma nos solos rizosféricos; outra em plantas inoculadas com estes solos e cultivadas em estufa. Com essa prática foi possível detectar mais espécies e mais gêneros de FMA do que com as análises em separado. Assim, no total, identificaram-se 33 espécies, distribuídas em 8 gêneros. O fato de surgirem espécies em cultivo armadilha que não foram identificadas nos solos rizosféricos (*Entrophospora schenkii*, *Glomus intraradices* e *Glomus caledonium*), pelo reduzido número de esporos das mesmas, deve-se ao estímulo das plantas, através de exudados radiculares, em propiciar a germinação de esporos de FMA, a colonização das raízes das plantas e o surgimento de novos esporos passíveis de serem identificados ao microscópio. Os FMA são simbiontes obrigatórios, com reprodução assexuada e ainda não foram cultivados na ausência de raízes vivas. Estruturas reprodutivas, como esporos e hifas, sobrevivem como propágulos na ausência de raízes e, na presença destas, colonizam o córtex radicular e estabelecem relação mutualística, que garante a produção de novos propágulos (Powell & Bagyaraj, 1984; Siqueira, 1994). Diversos estudos sugerem que a germinação dos esporos de FMA ocorre por estímulo de hormônios produzidos pelas raízes das plantas. Dentre esses hormônios destaca-se o flavonóide formononetina, identificado como fator estimulante de colonização micorrízica (Silva-Júnior & Siqueira, 1998).

#### **2.3.4 Caracterização morfológica das espécies de FMA encontradas nos solos rizosféricos de videira e nos cultivos armadilha**

A seguir descrevem-se todas as características morfológicas dos esporos isolados em área de vinhedos da serra gaúcha, destacando-se a coloração e diâmetro dos esporos, bem como características das paredes dos esporos e das hifas de sustentação dos esporos; características estas empregadas na taxonomia de FMA.

**1- *Acaulospora capsicula*** Blaszk. (Figura 2.1 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: laranja-avermelhado.

Forma: globoso.

Diâmetro: 169-305  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: não observada.

Cicatriz: concolor ao esporo, semicircular, 10,2–16,4  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Parede externa: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, evanescente, com 0,7–1,3  $\mu\text{m}$  de espessura (esp.).

A2: laranja-escuro, laminada, 3,0–4,2  $\mu\text{m}$  esp. Não apresentou reação em meio Melzer.

A3: hialina, unitária, 0,8-1,4  $\mu\text{m}$  esp. Laranja claro em meio Melzer.

Paredes Internas: Constam de dois grupos (B e C).

O grupo B está formado por duas camadas (B1 e B2).

B1: hialina, membranosa, flexível, 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  esp. Não apresentou reação em meio Melzer.

B2: hialina, membranosa, semiflexível, 1,0–2,0  $\mu\text{m}$  esp. Não apresentou reação em meio Melzer.

O grupo C está formado por duas camadas (C1 e C2)

C1: hialina, membranosa, 0,8-1,2  $\mu\text{m}$  esp. Presença de pequenos grânulos (“beads”) na superfície da parede (“beaded wall”). Não apresentou reação em meio Melzer.

C2: hialina, amorfa, 1,2-2,1  $\mu\text{m}$  esp. Apresentou coloração vermelho-escura em meio Melzer.

Murônimo: A(ELU) B(MM) C(M<sub>b</sub>A)

Comentários: Os caracteres observados nos esporos desta espécie apresentam boa concordância com a descrição original (Blaszkowski, 1990). No entanto, este autor não

descreve a segunda camada da parede central (B2), talvez por estas em geral ficarem muito aderidas uma à outra, dificultando sua individualização.

## **2- *Acaulospora laevis* Gerd. & Trappe (Figura 2.1 B)**

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-escuro a marrom.

Forma: globoso.

Diâmetro: 133-210  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: não observada.

Cicatriz: circular, 6,0–6,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Os esporos estão formados por três grupos de paredes (A, B, C).

Parede externa: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: Hialina, evanescente, com 1,0–1,3  $\mu\text{m}$  esp.

A2: Castanha-escuro, laminada, 1,5–2,0  $\mu\text{m}$  esp.

A3: Amarela, unitária, <1,0  $\mu\text{m}$  esp.

Paredes Internas: constam de dois grupos (B e C).

O grupo B está formado por duas camadas (B1 e B2).

B1: Hialina, membranosa, unitária, flexível, < 0,5 $\mu\text{m}$ .

B2: Hialina, membranosa, flexível, < 0,5 $\mu\text{m}$ .

O grupo C está formado por duas camadas (C1 e C2)

C1: Hialina, membranosa, flexível, 0,4-0,6  $\mu\text{m}$  esp. Presença de pequenos grânulos (“beads”) na superfície da parede (“beaded wall”).

C2: Hialina, membranosa, semiflexível, 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: E(ELU) C(MM)I(M<sub>b</sub>M)

Comentários: Há boa correspondência com a descrição presente no banco de dados do INVAM (Morton, 2005), exceto para a última camada da parede externa, que, segundo Morton, é laminada, e divergem das observações feitas por Gerdemann & Trappe (1974) (*apud* Schenck & Pérez, 1988), no que se refere à classificação das paredes internas.

**3- *Acaulospora mellea* Spain & N.C. Schenck (Figura 2.2 A)**

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-amarronzado.

Forma: globoso.

Diâmetro: 97–129  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: não observada.

Cicatriz: circular, 6,0– 8,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Parede externa: formada por um grupo de três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, evanescente, com presença de detritos aderidos e menos de 0,5  $\mu\text{m}$  esp.

A2: castanha-escura, laminada, 1,5–3,8  $\mu\text{m}$  esp.

A3: amarela-palha, finas laminações, 1,2-3,0  $\mu\text{m}$  esp.

Paredes Internas: constam de dois grupos (B e C).

O grupo B está formado por uma camada (B1).

B1: hialina, unitária, flexível, 1,0  $\mu\text{m}$  esp.

O grupo C está formado por duas camadas (C1 e C2)

C1: hialina, membranosa, 1,0-1,5  $\mu\text{m}$  esp. Presença de granulações circulares de tamanho médio na superfície da parede (“beadwall”). Leve reação em meio Melzer, passando a apresentar coloração amarela-palha.

C2: hialina, amorfa, 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  esp. Forte reação em meio Melzer, passando a apresentar coloração marrom-avermelhada.

Murônimo: A(ELL\*) B(U) C(M<sub>b</sub>A)

Comentários: Em geral houve boa correspondência entre os caracteres observados e os contidos nas descrições de Schenck *et al.* (1984) (*apud* Schenck & Pérez, 1988) e Morton (2005). A parede central apresentou somente uma camada, como na descrição original, ao invés de duas como observadas por Morton.

#### **4- *Acaulospora morrowiae* Spain & N.C. Schenck (Figura 2.2 B)**

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-claro a amarelo-palha.

Forma: globoso.

Diâmetro: 64–88  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: não observada.

Cicatriz: circular, 2,0–4,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Parede externa: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: Hialina, evanescente, com presença de detritos aderidos e 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  esp.

A2: Amarelo-claro, unitária, 1,5–2,5  $\mu\text{m}$  esp. Não apresentou reação em meio Melzer.

A3: Amarelo-escuro, unitária, 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  esp. Não apresentou reação em meio Melzer.

Paredes Internas: constam de dois grupos (B e C).

O grupo B está formado por uma camada (B1).

B1: Hialina, unitária, membranosa, 0,5  $\mu\text{m}$  esp.

O grupo C está formado por duas camadas (C1 e C2)

C1: Hialina, membranosa, flexível, 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  esp. Presença de pequenos grânulos circulares (“beads”) na superfície da parede (“beaded wall”).

C2: Hialina, membranosa, 0,5  $\mu\text{m}$  esp. Coloração alaranjada em meio Melzer.

Murônimo: A(EUU\*) B(M) C(M<sub>b</sub>M)

Comentários: Em geral houve boa correspondência entre as características registradas nos esporos isolados neste levantamento e as contidas nas descrições de Schenck *et al.* (1984) (*apud* Schenck & Pérez, 1988) e Morton, 2005. Na descrição do Morton (2005), registra-se a ocorrência de mais uma camada na parede central (B2), e é muito possível que ela exista e seja de difícil visualização. A segunda camada da segunda parede interna, normalmente torna-se inchada na presença de PVLG (amorfa); no entanto, nos esporos analisados, esta reação não foi detectada.

**5- *Acaulospora rehmii*** Sieverd. & S. Toro (Figura 2.3 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-claro

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 133–150  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: não observada.

Cicatriz: circular, 3,0–6,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Os esporos estão formados por três grupos de paredes (parede externa, central e interna).

Parede externa: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, evanescente, 0,4-0,6  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarelo-palha, laminada, 1,5–3,6  $\mu\text{m}$  esp., presença de ornamentação na forma de **labirintos** que recobrem toda superfície externa do esporo. Modifica para amarelo-claro em reagente de Melzer

A3: hialina, unitária, 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  esp. Apresenta coloração amarelo-clara em Melzer.

Paredes Internas: constam de dois grupos (B e C).

O grupo B está formado por duas camadas (B1 e B2).

B1: hialina, unitária, membranosa, 0,5  $\mu\text{m}$  esp. Não apresentou reação em meio Melzer.

B2: hialina, unitária, membranosa, em torno de 1,0  $\mu\text{m}$  esp. Não apresentou reação em meio Melzer.

O grupo C está formado por duas camadas (C1 e C2).

C1: hialina, membranosa, flexível, 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  esp. Presença de grânulos circulares na superfície da parede (“beadwall”). Leve reação em meio Melzer, passando a apresentar coloração amarelo-palha.

C2: hialina, membranosa, flexível, 0,5  $\mu\text{m}$  esp. Forte reação em meio Melzer, passando a apresentar coloração vermelha.

Murônimo: A(ELU) B(MM) C(M<sub>b</sub>M)

Comentários: Boa correspondência com as descrições de Sieverding & Toro (1987) (apud Schenck & Pérez, 1988) e do *site* do INVAM (2005).

**6- *Acaulospora scrobiculata*** Trappe (Figura 2.3 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: branco a amarelo-claro.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 105–170  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: não observada.

Cicatriz: circular, 11,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Parede externa: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, unitária, evanescente, 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela-palha, laminada, 2,0–3,5  $\mu\text{m}$  esp.; possui ornamentação na forma de depressões circulares (1-1,5  $\mu\text{m}$   $\emptyset$ ) e dão o aspecto de “**casca-de-laranja**” ao esporo.

A3: hialina, unitária, em torno de 0,5  $\mu\text{m}$  esp. Amarela em meio Melzer.

Paredes Internas: constam de dois grupos (B e C).

O grupo B está formado por duas camadas (B1 e B2).

B1: hialina, membranosa, flexível, 0,5  $\mu\text{m}$  esp.

B2: hialina, membranosa, flexível, 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  esp.

O grupo C está composto por duas camadas (C1 e C2).

C1: hialina, membranosa, flexível, 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  esp. Leve reação em meio Melzer, passando a apresentar coloração laranja a rosa.

C2: hialina, membranosa, semiflexível, 1,0-2,5  $\mu\text{m}$  esp. Forte reação em Melzer, passando a apresentar coloração laranja a rosa.

Murônimo: A(ULoU\*) B(MM) C(MM)

Comentários: No geral, houve boa correspondência entre os caracteres observados e os descritos por Morton (MORTON, 2005). A exceção foi a não visualização dos grânulos (“beads”) na camada C1, citado por estes autores.

## 7- *Acaulospora spinosa* C. Walker & Trappe

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-amarronzado.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 220–280  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: não observada.

Cicatriz: circular, 6,3-9,6  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Parede externa: Formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: amarela-palha, unitária, evanescente, 0,5–0,8  $\mu\text{m}$  de espessura.

A2: amarela-amarronzada, laminada, 6,4-9,3  $\mu\text{m}$  esp., ornamentada com pequenos **espinhos** em toda a superfície externa do esporo. Não apresentou reação em meio Melzer.

A3: amarela, unitária, 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  esp. Não se verificou reação em meio Melzer.

Paredes Internas: constam de dois grupos (B e C).

O grupo B está formado por uma camada (B1)

B1: hialina, membranosa, semiflexível, 0,5  $\mu\text{m}$  esp. Não apresentou reação em meio Melzer.

Grupo C está composto por duas camadas (C1 e C2)

C1: hialina, membranosa, <0,5  $\mu\text{m}$  esp. Leve reação em meio Melzer, passando a apresentar coloração amarela palha.

C2: amarela-escura, membranosa, semiflexível, 0,7-1,3  $\mu\text{m}$  esp. Coloração vermelha em Melzer.

Murônimo: A(ULoU\*) B(M) C(MM)

Comentários: Observa-se boa correspondência entre os caracteres observados e os descritos por Walker & Trappe (1981) (*apud* Schenck & Pérez, 1988) e Morton (2005).

Na descrição de Morton, a primeira parede interna possui duas camadas, mais ou menos

resistentes, que ficam geralmente unidas. Como não foi possível observá-las separadas uma da outra, nem individualizá-las sob microscópio, optou-se por descrever apenas uma camada.

**8- *Archaespora gerdemanii*** (S.L. Rose, B.A. Daniels & Trappe) J.B. Morton & D.

Redecker, com. nov.

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: hialino a branco.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 175–210  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: hialina, 100-120  $\mu\text{m}$  diâmetro.

Cicatriz: circular, cor amarela.

Os esporos estão formados por 2 grupos de paredes (externa e interna).

Parede externa: formada por três camadas (A1, A2 e A3).

A1: hialina no geral, porém amarela em esporos mais velhos, evanescente, unitária, 3,5-5,6  $\mu\text{m}$  esp

A2: hialina, semiflexível, 2,0 – 3,5  $\mu\text{m}$ . esp., que se separa em maior ou menor extensão da camada anterior, podendo ser considerada como parede interna.

A3: hialina, rígida 2,0 – 3,5  $\mu\text{m}$ . esp., que se separa em maior ou menor extensão da camada anterior, podendo ser considerada como parede interna.

Parede interna está formada por uma camada (B1)

B1: hialina, laminada, 2,5 – 3,5  $\mu\text{m}$ . esp.

Murônimo: A(E,U,U) B(L) ou A(E) B(B1,B2) C(C1)

Comentários: Morton & Redecker (2001) descrevendo esta espécie, citam que a mesma pode formar esporos com o morfotipo acaulosporóide ou com o morfotipo glomóide. Neste trabalho, os esporos visualizados apresentam as características do primeiro morfotipo. No entanto, neste artigo não há uma clara classificação das camadas quanto ao grupo a que pertencem. Morton, no *site* do INVAM (2005), evidencia a presença de três paredes externas e uma interna.

**9- *Archaeospora trappei*** (R.N. Ames & Linderman) J.B. Morton & D. Redecker

(Figura 2.4 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: hialino.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 56–78  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: hialina, subglobosa a irregular, 40x60 $\mu\text{m}$  (menor X maior distância).

Cicatriz: hialina, 6,5 – 8,2  $\mu\text{m}$  diâmetro.

Parede do esporo: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, unitária, semi-flexível, evanescente, 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  esp., contínua com a parede do pescoço da vesícula mãe.

A2: hialina, unitária, flexível, 1,0–1,2  $\mu\text{m}$  esp. Em meio Melzer apresenta cor amarela.

A3: hialina, laminada, flexível, 2,0-2,5  $\mu\text{m}$  esp., que se destaca com facilidade da camada anterior. Em meio Melzer apresenta cor amarela.

Murônimo: A(EUL)

Comentários: Boa concordância com as descrições de Morton & Redecker (2001) e INVAM (2005). No entanto, nestas referências, não existe definição da camada laminada (A3), embora nas fotos presentes no *site* do INVAM, pode-se verificar que esta camada possui espessura mais avantajada e indícios de laminações. Como o esporo é muito claro, não é possível afirmar que o fenótipo ocorra apenas por comparação. Como as outras duas espécies do gênero apresentam esta camada laminada, por correspondência, assume-se que houve esquecimento na hora de descrever a espécie, e as informações contidas estão incompletas.

**10- *Archaeospora* sp. (sp. nov.)**

(Figura 2.4 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-fosco.

Forma: subgloboso.

Diâmetro: 130–180  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: não observada.

Cicatriz: semicircular, 5 $\mu\text{m}$  no maior diâmetro, concolor ao espora, porém mais clara.

Parede do espora: formada por três camadas, que se separam com facilidade (A1, A2, A3).

A1: hialina, unitária, com detritos aderidos, porém mais rígida que uma camada tipicamente evanescente, 0,8-1,2  $\mu\text{m}$  esp.

A2: hialina, unitária, 1,5–2,2  $\mu\text{m}$  esp. Coloração rosa claro em meio Melzer.

A3: hialina, semiflexível, laminada, 2,0-2,5  $\mu\text{m}$  esp. Apresenta cor rosa em meio Melzer. Apresenta ornamentação em forma de gomos de bola de futebol. Essas ornamentações, no conjunto, dão ao espora o aspecto de uma carapaça de tartaruga.

Murônimo: A(EUL )

Comentários: Como se desconhece até o presente momento a existência de *Archaeospora* com ornamentação e com coloração rosa em meio Melzer é que se propõe a criação de um novo táxon.

**11- *Entrophospora infrequens* (I.R. Hall) R.N. Ames & R.W. Schneid. (Figura 2.5 A)**

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-amarronzado.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 116–145  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: hialina, 41–69  $\mu\text{m}$  diâmetro.

Cicatriz: visualizado uma cicatriz na superfície da parede externa, de forma irregular, amarronzada, 6,0 x 9,0  $\mu\text{m}$  (largura x comprimento) (larg. x comp.). Outra na superfície da parede interna, hialina, ovalada, 13 x 15  $\mu\text{m}$  (larg. x comp.).

Parede: Formada por quatro camadas (A1, A2, A3, A4).

A1: hialina, evanescente, 1,5–2,6  $\mu\text{m}$  esp., contínua com a parede do pescoço da vesícula-mãe.

A2: amarelo-amarronzada, 1,5-2  $\mu\text{m}$  esp., ornamentada com projeções em forma de “**grãos de milho**” com depressão central. Parede e ornamentação medem juntas 3,0–6,5  $\mu\text{m}$ .

A3: amarelo-amarronzada, unitária, flexível, nem sempre visualizada, 1,5  $\mu\text{m}$ .

A4: hialina, membranosa, flexível, 1,5–2,6 $\mu\text{m}$  esp., que se separa em maior ou menor extensão da camada anterior, podendo ser considerada como parede interna.

Murônimo: A(EUoU\*M) ou A(EUoU\*) B(M)

Comentários: A ornamentação presente nos esporos desta espécie facilita sua identificação, porém dificulta a análise das paredes internas. Ames & Schneider (1979) (*apud* Schenk & Pérez, 1988) descrevem esta espécie como tendo três paredes com uma camada em cada parede. INVAM (2005), no entanto, descreve a presença de uma só parede, composta por 4 camadas, sendo a última de natureza incerta, ou seja pode fazer parte da parede do esporo (considerado atualmente por Morton) ou ser uma parede interna, de ontogenia independente

**12- *Entrophospora schenckii* Sieverd. & S. Toro (Figura 2.5 B)**

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: hialino.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 54–71  $\mu\text{m}$ .

Vesícula-mãe: hialina a amarela, 36–62  $\mu\text{m}$  diâmetro.

Cicatriz: visualizado duas cicatrizes. Uma no ponto de inserção do pescoço da vesícula-mãe com o esporo, medindo 6,3-8,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Outra, no ponto de inserção do esporo com a hifa, medindo 18,8-20,6  $\mu\text{m}$ .

Parede externa: formada por duas camadas.

A1: hialina, evanescente, delgada, <1,0  $\mu\text{m}$  esp., contínua com a parede do pescoço da vesícula-mãe.

A2: hialina, unitária, rígida, <1,0  $\mu\text{m}$  esp. Apresenta cor amarela em meio Melzer.

Parede Interna: Formada por uma camada (B1)

B1: hialina, com espessura variando de 1,0–3,1  $\mu\text{m}$ .

Murônimo: A(EU) B(M)

Comentários: As características observadas nos esporos isolados no levantamento guardam melhor correspondência com as descritas por Sieverding & Toro (1987) (*apud* Schenk & Pérez, 1988), do que com as descritas em INVAM (2005), principalmente em relação ao número de paredes.

**13- *Gigaspora gigantea* (T.H. Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe**

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-palha.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 352–450  $\mu\text{m}$ .

Célula suspensoróide: concolor ao esporo ou mais clara, 47,0x 57,62  $\mu\text{m}$  larg.

Parede do esporo: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: amarela, unitária, rígida, 2,0-2,5  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela, laminada, 18,0-28,0  $\mu\text{m}$  esp.

A3: amarela-palha,  $\leq 0,5$   $\mu\text{m}$  esp. Observa-se presença de numerosas papilas germinativas delicadas em quase toda a superfície desta camada.

Murônimo: A(ULG)

Comentários: Boa concordância entre as características aqui observadas e as descrições de Bentivenga & Morton (1995), INVAM (2005) e Blaszkowski (2005).

**14- *Glomus aggregatum*** N.C. Schenck & G.S. Sm.

Ocorrência: esporos isolados.

Cor: amarelo-palha.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 50-125  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: concolor ao esporo, 5-6  $\mu\text{m}$  larg.

Parede do esporo: formada por um grupo de três camadas (A1, A2, A3).

A1: evanescente, unitária, semiflexível, <1,0  $\mu\text{m}$  esp.

A2: unitária, amarela, semiflexível, 1,5-2,0  $\mu\text{m}$  esp.

A3: laminada, amarela, 2,0-5,0  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: A(EUL)

Comentários: Nas descrições de Koske (1985) (*apud* Schenck & Pérez, 1988), Blaszkowski (2005) e INVAM (2005) esta espécie, além de esporos isolados no solo, pode apresentar agregados de esporos, tanto no solo como nas raízes. No entanto, foram observados apenas esporos solitários. Em Morton (MORTON, 2005) não há descrição da parede unitária (A2). No entanto, na descrição de Blaszkowski a mesma também está descrita, havendo total correspondência entre os caracteres avaliados.

**15- *Glomus aureum*** Oehl & Sieverd. (Figura 2.6 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-dourado.

Forma: subgloboso.

Diâmetro: 45-65  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: amarela-dourada; apresenta forte bifurcação junto ao esporo, 10,0-12,0  $\mu\text{m}$  larg. depois da bifurcação.

Parede do esporo: formada por duas camadas (A1, A2).

A1: hialina, evanescente, < 1.0  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela-dourada, laminada, 3,0-4,0  $\mu\text{m}$  esp., contínua com a parede da hifa de sustentação.

Murônimo: A(EL)

Comentários: Boa correspondência entre os caracteres observados e os descritos por Oehl et al. (2003).

**16- *Glomus brohultii*** Sieverd. & R.A. Herrera (Figura 2.6 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: marrom.

Forma: subgloboso a irregular.

Diâmetro: 95–120  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: hialina, com bifurcação no ponto de inserção ao esporo, 6-8  $\mu\text{m}$  larg.

Parede do esporo: formada por um grupo de duas camadas (A1, A2).

A1: hialina, evanescente, unitária, 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela-marrom, semi-rígida, laminada, 8–10  $\mu\text{m}$  esp. Presença de **perfurações** na camada, típicas desta espécie.

Murônimo: A(EL)

Obs.: As características observadas neste trabalho para *G. brohultii* apresentam boa correspondência com as descrições contidas em Herrera-Peraza et al. (2003).

**17- *Glomus caledonium*** (T.H. Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe (Figura 2.7 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-palha.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 180-215  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: concolor ao esporo, 9,0-16,0  $\mu\text{m}$  de largura.

Parede do esporo: formada por quatro camadas (A1, A2, A3, A4).

A1: hialina, evanescente, com 1,0–3,0  $\mu\text{m}$  esp.

A2: hialina, laminada, 1,8–3,4  $\mu\text{m}$  esp.

A3: subhialina, laminada 2,0-3,4  $\mu\text{m}$  esp. Quebra-se facilmente, apresentando interrupções na seqüência da parede.

A4: amarela, unitária, <1,0  $\mu\text{m}$ .

Murônimo: A(ELLU)

Obs.: Os esporos dessa espécie se parecem com esporos da espécie *G. claroideum*.

Porém, em maior aumento, a cor da hifa, o tamanho do esporo e a estrutura das camadas permitem diferenciá-los bem.

**18- *Glomus claroideum*** N.C. Schenck & G.S. Sm. (Figura 2.7 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-palha, quase hialino.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 75–121  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: hialina, reta ou, às vezes, recurvada, 5,0-6,5  $\mu\text{m}$  de largura.

Parede do esporo: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, evanescente, 0,8–3,1  $\mu\text{m}$  esp., contínua com a parede da hifa de sustentação.

A2: amarela-clara, laminada, 2,6–6,8  $\mu\text{m}$  esp.

A3: hialina, flexível, 2,2–3,1  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: A(ELU)

Comentários: A coloração clara e o tamanho do esporo, e a hifa fina e hialina facilitam a identificação dos esporos desta espécie. No entanto, observam-se diferenças na descrição de estrutura e no número das camadas da parede do esporo na literatura disponível. Na descrição original (Schenck & Smith, 1982 *apud* Schenck & Pérez, 1988) não há referências da presença das camadas evanescente nas superfícies externa. Nas descrições de Stürmer & Morton (1997) e do INVAM (2005), ao invés de uma camada evanescente, são descritas duas camadas intimamente unidas acima da laminada, ambas evanescentes. Além de verificar a presença de uma camada semi-flexível depois da camada evanescente, somente vista por ele, Blaszkowski (2005) também cita a presença de uma camada flexível após a camada laminada, também verificada neste trabalho.

**19- *Glomus constrictum*** Trappe (Figura 2.8 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: marrom-avermelhado.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 141 –183  $\mu\text{m}$  .

Hifa de sustentação: concolor ao esporo, forte **constricção** na base da hifa junto ao esporo, 6,0-7,0 na constricção e antes da constricção (na parte inchada da hifa) 15,4-16,5  $\mu\text{m}$  de largura.

Parede do esporo: formada por um grupo de duas camadas (A1, A2).

A1: hialina, evanescente, 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  esp.

A2: marrom-avermelhada, laminada, 4-6,25  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: A(E,L)

Obs.: A constricção da hifa de sustentação e a cor do esporo ajudam na identificação dos esporos desta espécie, apesar de que essa constricção não está presente em todos os esporos de *Glomus constrictum*. Existe divergências na literatura, no entanto, acerca da composição da parede celular desta espécie. Enquanto Schenck & Pérez (1988) citam a presença de somente uma camada laminada, Blaskowski (2005) adiciona uma camada evanescente anterior a laminada.

**20- *Glomus etunicatum*** W.N. Becker & Gerd.

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: marrom-avermelhado nos esporos mais jovens, e marrom nos esporos mais velhos.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 89–132  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: **hialina**, 8,5–11,9  $\mu\text{m}$  de largura.

Parede do esporo: formada por duas camadas (A1, A2).

A1: hialina, mucilaginosa, evanescente, 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  esp.

A2: marrom, laminada, 3,2–4,0  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: A(EL)

Comentários: Observou-se boa correspondência dos caracteres com a descrição original (Becker & Gerdemann, 1977 apud Schenck & Pérez, 1988) A camada laminada apresenta uma lâmina mais interna, com 0,8-1,2 $\mu\text{m}$  esp., e coloração mais clara, que sugere uma terceira camada. Stürmer & Morton (1997) observaram que em alguns esporos esta camada se separa ocasionalmente, assemelhando-se à camada interna flexível de *Glomus. claroideum*. No entanto, ao quebrar-se o esporo, esta não se separou do restante da camada. A coloração do esporo aliada à hifa fina de cor hialina facilita a identificação dos esporos desta espécie.

**21- *Glomus fasciculatum*** (Gerd. & Trappe) C. Waslker & Koske (Figura 2.8 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: Amarelo-palha.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 73–119  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: hialina, 6,5–9,8  $\mu\text{m}$  de largura.

Parede do esporo: formada por um grupo de três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, unitária, detritos aderidos, 0,8–1,4  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela-palha, laminada, 3,0–7,0  $\mu\text{m}$  esp.

A3: hialina a amarela, flexível, unitária, <1,0  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: A(U\*LU)

Comentários: As três camadas reagem em meio Melzer, apresentando coloração avermelhada. Na descrição de Walker & Koske (1987), que é a mais completa no manual de Schenck & Pérez (1988), há citação de reação ao Melzer apenas da camada mais interna. As descrições de Morton (MORTON, 2005) e de Blaszkowski (2005), relatam a reação para as camadas 1 e 2, embora Morton ressalte que embora não observada, ocorra. A primeira camada é de difícil determinação em relação à sua estrutura, pois apesar de ter um aspecto rígido como em paredes permanentes, como é classificada por Blaszkowski (2005), apresenta mucilagens e detritos aderidos, como em paredes evanescentes. Optou-se pela denominação de camada unitária neste trabalho, assim como a descreveram Schenck & Pérez (1988).

**22- *Glomus geosporum* (T.H. Nicol. & Gerd.) C. Walker**

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: castanho-avermelhado.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 120–175  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: amarela, 12-15  $\mu\text{m}$  de largura.

Parede do esporo: constituída de três camadas (A1, A2, A3).

A1: , hialina, evanescente, 0,5 $\mu\text{m}$  esp.

A2: marrom, laminada, 6,4-9,5  $\mu\text{m}$  esp.

A3: hialina, unitária, semi-rígida, 0,5  $\mu\text{m}$  esp. Essa é a camada que fecha o poro existente entre o esporo e a hifa de sustentação.

Murônimo: (ELU)

Comentários: Boa correspondência com as descrições contidas em Blaszkowski (2005), INVAM (2005) e Walker (1982) (*apud* Schenck & Pérez, 1988). A cor do esporo, a largura da hifa de sustentação, a espessura da parede e o septo membranoso são boas ferramentas para a identificação desta espécie.

**23- *Glomus hoi*** S.M. Berch & Trappe (Figura 2.9 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo.

Forma: subgloboso.

Diâmetro: 61-80  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: bastante **ramificada**, hialina, 10–12  $\mu\text{m}$  de largura. A parede da hifa apresenta coloração amarela e é espessa (2,5–2,8  $\mu\text{m}$ ).

Parede do esporo: formada por duas camadas (A1, A2).

A1: hialina, mucilaginosa, evanescente, 0,5  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela-escura, laminada, 4,0–5,0  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: A(EL)

Obs.: Berch & Trappe (1985) descreveram esta espécie como sendo composta por duas camadas, deixando subtendida a camada mais externa como evanescente, que, no entanto, é visível nas próprias fotos desta espécie presentes na referida publicação. As demais observações destes autores estão de acordo com o que foi observado neste trabalho.

**24- *Glomus intraradices*** N.C. Schenck & G.S. Sm (Figura 2.9 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo e em agrupamento.

Cor: amarelo-palha.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 90–120  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: concolor ao esporo, com 10–16  $\mu\text{m}$  larg., recurvada e ramificada.

Parede do esporo: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, mucilaginosa, evanescente, 1,0-1,5  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela-clara (difere acentuadamente da cor do restante do esporo), laminada, 2,4–5,0  $\mu\text{m}$  esp., contínua com a parede da hifa.

A3: amarela, unitária, <1,0  $\mu\text{m}$  esp. Contínua como parede da hifa

Murônimo: A(ELU)

Comentários: No geral houve boa correspondência com os caracteres descritos por Smith (1982) (*apud* Schenck & Pérez, 1988) e INVAM (2005).

**25- *Glomus macrocarpum*** Tul. & C. Tul. (Figura 2.10 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo, castanho-avermelhado.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 95–125  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: amarela-clara, 15–22  $\mu\text{m}$  larg.

Parede do esporo: formada por duas camadas (A1, A2).

A1: hialina, evanescente, semi-flexível, 0,6–0,9  $\mu\text{m}$  esp.

A2: castanha, laminada, 8,0–11,0  $\mu\text{m}$ .

Murônimo: A(EL)

Comentários: Observou-se boa concordância com as descrições de Berch & Fortin (1983) (*apud* Schenck & Pérez, 1988) e Blaszkowski (2005).

**26- *Glomus mosseae*** (T.H. Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe (Figura 2.10 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: amarelo-claro.

Forma: globoso.

Diâmetro: 137–187  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: amarela-clara, junto ao esporo apresenta forma de **funil**, 18–36  $\mu\text{m}$  de largura, próximo ao esporo. A camada mais interna da parede forma um septo curvo que penetra na hifa, e fecha o poro de comunicação citoplasmática.

Parede do esporo: formada por três camadas (A1, A2).

A1: hialina, evanescente, com 1,2–2,1  $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela, laminada, 2,1–3,2  $\mu\text{m}$  esp., contínua com a parede da hifa.

Murônimo: A(E,L)

Comentários: A forma afunilada da hifa junto ao esporo e o septo curvo facilitam a identificação da espécie. De modo geral, há boa correspondência com as descrições de Nicolson & Gerdemann (1968), Gerdemann & Trappe (1974), incluídas no manual de Schenck & Pérez (1988). Na descrição presente no *site* do INVAM (2005) há a descrição de três camadas, mas Morton salienta que a camada 2 parece não ser sintetizada em todos os esporos de um mesmo isolado, à semelhança do registrado aqui.

**27- *Glomus sinuosum*** (Gerd. & B.K. Bakshi) R.T. Almeida & N.C. Schenck

(Figura 2.11 A)

Ocorrência: em esporocarpos.

*Esporocarpo*

Cor: castanho-avermelhado.

Forma: subgloboso.

Diâmetro: 320– 430  $\mu\text{m}$  .

*Esporo*

Cor: amarelo-claro.

Forma: clavado.

Diâmetro: 30-40 x 60-70  $\mu\text{m}$  (larg. x comp.).

Hifa de sustentação: amarela clara, quase hialina, 2,5-6,0  $\mu\text{m}$  larg.

Parede do esporo: envolvida por uma densa camada de hifas cenocíticas (0,8-1,0 $\mu\text{m}$  esp.) do manto. Os esporos apresentam uma única parede, amarela-clara a castanha, com finas lâminas e 2,2–3,0  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: A(PL)

Comentários: A identificação de *G. sinuosum* é bastante fácil devido à trama sinuosa das hifas do manto e à forma dos esporos. Boa correspondência com a descrição original (Gerdemann & Bakshi, 1976 *apud* Schenck & Pérez, 1988), e as descrições de Morton em INVAM (2005).

**28- *Pacispora coralloidea* Sieverd. & Oehl (Figura 2.11 B)**

Ocorrência: esporo isolado no solo

Cor: hialino, amarelo-rosado

Forma: globoso a subgloboso

Diâmetro: 101 – 148 µm.

Hifa de sustentação: hialina, 6,3–12,5 µm larg. Em alguns esporos, a ornamentação da parede externa estende-se à parede da hifa.

Parede externa: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina a amarela, unitária, <1,0 µm esp., ornamentada com verrugas hialinas (3,0-4,0 µm diâm.), densamente agrupadas e distribuídas por toda a superfície do esporo, apresenta coloração amarela em meio Melzer.

A2: hialina, finamente laminada e fortemente aderida à primeira camada, 3,3–7,8 µm esp. Apresenta coloração amarela em meio Melzer.

A3: hialina, laminada, 0,6-1,0 µm esp. Apresenta coloração amarela em meio Melzer.

Parede interna: composta de três camadas (B1, B2, B3).

B1: hialina, membranosa, flexível, 0,5-1,0 µm esp.

B2: hialina, membranosa, flexível, 1,2-2,6 µm esp. Apresenta coloração alaranjada em meio Melzer.

B3: hialina, membranosa, flexível, <1,0 µm esp.

Murônimo: A(U<sub>o</sub>LL\*) B(MMM)

Comentários: Observou-se boa concordância com as descrições de Oehl & Sieverding (2004).

**29- *Pacispora dominikii* Sieverd. & Oehl (Figura 2.12 A)**

Ocorrência: esporo isolado no solo

Cor: branco

Forma: globoso a subgloboso

Diâmetro: 82–137  $\mu\text{m}$ .

Hifa de sustentação: coloração hialina, sem ornamentação, medindo 3,8–8,2  $\mu\text{m}$  de largura.

Parede externa: formada de três camadas (A1, A2, A3).

A1: branca, unitária, 0,8-1,2 $\mu\text{m}$  esp., ornamentada com verrugas hialinas (0,5–1,0  $\mu\text{m}$  larg.). Coloração amarela em reagente de Melzer.

A2: branca, laminada, 1,1–2,9  $\mu\text{m}$  esp. Coloração amarela em Melzer.

A3: hialina, unitária, 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  esp. Coloração amarela em Melzer.

Parede interna: composta por três camadas (B1, B2, B3).

Todas hialinas, membranosas, medindo juntas 2-2,5 $\mu\text{m}$  de espessura. A segunda camada tinge-se de amarelo forte em reagente de Melzer.

Murônimo: A(U<sub>o</sub>LU) B(MMM)

Comentários: As características morfológicas dos esporos de *Pacispora dominikii* são muito semelhantes aos de *P. coralloidea*. A diferença principal reside no tamanho da ornamentação, que na primeira espécie é menor. Com relação à descrição desta espécie contida em Oehl & Sieverding (2004), a única divergência diz respeito à coloração da parede interna em Melzer, que eles citam como púrpura e no presente trabalho verificou-se uma forte coloração amarela.

**30- *Paraglomus occultum*** (C. Walker) J.B. Morton & D. Redecker (Figura 2.12 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: hialino.

Forma: subgloboso.

Diâmetro: 51–60  $\mu\text{m}$  .

Hifa de sustentação: hialina, 4,3–5,2  $\mu\text{m}$  esp.

Parede do esporo: formada por três camadas (A1, A2, A3).

A1: hialina, evanescente, 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  esp.

A2: hialina a amarela-clara, rígida, unitária, 1,0-1,5  $\mu\text{m}$  esp. Amarela- clara em meio Melzer.

A3: branca, finas laminações, rígida, 0,4–0,9  $\mu\text{m}$  esp. Amarela-clara em meio Melzer.

Murônimo: A(EU\*L)

Comentários: Observou-se boa correspondência com a descrições de Morton & Redecker (2001) e INVAM (2005). A determinação da estrutura da camada A2 é difícil, pois ela é muito clara. Talvez, por esse motivo, não tenha sido observado as finas laminações desta camada citada pelos primeiros autores. Infelizmente, não há menção no *site* do INVAM (2005) com respeito ao caráter unitário ou laminado dessa camada, sendo denominada, somente, como camada permanente. Na chave de classificação para espécies de FMA em Schenck & Pérez(1988), quando os esporos dessa espécie ainda eram classificados como *Glomus occultum*, essa camada, quando presente, é caracterizada como unitária, assim como neste trabalho.

**31- *Scutellospora calospora*** (T.H. Nicol. & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders

(Figura 2.13 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: hialino.

Forma: globoso a oval.

Diâmetro :160-240 µm.

Célula suspensoróide: hialina, 22-30 µm larg.

Placa de germinação: não visualizada.

Paredes: dividem-se em três grupos (A, B, C).

Parede externa: composta por três camadas (A1, A2, A3)

A1: amarelo-palha, rígida, unitária, 1,0-1,2 µm esp.

A2: amarela-clara, laminada, 2,2-4,0µm esp.

Parede interna está formada por dois grupos de paredes (B e C)

Grupo B está formado por duas camadas (B1 e B2).

B1: hialina, membranosa, flexível, 0,5 µm esp.

B2: hialina, membranosa, flexível, 0,8-1,2µm esp

O grupo C está formado por duas camadas (C1, C2):

C1: hialina, membranosa, 1,5–3,0 µm esp.

C2: hialina, amorfa, , 2,5–6,2 µm esp. Apresenta coloração vermelho-escuro em meio Melzer.

Murônimo: A(UL) B(MM) C(MA)

Comentários: A camada C1 não apresentou reação em Melzer, que, segundo Morton (MORTON, 2005), pode ocorrer em alguns casos. No restante, houve boa correspondência entre os caracteres descritos por este autor e os verificados nesse trabalho. Em relação as descrições citadas por Koske & Walker (1986) (*apud* Schenck & Pérez, 1988), houve divergências no número de paredes, já que estes autores citam

apenas dois grupos de paredes. A estrutura das camadas destes dois grupos é semelhante ao que foi citado, acima, para as camadas dos grupos A e C, respectivamente.

**32- *Scutellospora heterogama*** (T.H. Nicol. & Gerd.) C. Walker & F.E. Sanders

(Figura 2.13 A)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: marrom-alaranjado.

Forma: globoso a subgloboso.

Diâmetro: 200- 250  $\mu\text{m}$ .

Célula suspensoróide: não visualizada.

Placa de germinação: circular, pouco mais escura que o resto do esporo, 22 – 28  $\mu\text{m}$  diâm.

Parede externa: divide-se em três camadas (A1, A2, A3).

A1: amarela, uinitária, rígida, 0,4 - 0,9  $\mu\text{m}$  esp., ornamentada com verrugas circulares e hialinas.

A2: amarela, laminada, 2,8 - 7,1  $\mu\text{m}$  esp.

A3: amarela, flexível, 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  esp.

Parede interna está formada por dois grupos de paredes (B e C)

Grupo B está formado por duas camadas (B1 e B2).

B1: hialina, membranosa, <0,5  $\mu\text{m}$  esp.

B2: hialina, membranosa, 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  esp.

Grupo C está formado por duas camadas (C1 e C2).

C1: hialina, membranosa, 0,6-1,1  $\mu\text{m}$  esp.

C2: hialina, membranosa, 0,5-1,0  $\mu\text{m}$  esp.

Murônimo: A(U<sub>o</sub>LM) B(MM) C(MM)

Comentários: Na descrição original de Nicolson & Gerdemann (1977) (*apud* Schenck & Pérez, 1988), há referência a dois grupos de paredes apenas. Provavelmente devido a proximidade das camadas do grupo B e C. Assim, é possível que os referidos autores tenham unido as camadas dos grupos B e C, em um único grupo. Morton (MORTON,

2005), ao contrário, cita a presença de três grupos de paredes a semelhança do observado neste trabalho. No geral, houve boa concordância entre os caracteres observados e os contidos na descrição de Morton (MORTON, 2005).

**33- *Scutellospora pellucida*** (Nicol. & Schenck) C. Walker & F.E. Sanders

(Figuras 2.14 A e 2.14 B)

Ocorrência: esporos isolados no solo.

Cor: hialino.

Forma: globoso a oval.

Diâmetro: 150-258  $\mu\text{m}$ .

Célula suspensoróide: amarela-palha, 24–28  $\mu\text{m}$  larg.

Placa de germinação: amarela-palha, irregular, 54x75  $\mu\text{m}$  larg.x comp.

Paredes: dividem-se em três grupos (A, B, C).

Parede externa: composta por três camadas (A1, A2, A3)

A1: hialina, rígida, unitária, 1,5– 2,0 $\mu\text{m}$  esp.

A2: amarela-clara, com finas laminações, 4,0-6,2 $\mu\text{m}$  esp. Vermelha em Melzer.

A3: hialina, unitária, flexível, 0,8-1  $\mu\text{m}$  esp.

Parede interna está formada por dois grupos de paredes (B e C)

Grupo B está formado por duas camadas (B1 e B2).

B1: hialina, membranosa, flexível, <1,0  $\mu\text{m}$  esp.

B2: hialina, membranosa, rugosa, flexível, 1,5-2,0 $\mu\text{m}$  esp

O grupo C está formado por duas camadas (C1, C2):

C1: membranosa, rugosa, hialina a amarelada, 1,5–2,0  $\mu\text{m}$  esp.

C2: unitária, membranosa, hialina a amarelada, 1,0–1,5  $\mu\text{m}$  esp. Coloração vermelha em Melzer.

Murônimo: A(UL) B(MM) C(MM)

Comentários: A estrutura dos grupos de paredes B e C é de difícil determinação, não tendo sido observado o caráter amorfo para a camada mais interna do grupo C, descrito por Koske & Walker (1986) (*apud* Schenck & Pérez, 1988) e Morton (MORTON, 2005). No restante, existe boa correspondência entre os caracteres.

Na continuação são apresentadas as figuras da maioria das espécies de FMA identificadas neste trabalho.

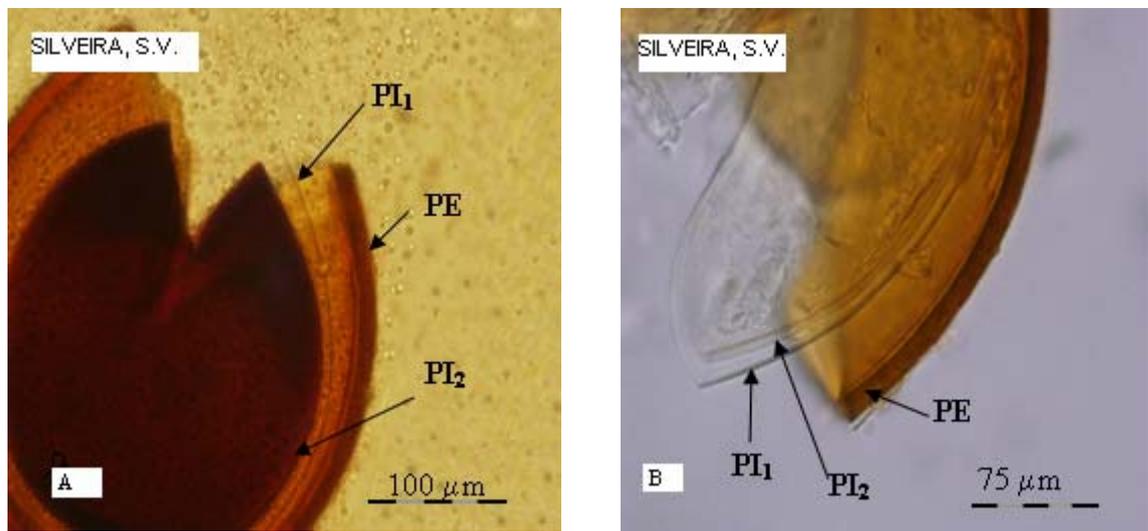


FIGURA 2.1 (A) Esporo de *Acaulospora capsicula*. PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um; PI<sub>2</sub>: parede interna dois. (B) Esporo de *Acaulospora laevis*. PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um; PI<sub>2</sub>= parede interna dois. Basiléia, Suíça. 2005.

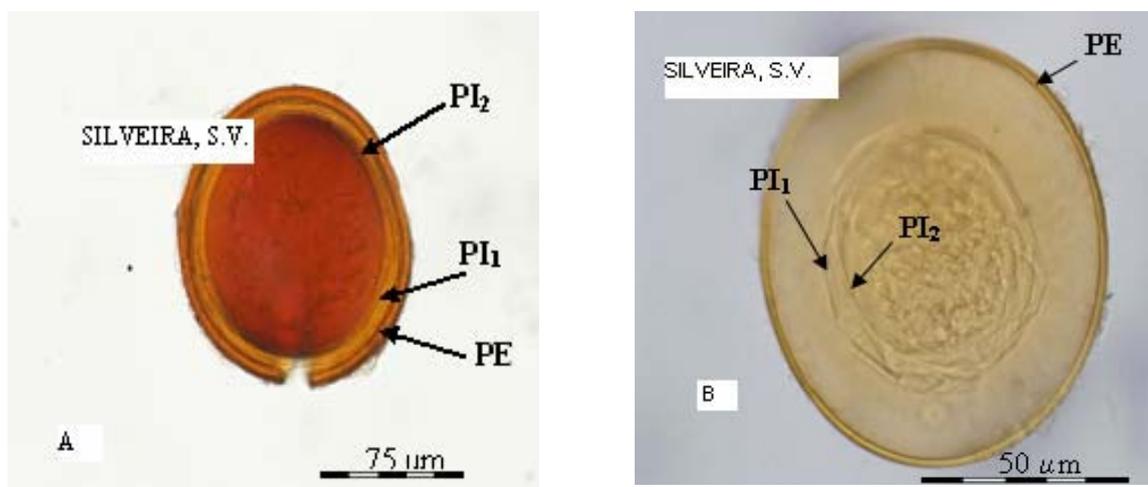


FIGURA 2.2 (A) Esporo de *Acaulospora mellea*. PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um; PI<sub>2</sub>: parede interna dois. Basel, Suíça. 2005. (B) Esporo de *Acaulospora morrowiae*. PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um; PI<sub>2</sub>: parede interna dois. Basiléia, Suíça. 2005.

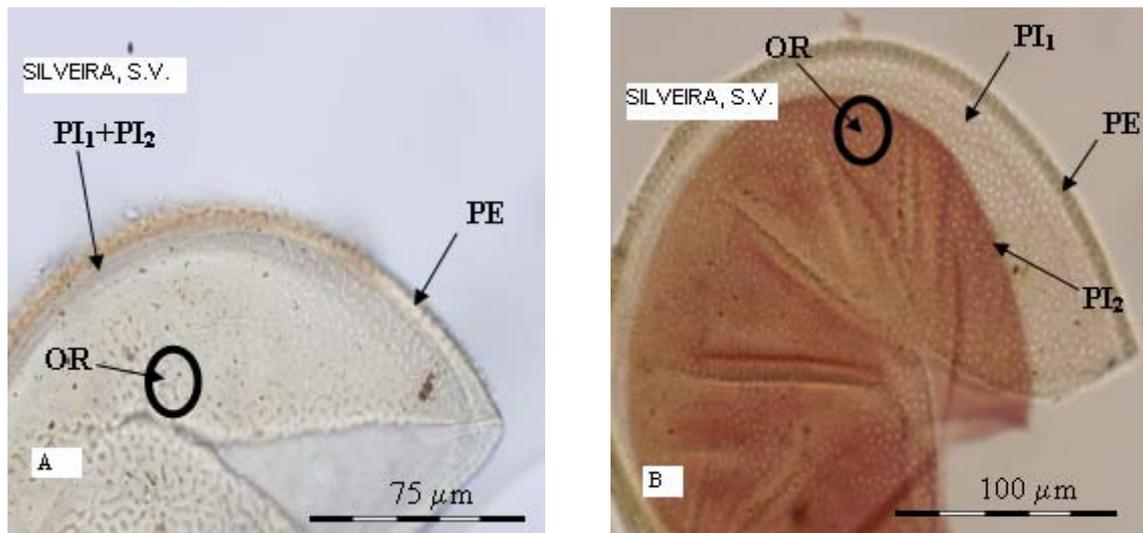


FIGURA 2.3 (A) Esporo de *Acaulospora rehmi*. PE= parede externa; PI<sub>1</sub>+PI<sub>2</sub>= parede interna um + parede interna dois; OR= Ornamentação. (B) Esporo de *Acaulospora scrobiculata*. PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um; PI<sub>2</sub>= parede interna dois; OR= Ornamentação. Basileia, Suíça. 2005.



FIGURA 2.4 (A) Esporo de *Archaeospora trappei*. PE= parede externa; VM= Vesícula mãe. (B) Esporo de *Archaeospora* sp. (Nov. esp.); PE= parede externa. Basileia, Suíça. 2005.

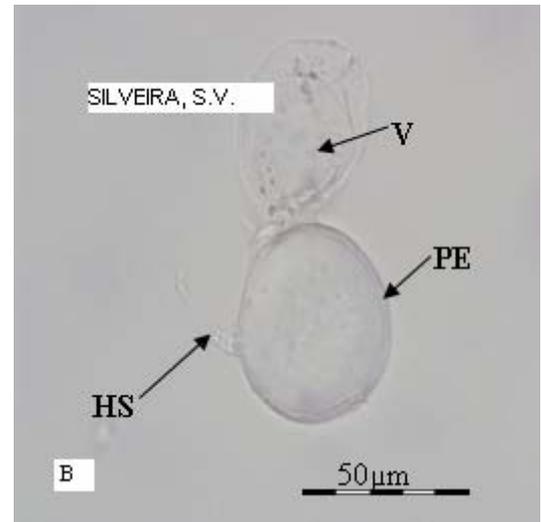
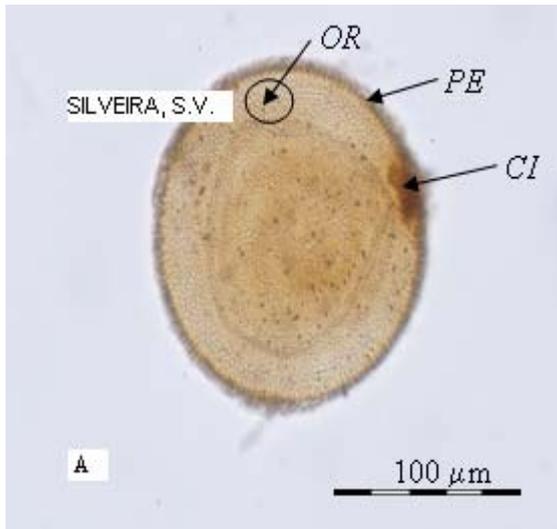


FIGURA 2.5 (A) Esporo de *Entrophospora infrequens*. PE= parede externa; PI= parede interna; OR= Ornamentação; CI= Cicatriz. (B) Esporo de *Entrophora schenckii*. PE= Parede externa; HS= Hifa de sustentação; VM= vesícula mãe. Basileia, Suíça. 2005.

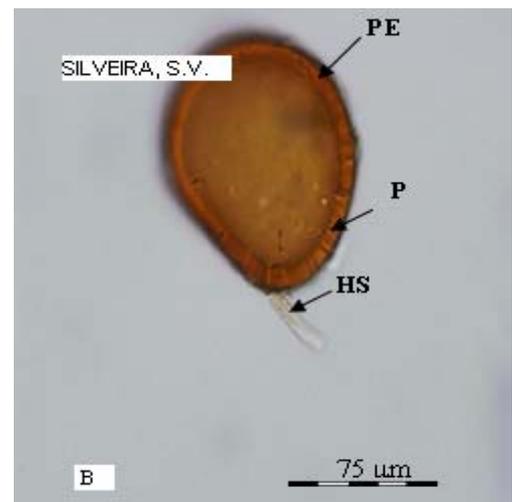


FIGURA 2.6 (A) Esporo de *Glomus aureum*. PE= parede do esporo; HS= Hifa de sustentação. (B) Esporo de *Glomus brohultii*. PE= parede do esporo; P= perfurações na parede; HS= Hifa de sustentação. Basileia, Suíça. 2005.



FIGURA 2.7 (A) Esporo de *Glomus caledonium*. PE= parede do espora. (B) Esporo de *Glomus claroideum*. PE= parede do espora; C<sub>1</sub>+C<sub>2</sub>= camada um + camada dois da parede do espora; C<sub>3</sub>= camada três da parede do espora. Basel, Suíça. 2005. Basileia, Suíça. 2005.

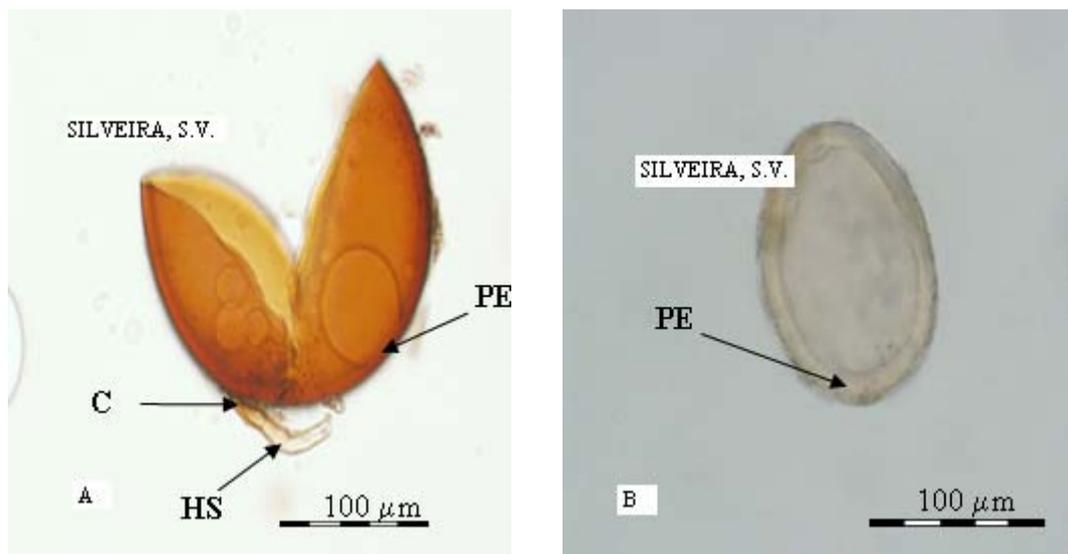


FIGURA 2.8 (A) Esporo de *Glomus constrictum*. PE= parede do espora; CO= constrição da hifa de sustentação; HS= hifa de sustentação. (B) Esporo de *Glomus fasciculatum*. PE= parede do espora. Basileia, Suíça. 2005.

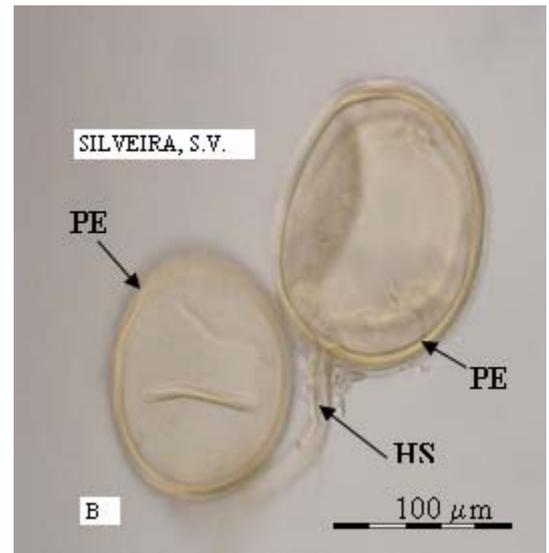
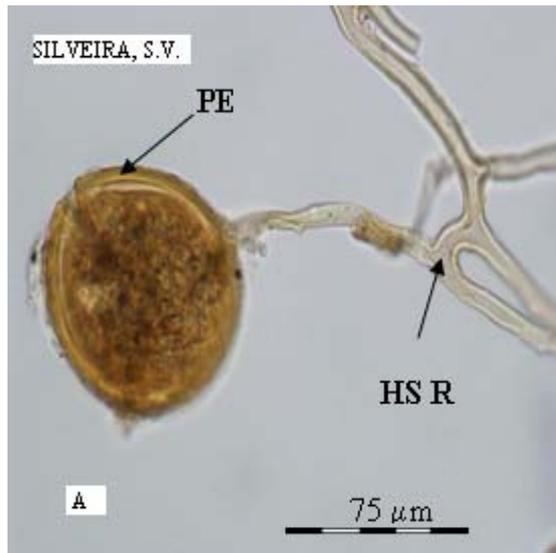


FIGURA 2.9 (A) Esporo de *Glomus hoi*. PE= parede do esporo; HS R= hifa de sustentação ramificada. (B) Esporo de *Glomus intraradices*. PE= parede do esporo. Basileia, Suíça. 2005.

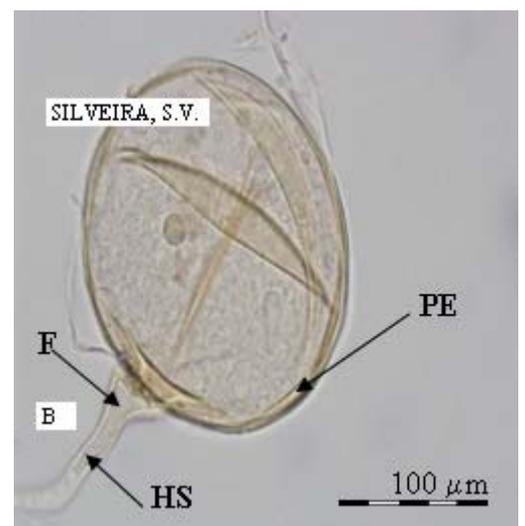
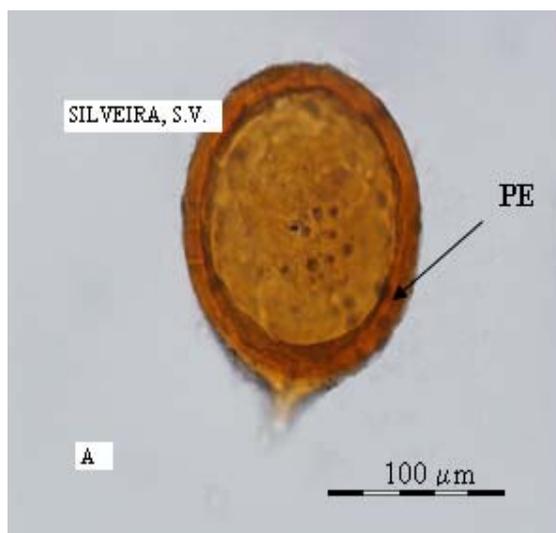


FIGURA 2.10 (A) Esporo de *Glomus macrocarpum*. PE= parede do esporo. Basel, Suíça. 2005. (B) Esporo de *Glomus mosseae*. PE= parede do esporo. F= funil da hifa de sustentação; HS= hifa de sustentação. Basileia, Suíça. 2005.

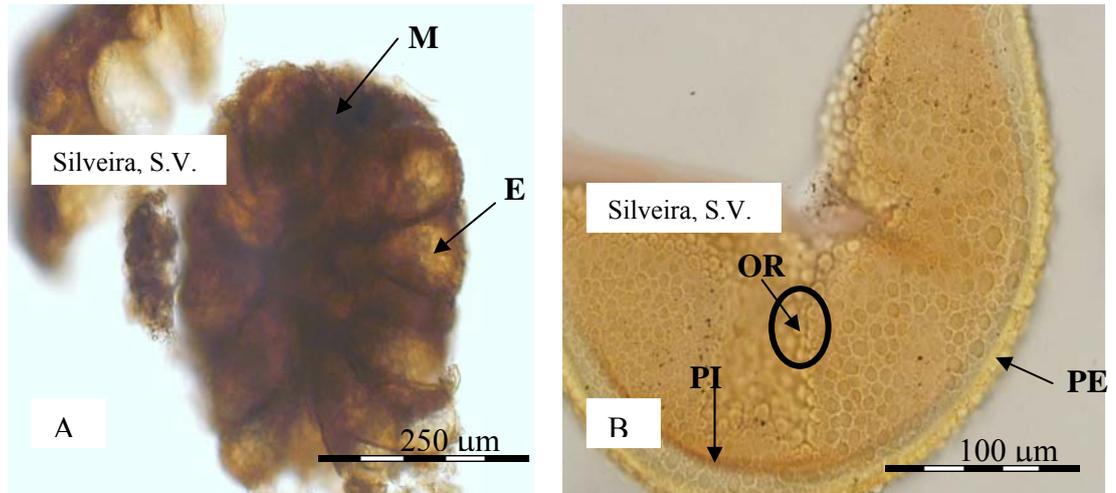


FIGURA 2.11 (A) Esporocarpo de *Glomus sinuosum*. M= manto de hifas cenocíticas que recobrem todo o esporocarpo; E= esporo. (B) Esporo de *Pacispora coralloidea*. PE= parede externa; PI= parede interna. Basileia, Suíça. 2005.

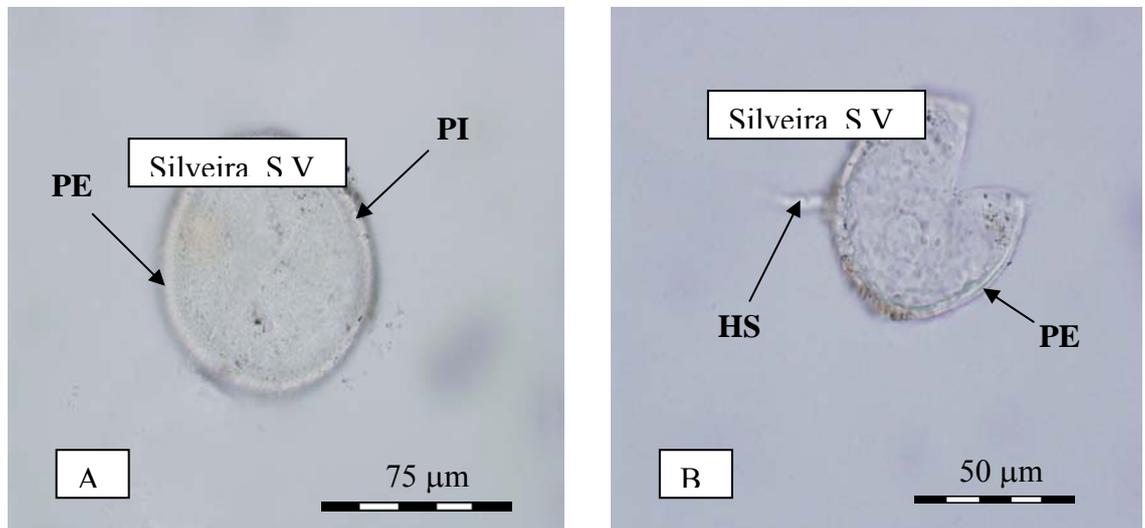


FIGURA 2.12 (A) Esporo de *Pacispora dominikii* PE= parede externa; PI= parede interna. (B) Esporo de *Paraglomus occultum*. PE= parede externa; HS= hifa de sustentação. Basileia, Suíça. 2005.

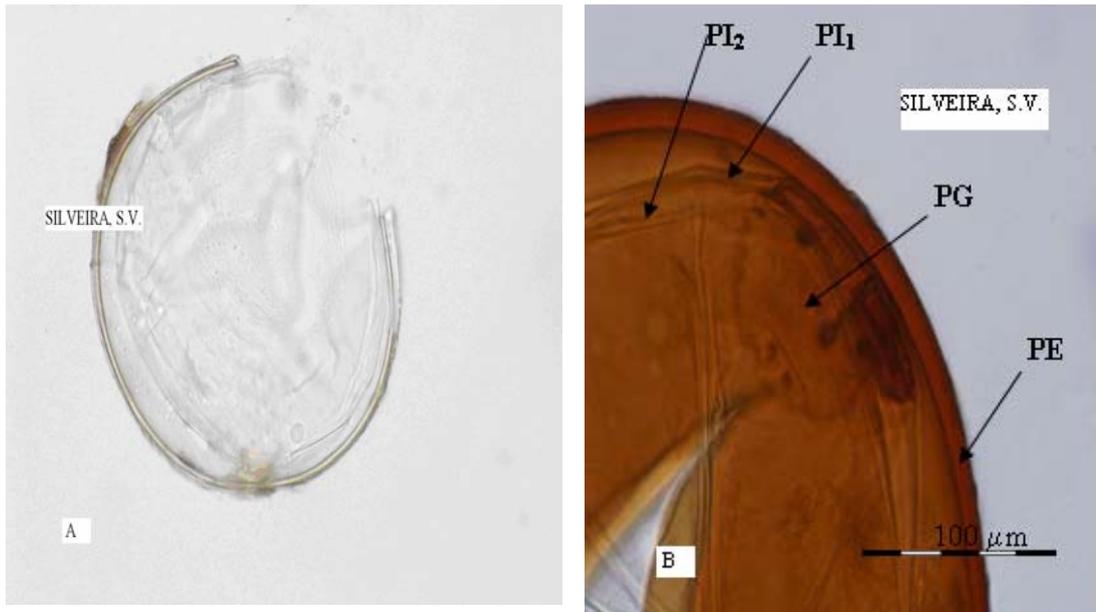


FIGURA 2.13 (A) Esporo de *Scutelospora calospora* PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um + parede interna dois. (B) Esporo de *Scutelospora heterogama*. PE= parede externa; PI<sub>1</sub>= parede interna um; PI<sub>2</sub>= parede interna dois; PG= placa de germinação. Basileia, Suíça. 2005.

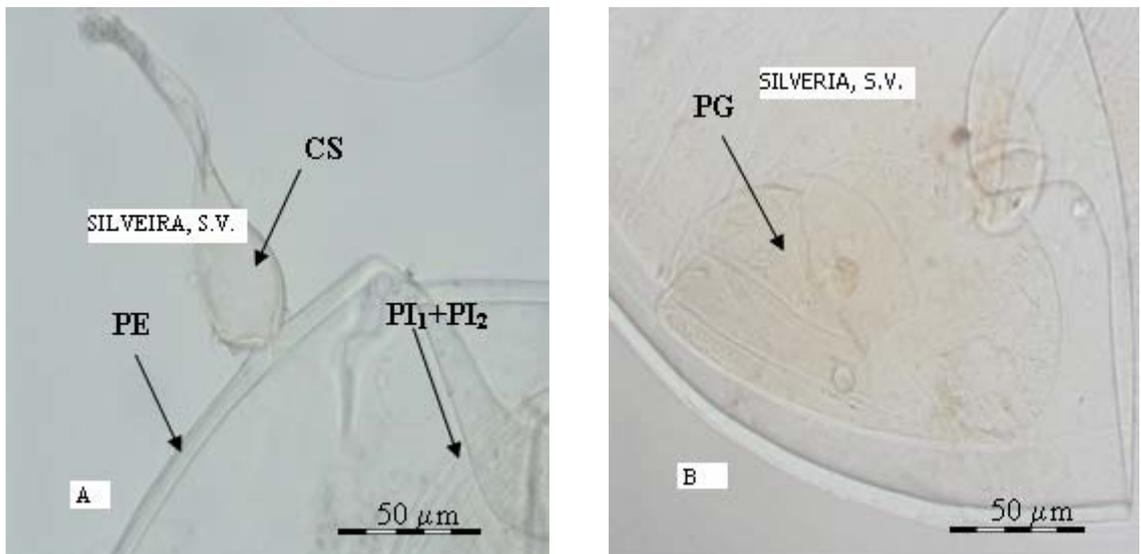


FIGURA 2.14 (A) Esporo de *Scutelospora pelucida*. PE= Parede Externa; PI<sub>1</sub> + PI<sub>2</sub>= parede interna um + parede interna dois; CS= célula suspensoróide. (B) Esporo de *Scutelospora pelucida*. PG= placa de germinação. Basileia, Suíça. 2005.

As 33 espécies identificadas, com média de 14 espécies por município amostrado, denotam a grande riqueza de espécies presentes nos parreirais da Serra Gaúcha. Devido a isso, fez-se necessário a utilização das duas linhas principais de caracterização taxonômica de FMA, presentes em Morton (2005) e em Schüßler *et al.* (2001), além da consulta de outras fontes bibliográficas (Schenck & Perez, 1988; Oehl & Sieverding, 2004) pois algumas espécies, como as do gênero *Pacispora* e do gênero *Glomus* (*G. aureum*, *G. brohultii*, *G. hoi*), identificadas neste trabalho, ainda não estão descritas nestas duas principais correntes taxonômicas.

Também, a identificação de uma nova espécie do gênero *Archaeospora* (Figura 2.4 B) reforça a importância deste trabalho e aumenta ainda mais as opções futuras que as espécies autóctones de FMA de parreirais da Serra Gaúcha propiciaram na inoculação de porta-enxertos de videira, no sentido de obter-se plantas mais adaptadas a esta região e com um grau maior de resistência às moléstias.

Se por um lado a riqueza de fertilidade dos solos amostrados (Tabela 2.1) não influenciou negativamente no número de espécies e de gêneros de FMA por área amostrada (Tabela 2.5), por outro, a mesma é a causa mais provável para o baixo número de esporos por espécie verificado (Tabela 2.5), já que em condições de elevada fertilidade a micorrização e a germinação de esporos é inibida (Siqueira & Franco, 1988; Allen, 1991). Dessa forma, o fato de realizar-se a caracterização taxonômica de espécies isoladas diretamente de solos rizosféricos, aliado ao baixo número de esporos por espécie de FMA presentes nas amostras, dificultou muito o trabalho de identificação morfológica das mesmas, tornando imprescindível a colaboração de taxonomistas experientes (Fritz Oehl e Ewald Sieverding) na realização deste estudo.

### 2.3.5 Caracterização molecular: seqüenciamento do DNA de esporos

Das 18 espécies de FMA presentes nos cultivos armadilhas, foi possível isolar esporos em condições apropriadas para realizar-se a amplificação do DNA por PCR de 14 espécies (*Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum*, *Glomus intraradices*, *Glomus constrictum*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus geosporum*, *Glomus claroideum*, *Glomus caledonium*, *Pacispora dominikii*, *Paraglomus occultum*, *Entrophospora infrequens*, *Entrophospora shenkii*, *Acaulospora laevis*, *Acaulospora mellea*). Esta amplificação de DNA por PCR permitiu a posterior obtenção de seqüências de 7 espécies de FMA (*Glomus mosseae*, *Glomus etunicatum*, *Glomus caledonium*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus constrictum*, *Glomus intraradices*, *Acaulospora laevis*), sendo que para a espécie *Glomus mosseae* foram obtidas seqüências de dois isolados: uma do município de Farroupilha e outra do município de Bento Gonçalves.

O principal motivo pelo qual ainda não é possível obter as seqüências de todas as espécies encontradas é que não se dispõe de *primers* específicos que amplifiquem DNA para todas as espécies de FMA, motivo pelo qual tentou-se a construção de *primers* específicos para espécies do gênero *Paraglomus* e *Archaeospora*. No entanto, o tempo de estágio não foi suficiente para se obterem tais resultados. Por outro lado, é comum esporos de FMA não amplificarem por PCR em virtude de não encontrar-se no estadio de desenvolvimento apropriado. Nesse sentido, também seria necessário mais tempo de trabalho, pois com isso ter-se-ia a oportunidade de obter esporos da mesma espécie em diferentes estadios de desenvolvimento e, assim, aumentar consideravelmente a probabilidade de amplificar seus respectivos DNAs.

As percentagens de similaridade das seqüências obtidas com a presente na base de dados NCBI são, 79% para *Glomus etunicatum* (Isolado Caxias do Sul), 98% para *Glomus mosseae* (Isolado Farroupilha), 99% *Glomus mosseae* (Isolado Bento Gonçalves), 97% para *Glomus constrictum* (Isolado Farroupilha), 99% para *Glomus*

*fasciculatum* (Isolado Caxias do Sul), 99% para *Glomus caledonium* (Isolado Nova Pádua), 95% para *Glomus intraradices* (Isolado Bento Gonçalves), 97 % para *Acaulospora laevis* (Isolado Nova Pádua).

O alinhamento das seqüências de nucleotídeos da região rDNA 18S AM1-NS31 de parte das espécies em estudos estão mostradas na Figura 2.15.

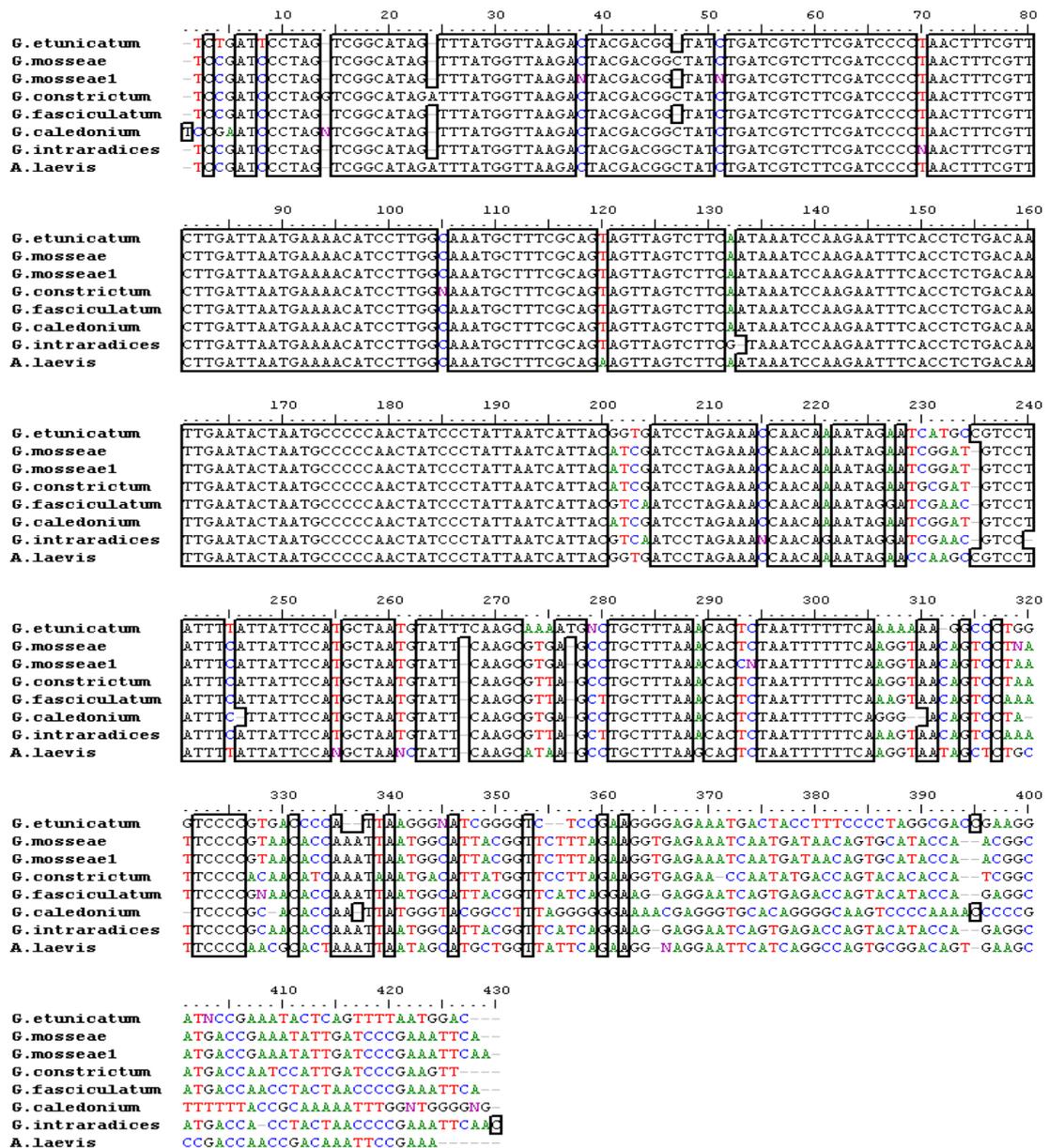


FIGURA 2.15 Alinhamento múltiplo das seqüências das espécies de FMA realizado através do programa CLUSTALW (1.83), por similaridade. Seqüências coloridas indicam regiões que não apresentam homologia devido a substituições de bases. Regiões com gap (-) indicam regiões com inserções ou deleções de bases. *Glomus mosseae1* (Isolado Bento Gonçalves). Granada, Espanha, 2005.

É possível observar várias regiões coloridas onde não ocorre homologia de seqüências, sendo estas as regiões responsáveis pela variabilidade genética e que permitem a distinção entre as espécies de FMA (Figura 2.15).

A partir do alinhamento múltiplo realizado pelo programa ClustalW foi construída a árvore filogenética utilizando o método da máxima parcimônia (Figura 2.16).

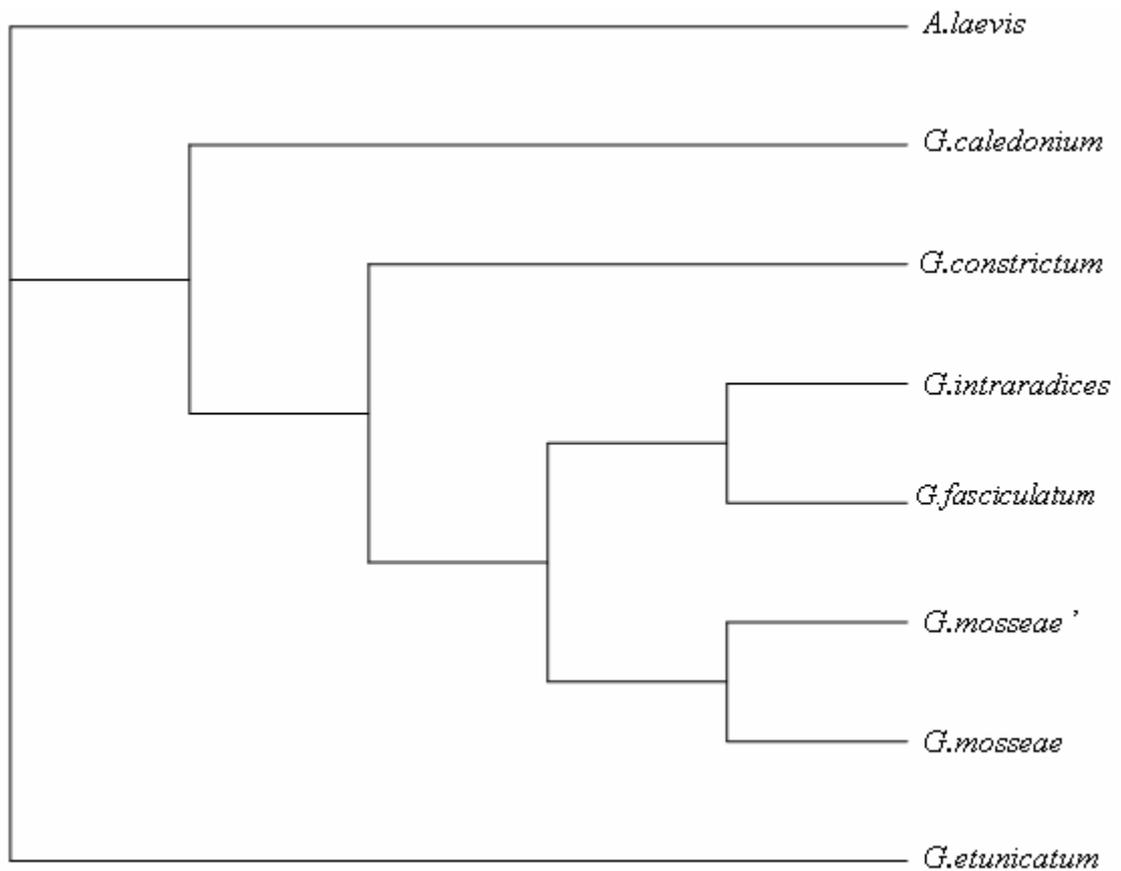


FIGURA 2.16 Árvore filogenética entre as espécies de FMA construída através do método da máxima parcimônia, pelo programa ClustalW. *Glomus etunicatum* (Isolado Caxias do Sul), *Glomus mosseae'* (Isolado Farroupilha), *Glomus mosseae* (isolado Bento Gonçalves), *Glomus constrictum* (Isolado Farroupilha), *Glomus fasciculatum* (Isolado Caxias do Sul), *Glomus caledonium* (Isolado Nova Pádua), *Glomus intraradices* (Isolado Bento Gonçalves), *Acaulospora laevis* (Isolado Nova Pádua). Granada, Espanha. 2005.

TABELA 2.7 Índices de similaridade entre as seqüências de rDNA 18S de FMA, calculados através do programa ClustalW. Granada, Espanha. 2005.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	-	0,78	0,77	0,76	0,77	0,75	0,76	0,77
2	0,78	-	0,98	0,93	0,93	0,80	0,92	0,82
3	0,77	0,98	-	0,92	0,92	0,79	0,91	0,80
4	0,76	0,93	0,92	-	0,90	0,74	0,89	0,85
5	0,77	0,93	0,79	0,90	-	0,74	0,98	0,86
6	0,75	0,80	0,91	0,74	0,74	-	0,72	0,67
7	0,76	0,92	0,91	0,89	0,98	0,72	-	0,84
8	0,77	0,82	0,91	0,85	0,86	0,67	0,84	-

1= *Glomus etunicatum* (Isolado Caxias do Sul), 2= *Glomus mosseae* (Isolado Farroupilha), 3= *Glomus mosseae* isolado (Bento Gonçalves), 4= *Glomus constrictum* (Isolado Farroupilha), 5= *Glomus fasciculatum* (Isolado Caxias do Sul), 6= *Glomus caledonium* (Isolado Nova Pádua), 7= *Glomus intraradices* (Isolado Bento Gonçalves), 8= *Acaulospora laevis* (Isolado Nova Pádua).

Na Figura 2.16 e Tabela 2.7 observa-se que as espécies *Glomus intraradices*, *Glomus fasciculatum*, *Glomus mosseae*, *Glomus constrictum* e *Glomus caledonium* estão mais próximas, a exemplo do que obtiveram Schüßler et al. (2001), que dividiram as espécies do Gênero *Glomus* em três diferentes grupos (A, B e C) e agruparam estas espécies dentro do grupo A. *Glomus constrictum*, no entanto, não é citada no referido trabalho e, portanto, seus resultados não podem ser comparados.

O maior afastamento da espécie *Acaulospora laevis* das outras espécies já era esperado por ser esta uma espécie pertencente a outro gênero de FMA e por estar, de acordo com Schüßler et al. (2001), mais distanciada das espécies do grupo A, em relação as espécies dos grupos B e C. Outro ponto em comum com este trabalho é o maior distanciamento da espécie *Glomus etunicatum* das outras espécies do gênero *Glomus*, pois Schüßler et al. (2001) agruparam-na no grupo B ou C. O fato dos dois isolados de *Glomus mosseae* manterem-se próximos na árvore revela que a região seqüenciada, rDNA 18S AM1-NS31 da sub-unidade menor 18S, é conservada à nível de isolados de uma mesma espécie.

### 2.3.6 Caracterização molecular: PCR-TTGE do rDNA de raízes colonizadas por FMA

A Figura 2.17 mostra a análise por TTGE da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 de FMA oriundos das raízes de trevo (*Trifolium repens*) e sorgo (*Sorghum vulgare*), inoculados com solos rizosféricos oriundos dos municípios de Bento Gonçalves (Coluna 1), Caxias do Sul (Coluna 2), Nova Pádua (Coluna 3), Farroupilha (Coluna 4) e Garibaldi (Coluna 5). Também mostra a análise por TTGE da região 18S rDNA NS31-NS41 de esporos de FMA. *Glomus mosseae* (Coluna 6), *Paraglomus oculatum* (Coluna 7), *Pacispora dominikii* (Coluna 8), *Entrophospora infrequens* (Coluna 9), *Entrophospora schenkii* (Coluna 10), *Glomus etunicatum* isolado Caxias do Sul (Coluna 11), *Glomus etunicatum* isolado Bento Gonçalves (Coluna 12).

Observa-se que, à exceção das amostras de raízes de sorgo e trevo colonizados por solo rizosférico de parreirais de Bento Gonçalves (Coluna 1), as amostras de raízes das culturas armadilhas estavam colonizadas por FMA (Coluna 2 a Coluna 5). Como várias espécies de FMA presentes na amostra de Bento Gonçalves reproduziram novos indivíduos, deduz-se que essas espécies colonizaram o sistema radicular das plantas cultivadas em vasos, mas por algum problema com reagentes seu DNA não amplificou.

As outras quatro amostras de DNA de raízes colonizadas por FMA (Caxias do Sul, Nova Pádua, Farroupilha e Garibaldi) e amplificadas por PCR apresentaram mais de uma banda cada. Esse efeito tanto pode ser devido a suas raízes estarem colonizadas por mais de uma espécie de FMA (cada banda sendo representativa de uma espécie) ou devido ao polimorfismo que os FMA apresentam (uma espécie do fungo originando várias bandas), ou, ainda, amplificação de regiões de DNA da planta similares aos do fungo.

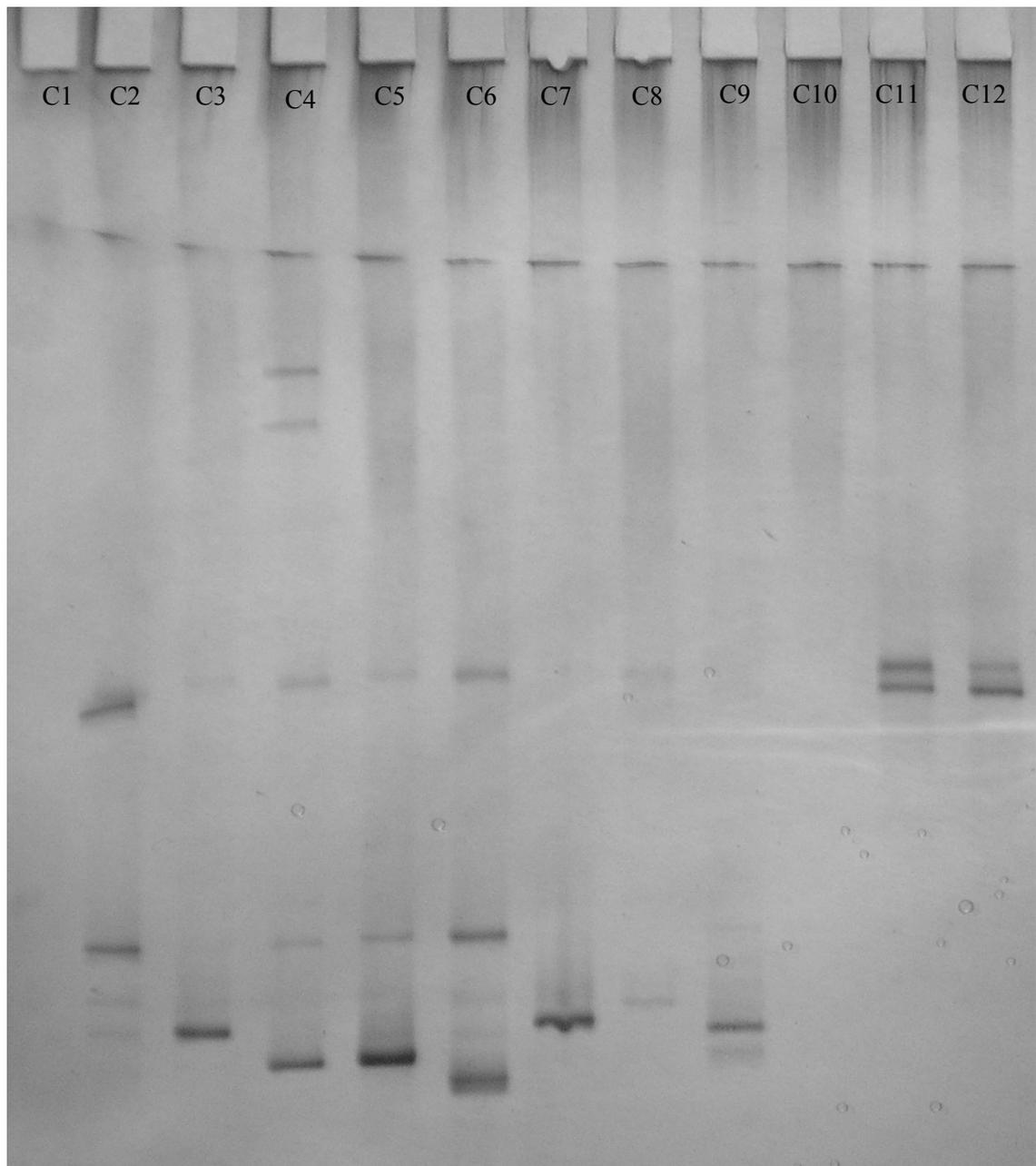


FIGURA 2.17 Análise por TTGE da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 de FMA colonizando raízes de trevo (*Trifolium repens*) e sorgo (*Sorghum vulgare*). Coluna 1 a Coluna 5, refere-se a análise de raízes inoculadas com solo rizosférico de Bento Gonçalves (Coluna 1), Caxias do Sul (Coluna 2), Nova Pádua (Coluna 3), Farroupilha (Coluna 4), e Garibaldi (Coluna 5). Coluna 6 a Coluna 12, refere-se a análise por TTGE da região 18S rDNA NS31-NS41 de esporos de FMA. *Glomus mosseae* (Coluna 6), *Paraglomus ocutum* (Coluna 7), *Pacispora dominikii* (Coluna 8), *Entrophospora infrequens* (Coluna 9), *Entrophospora schenkii* (Coluna 10), *Glomus etunicatum* isolado Caxias do Sul, (Coluna 11), *Glomus etunicatum* isolado Bento Gonçalves (Coluna 12). Granada, Espanha. 2005.

A análise da Figura 2.17 foi realizada, pela primeira vez neste trabalho, com o intuito de testar previamente a potencialidade do método na caracterização molecular dos FMA. Não havia, no entanto, esporos viáveis na época para proceder a amplificação do DNA dos mesmos com primers específicos. No sentido de testar o método também para geração de *fingerprints* de DNA de esporos, aproveitou-se os produtos disponíveis da amplificação do rDNA de esporos de FMA com *primers* universais, que vinham sendo obtidos em uma das etapas do trabalho de seqüenciamento desses esporos. Trabalho este, realizado em paralelo.

Portanto, na figura 2.17 a análise do perfil molecular através dos esporos não é confiável, pois não foi obtida a partir de *primers* específicos de FMA, podendo a resposta ser atribuída a amplificação do DNA de algum microrganismo contaminante. No entanto, a análise demonstra a potencialidade do método em gerar padrões moleculares diferenciados entre cada amostra, à exceção das colunas C11 e C12, referentes às análises moleculares de dois isolados de *Glomus etunicatum*, onde os perfis moleculares similares indicam que, nestes casos, a amplificação foi do DNA ribossômico dos esporos e não de contaminantes.

Importante salientar que, no caso do material genético analisado nas raízes (cinco primeiras colunas), utilizaram-se primers específicos de FMA e, portanto, os padrões moleculares obtidos para estas amostras podem ser atribuídos ao DNA de fungos micorrízicos arbusculares.

Devido a este problema, a análise foi repetida quando se obtiveram novos esporos de FMA, procedendo-se a amplificação rDNA dos mesmos com primers específicos para FMA (NS31GC-Glo1), juntamente com a amplificação do rDNA das raízes, também com *primers* específicos (NS31GC-Glo1) (Figura 2.18).

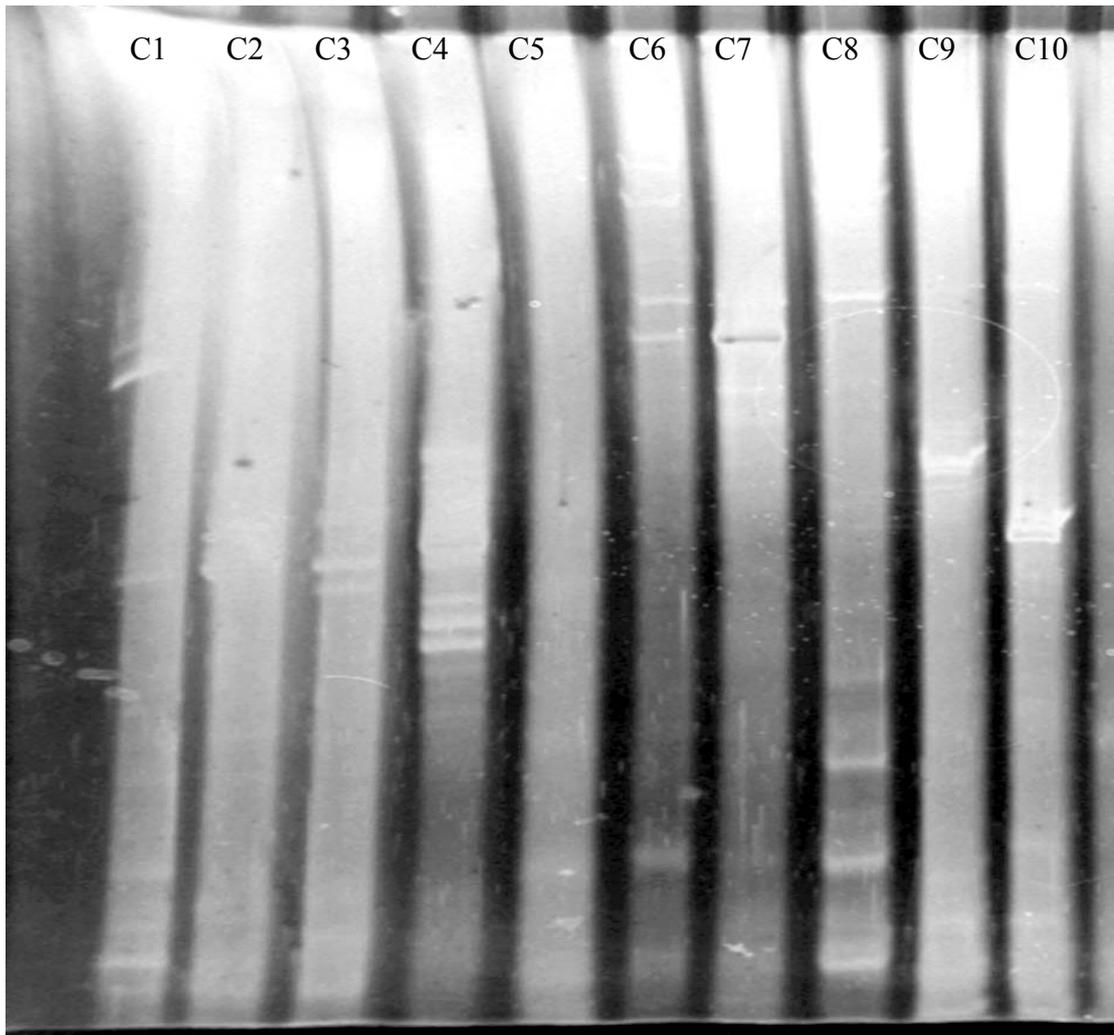


FIGURA 2.18 Análise por TTGE da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 de FMA colonizando raízes de trevo (*Trifolium repens*) e sorgo (*Sorghum vulgare*). Coluna 1 a Coluna 4 (da esquerda para direita) refere-se a análise de raízes inoculadas com solo rizosférico, Caxias do Sul (Coluna 1), Nova Pádua (Coluna 2), Farroupilha (Coluna 3), Garibaldi (Coluna 4). Coluna 5 a Coluna 10, refere-se a análise por TTGE da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 de esporos de FMA. *Entrophospora schenkii* (Coluna 5), *Glomus constrictum* (Coluna 6), *Glomus mosseae* (Coluna 7), *Acaulospora laevis* (Coluna 8), *Glomus fasciculatum* (Coluna 9), *Glomus etunicatum* (Coluna 10). Granada, Espanha. 2005.

Nessa nova análise de TTGE (Figura 2.18) o produto de PCR de rDNA extraído das raízes da amostra de Bento Gonçalves não foram carregados no gel, já que havia apresentado problema na análise anterior (Tabela 3). Também, as espécies de FMA para as quais se obteve produto de PCR do rDNA de esporos foram diferentes dos

utilizados anteriormente, à exceção de *Glomus etunicatum* e *Entrophospora schenkii*. Além destas, utilizaram-se nesta nova análise as espécies *Glomus constrictum*, *Glomus mosseae*, *Acaulospora laevis* e *Glomus fasciculatum*.

A similaridade do perfil molecular do esporo com o perfil das raízes, dada pela mesma posição da banda no gel de poliacrilamida, indica as espécies que estão colonizando as respectivas raízes. A Figura 2.18, no entanto, permite observar uma baixa similaridade no perfil molecular dos esporos e das raízes. Somente a posição de duas bandas geradas a partir do rDNA de esporos de *Glomus constrictum*, coluna 6, e *Acaulospora laevis*, coluna 8, coincidiram com a posição de duas bandas geradas no município de Caxias do Sul, coluna 1. A baixa similaridade entre o perfil molecular dos esporos e das raízes indica que a análise por PCR-TTGE da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 das raízes requer um aperfeiçoamento pois é provável que esteja amplificando rDNA da planta juntamente com o rDNA dos FMA.

Para a análise molecular dos esporos, no entanto, a técnica possibilita uma avaliação mais precisa dos resultados obtidos, na medida em que não há competição entre o DNA da planta e do fungo pelo sítio de anelamento com os *primers* e, portanto, as bandas obtidas podem ser atribuídas à espécie analisada, pois se estão utilizando *primers* específicos para FMA. A utilização de outros *primers*, também específicos para FMA, mas que amplifiquem outras regiões do DNA dos fungos micorrízicos, como as da subunidade maior do ribossomo 28S, é uma das alternativas viáveis a serem testadas no futuro para a análise molecular por PCR-TTGE de raízes colonizadas por FMA. O motivo pelo qual a maior parte dos trabalhos de análise molecular em FMA restrinja-se a subunidade menor 18S (Cornejo et al., 2004; Schüßler et al., 2001), é que essa parece ser uma região mais conservada do que a subunidade maior 28S. No entanto, Rodriguez et al. (2001) e Gollotte et al. (2004) trabalharam com a sub-unidade

ribossomal maior 28S em FMA e obtiveram seqüências de algumas espécies dos gêneros *Glomus*, *Acaulospora* e *Scutellospora*, as quais podem ser utilizadas para a construção de novos primers específicos de FMA.

Os produtos de PCR da região 18S rDNA NS31GC-Glo1 da maioria dos esporos produziram mais de uma banda por espécie, ratificando o caráter polimórfico dos FMA, já citado na literatura (Allen, 1991, Kuhn, 2001; Pavloska & Taylor, 2004).

A grande variabilidade genética que apresentam os FMA é atribuída, normalmente, a anastomose entre hifas de espécies distintas de FMA que ocorre no solo. Como as hifas de FMA não são septadas, há troca de núcleos entre espécies diferentes, fazendo com que as células de FMA contenham centenas de núcleos. No entanto, dois modelos são utilizados para explicar a variação genética em FMA: primeiro, a variabilidade genética é devida a heterocariose, isto é, a coexistência de muitos núcleos diferentes na mesma célula; segundo, que pode ser chamada de homocariose, a variabilidade está dentro de cada núcleo e os núcleos são idênticos entre si (Pavloska & Taylor (2004). A primeira hipótese implica em que o fungo mantém um conjunto estável de diferentes genomas durante seu ciclo de vida e o transmite de geração a geração. A hipótese alternativa da homocariose envolve o conceito de co-evolução do rDNA de uma estirpe.

Co-evolução é um fenômeno universal responsável pela homogeneização de seqüências repetitivas dentro do rDNA, através da recombinação. Pavloska & Taylor (2004) estudando a transmissão de núcleos entre populações de FMA, chegaram à conclusão de que a transmissão de núcleos é baixa e que mutações não são transmitidas de geração a geração, sendo favorável, portanto, a teoria da homocariose. Kuhn et al. (2001), no entanto, utilizando-se da técnica de hibridização *in situ* (DNA-DNA) deduziram que núcleos geneticamente diferentes co-existem em um fungo micorrízico

individual.

Devido a esse polimorfismo e aos poucos dados de perfis moleculares gerados por PCR-TTGE na literatura disponível (Cornejo, et al. 2005) é aconselhável a utilização conjunta do seqüenciamento do rDNA de FMA e da análise PCR- TTGE do rDNA destes fungos, para a obtenção de uma melhor caracterização molecular das espécies de FMA.

## 2.4 CONCLUSÕES

Existe um grande número de espécies e de gêneros de FMA nos parreirais da Serra Gaúcha.

Além de espécies já descritas na literatura, este trabalho permitiu a identificação de uma nova espécie do gênero *Archaeospora* na amostra do município de Caxias do Sul.

Para avaliar as diversas espécies encontradas faz-se necessária a utilização em conjunto dos métodos morfológico e molecular.

A análise molecular por seqüenciamento do rDNA 18S tem maior eficiência na caracterização dos FMA em comparação com o teste TTGE.

## **CAPÍTULO III**

### **USO DE PLANTAS AROMÁTICAS COMO PRODUTORAS DE INÓCULO DE FMA**

#### **3.1 Introdução**

Os benefícios máximos da inoculação de plantas hortícolas por fungos formadores de micorrizas arbusculares (FMA) somente são obtidos através da seleção de uma combinação compatível de substrato/fungo/hospedeiro (Azcón-Aguilar & Barea, 1997).

Normalmente, a atividade dos FMA é ótima em uma mistura de vários materiais. Os fatores que podem afetar sua efetividade em um substrato são o pH, o conteúdo nutricional, a matéria orgânica, a atividade biológica, a textura, estrutura e agregação, densidade, umidade e as características de espaços intermatriciais (Siqueira, 1994; Nemeč, 1987, apud Souza, 1995; Silveira et al., 2002b).

Os FMA são de ocorrência generalizada e não são específicos, o que significa que um fungo isolado de determinada espécie de planta pode colonizar qualquer outra espécie capaz de formar associação com FMA. Embora não ocorra especificidade, existem graus diferenciados de eficiência simbiótica entre as espécies de FMA, que é a capacidade do fungo em promover crescimento ou outro benefício qualquer à planta,

em condições definidas. Várias espécies de FMA ou isolados dos mesmos exibem infectividade elevada, porém podem ser pouco efetivos em promover crescimento, absorver e translocar nutrientes para a planta, ou mesmo reduzir os danos causados por fitopatógenos (Siqueira & Franco, 1988; Silveira, 1992).

Nos últimos anos tem-se notado um grande interesse por parte de centros de pesquisa e grandes redes de laboratórios na descoberta de novos medicamentos provenientes de plantas medicinais e aromáticas, principalmente pelo elevado valor econômico que os princípios ativos dessas plantas têm alcançado no mercado (Freitas et al., 2002). Dentre estas estão a hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), e melissa (*Melissa officinalis* L.).

Hortelã pimenta apresenta em sua composição química o cineol, mentol, limoneno alfa-mentona, mentofurano, princípio amargo, metilacetato, pulegona, jasmoneno, piperitona, vitaminas C e D, terpenos, sesquiterpenos, cetonas, taninos, flavonóides e outros. Tanto seu óleo essencial quanto seu extrato fluído são largamente utilizados pela indústria farmacêutica e a espécie é dotada de propriedades expectorante, anti-séptica, carminativa, digestiva, tônica, colagoga, estimulante, entre outras (Freitas et al., 2002). Além de ser muito utilizado na culinária como condimento, orégano possui substâncias antioxidantes como o campferol que tem propriedades anticancerígenas e colabora para o rejuvenescimento e o ácido quínico que evita a formação de tumores no organismo. O óleo essencial de orégano é rico em timol, carvacrol, sesquiterpeno, etc. (Agência Fapesp, 2005). Como planta medicinal, melissa é usada para diminuir gases e cólicas, estimular a transpiração, como calmante, sedativa, digestiva, contra a insônia, enxaqueca, tensão nervosa, ansiedade e ajuda nos casos de traumatismo emocional, entre outras. O óleo essencial da melissa tem predominância de compostos terpênicos, nerol, citrol, linalol, além de eugenol, pineno, mirceno, limoneno (Blanco, 2006).

Pela importância econômica que a parte aérea das plantas aromáticas possuem e por serem plantas de rápida propagação, a sua utilização como plantas multiplicadoras de FMA pode propiciar aos viveiristas um ganho duplo: uso do sistema radicular como inóculo de FMA para as mudas de plantas frutíferas; e, aproveitamento da parte aérea para obtenção de matéria-prima para chá ou erva condimentar de valor comercial. Portanto, o objetivo desse trabalho foi testar três espécies de plantas aromáticas, hortelã pimenta, orégano e melissa como multiplicadoras de três espécies de FMA (*Glomus clarum* Nicol. & Schenck, *Glomus etunicatum* Becker & Gerd. e *Acaulospora* sp. Trappe) cultivadas em dois volumes de recipiente (bandeja de isopor com alvéolo de 40 ml e bandeja de isopor com alvéolo de 100 ml). A finalidade ao testar volume de recipiente, é verificar a viabilidade de utilização de alvéolos menores para enraizar os ramos das plantas aromáticas, economizando, dessa forma, substrato, irrigação e espaço físico.

### **3.2 Material e Métodos**

Realizaram-se três experimentos, um para cada espécie de planta aromática, sendo que cada um teve duas etapas. Na primeira, realizou-se a estaquia de ramos em bandejas alveoladas de isopor e, na segunda, o transplante das mudas para sacos de polietileno com 5 litros de volume. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura, da Faculdade de Agronomia, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Plantas de hortelã pimenta e de orégano, obtidas da Coleção de Plantas Aromáticas do Centro Agrícola Demonstrativo da Prefeitura de Porto Alegre, e de melissa, obtida de sementes doadas pela empresa Isla S.A., foram clonadas por estaquia de ramos, proporcionando um número suficiente de plantas para a instalação dos experimentos. Em fevereiro de 2003, coletaram-se ramos juvenis destas plantas que

originaram estacas com aproximadamente 5 cm de comprimento, com duas gemas vegetativas e duas folhas. Estas estacas foram colocadas em bandejas alveoladas de isopor (bandeja de isopor com alvéolo de 40 mL e bandeja de isopor com alvéolo de 100 ml), contendo substrato formulado com casca de arroz carbonizada e fibra de côco (1:1; v:v), em casa de vegetação, sob irrigação por aspersão. O substrato utilizado foi previamente esterilizado em autoclave, a 120°C, sendo o procedimento repetido por três vezes em intervalos de 24 horas. Antes da estaquia, foram adicionados, na porção intermediária de cada alvéolo, 10 g de inóculo, na forma de raízes e solo rizosférico de aveia (*Avena strigosa* Schreb.) contendo propágulos dos seguintes FMA (*Glomus clarum*; *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp.), separadamente.

Os inóculos de FMA utilizados procederam do Departamento de Engenharia Rural do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para cada planta aromática, utilizaram-se 12 estacas por parcela, 4 repetições, 8 tratamentos, em um total de 384 estacas. O delineamento experimental adotado foi parcela sub-dividida em esquema fatorial 2X4, sendo a parcela principal formada pelo volume de substrato e a parcela secundária formada pela espécie de FMA.

Os tratamentos aplicados foram os seguintes:

- 1 - Testemunha, sem FMA, em 40 ml de volume;
- 2 - Inoculação com *Glomus clarum*, em 40 ml de volume;
- 3 - Inoculação com *Glomus etunicatum*, em 40 ml de volume;
- 4 - Inoculação com *Acaulospora scrobiculata*, em 40 ml de volume;
- 5 - Testemunha, sem FMA, em 100 ml de volume;
- 6 - Inoculação com *Glomus clarum*, em 100 ml de volume;
- 7 - Inoculação com *Glomus etunicatum*, em 100 ml de volume;
- 8 - Inoculação com *Acaulospora scrobiculata*, em 100 ml de volume.

Aproximadamente duas semanas após o enraizamento das estacas e 30 dias após a inoculação, realizou-se a primeira avaliação, analisando-se quatro plantas por parcela, nas quais mediu-se a matéria fresca da parte aérea e das raízes, o número de folhas por planta e a análise qualitativa das raízes (AQR), usando uma escala de 1-9 (1= sem radicelas, 3= poucas radicelas, 5= moderado número de radicelas, 7= bom número de radicelas, 9= excelente número de radicelas) para classificar as mesmas.

O restante das plantas (8 plantas/ parcela) foi repicado para sacos plásticos de 5 litros de volume, contendo substrato constituído de areia: solo argiloso: resíduo decomposto de casca de acácia negra : casca de arroz carbonizada (2:2:1:1; v:v:v:v). A areia utilizada possuía granulometria média (entre 0,6 e 1 mm) e o solo foi coletado na Estação Experimental Agronômica (E.E.A.) da UFRGS, no setor do Departamento de Horticultura e Silvicultura. Este solo é caracterizado como ARGISSOLO VERMELHO Distrófico típico, unidade de mapeamento São Gerônimo, com teor de argila no horizonte B em torno de 43% (Embrapa, 1999). O resíduo decomposto de casca de Acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.), após retirada do tanino, foi coletado em um depósito a céu aberto da empresa Ecocitros/SA, localizada no município de Montenegro, RS. Todo substrato foi previamente desinfestado com solução de formolaldeído a 7%, e foi submetido a prévia análise química no Laboratório de Análises de Solos e Tecidos da Faculdade de Agronomia, UFRGS. Com base nesse laudo (vide tabela em anexo), não houve necessidade de corrigir os níveis nutricionais e de pH do substrato.

A segunda avaliação de orégano, hortelã pimenta e melissa foram realizadas em 17/6/2003, 24/6/2003 e 17/09/2003, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação das plantas, respectivamente. Nestas datas, foram mensurados o número de nós/ramo, o número de ramos/planta, número de folhas/ramo, a área foliar, o peso da matéria fresca e seca da parte aérea e de raízes e a colonização radicular por FMA.

A avaliação da área foliar foi realizada destacando-se as folhas dos ramos de cada planta e passando-as em um medidor de superfície foliar de marca Li-Cor, modelo LI - (3000). Para a medição da matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes, a parte aérea de cada planta (folhas e ramos) e o sistema radicular foram pesados em balança de precisão. Logo após, o material foi acondicionado em sacos de papel e levado a uma sala de desumidificação, para viabilizar a posterior secagem do material em estufa à 36° C, até peso constante. Após, foi feita nova pesagem do material.

Para determinação da colonização radicular com FMA, foi utilizada técnica de coloração de raízes, descrita por Phillips & Hayman (1970), apud Colozzi-Filho & Balota (1994). A intensidade de colonização por FMA foi determinada segundo a técnica de contagem descrita por Nemeç (1992), que consiste em quantificar e classificar a presença de hifas, vesículas e arbúsculos. Para o caso das hifas atribuiu-se o índice 0 para inexistência; 1, para escasso desenvolvimento de hifas no segmento; 2, para moderado e 3, para intenso desenvolvimento de hifas. As vesículas e os arbúsculos por sua vez, foram classificados como 0, para inexistência de estruturas; 1, para a presença de 1 até 50 estruturas; 2, para 51 até 100 estruturas e 3, para mais de 100 estruturas. A porcentagem de colonização de raízes por FMA, foi obtida pela divisão do número de segmentos de raízes colonizados pelo número total de segmentos de raízes observadas.

Para a contagem do número de esporos, retirou-se uma quantidade de 100g de substrato por amostra de cada repetição e tratamento. Procedeu-se sua secagem ao ar livre e à sombra, até peso constante. Após, realizou-se a separação dos esporos mediante a técnica de peneiramento por via úmida e decantação (Gerdemann & Nicolson, 1963). Em seguida, realizou-se a contagem de esporos em estereomicroscópio, em placas de Petri.

Para a interpretação dos resultados, primeiramente verificou-se a premissa básica da ANOVA de normalidade e homocedasticidade através da análise dos gráficos de probabilidade normal de resíduos e de resíduos vs. valores preditos. Após, foi realizada a análise de variância, sendo a significância das diferenças entre as médias avaliada pelo teste de Duncan. Os dados referentes a quantificação de estruturas de FMA nas raízes (presença de hifas, arbúsculos e vesículas) foram transformados pela aplicação da fórmula  $\sqrt{x+1}$ .

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3.1 é apresentado o número de folhas por planta e análise qualitativa de raízes (AQR) para as plantas de orégano, hortelã pimenta e melissa, cultivadas em alvéolos pequenos e grandes, aos 30, 37 e 29 dias após a inoculação, respectivamente.

TABELA 3.1 Número de folhas por planta (N.F./Planta) e análise qualitativa de raízes (AQR) em mudas de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e melissa (*Melissa officinalis*), inoculadas com três espécies de FMA em dois volumes de substrato. Porto Alegre, RS. 2003.

Espécie de FMA	Orégano		Hortelã pimenta		Melissa	
	N.F./Planta	AQR <sup>(1)</sup>	N. F./Planta	AQR <sup>(1)</sup>	N.F./Planta	AQR <sup>(1)</sup>
<i>Glomus clarum</i>	14,8	4,2 B	9,6	6,3 A	7,1	5,5
<i>Glomus etunicatum</i>	14,6	5,2 A	9,9	5,5 AB	6,9	5,2
<i>Acaulospora</i> sp.	14,5	5,1 A	10,2	6,2 A	7,6	5,3
Testemunha	14,5	4,2 B	8,9	4,6 B	6,8	4,9
C.V. (%)	9,1	3,9	8,9	3,6	9,7	10,3
Volume de substrato	N.F./Planta	AQR <sup>(1)</sup>	N.F./Planta	AQR <sup>(1)</sup>	N.F./Planta	AQR <sup>(1)</sup>
40 mL	14,2	4,6	9,5	5,2 B	7,1	4,9 B
100 mL	15,0	4,8	9,9	6,1 A	7,1	5,6 A
C.V. (%)	12,4	7,0	13,1	8,5	14,94	12,3

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

<sup>(1)</sup>AQR = escala de 1-9 (1= sem radículas, 3= poucas radículas, 5= moderado número de radículas, 7= bom número de radículas, 9= excelente número de radículas).

Não ocorreu interação significativa entre os fatores avaliados. Tampouco foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para o número de folhas/planta para as três espécies e entre plantas cultivadas em 40 ml de volume e em 100 ml de volume (Tabela 3.1).

Observaram-se diferenças significativas entre os tratamentos para análise qualitativa de raízes (AQR) (Tabela 3.1) para as culturas de hortelã pimenta e melissa, na média de plantas cultivadas em volumes de 40 ml de substrato e em 100 ml de substrato, onde as plantas cultivadas nestes últimos mostraram índices maiores. As plantas de orégano não sofreram influência do volume de substrato. Com relação à inoculação com FMA, a presença de *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp. proporcionaram uma qualidade do sistema radicular superior à testemunha e às plantas inoculadas com *Glomus clarum* em orégano. Para a cultura da hortelã pimenta plantas inoculadas com *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp. apresentaram melhor qualidade do sistema radicular em relação à testemunha. As inoculadas com *Glomus etunicatum* apresentaram comportamento intermediário. A melissa não sofreu influência significativa dos FMA no tocante à análise qualitativa de raízes.

O tempo transcorrido entre a inoculação e as primeiras avaliações do orégano, da hortelã pimenta e da melissa, em torno de 30 dias, pode ter sido insuficiente para medir a resposta dos FMA sobre o desenvolvimento vegetativo das plantas, indicando a necessidade de um maior tempo de cultivo para possam ser melhor evidenciadas as respostas aos tratamentos, principalmente volume de substrato condicionado ao tamanho dos alvéolos.

Na Tabela 3.2 consta os valores da matéria fresca da parte aérea e de raízes de mudas de orégano, hortelã pimenta e melissa, inoculadas ou não por *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp., 30, 37 e 29 dias após a inoculação,

respectivamente. Observa-se que o orégano colonizado por *Acaulospora sp* apresentou matéria fresca da parte aérea significativamente superior aos demais tratamentos, que não diferiram entre si, enquanto que para melissa não houve diferenças significativas entre os tratamentos para esta variável.

Conforme a Tabela 3.2, o cultivo de hortelã pimenta em 100 ml de substrato propiciou matéria fresca da parte aérea, na média, superior ao cultivo em 40 ml de substrato, não sendo verificado este comportamento nas raízes. Nas outras duas culturas o volume de substrato não influenciou sobre a matéria fresca da parte aérea e das raízes.

TABELA 3.2 Matéria fresca da parte aérea e de raízes de mudas de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e melissa (*Melissa officinalis*), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes de substrato. Porto Alegre, RS. 2003.

Espécie de FMA	Orégano		Hortelã pimenta		Melissa	
	Matéria fresca		Matéria fresca		Matéria fresca	
	(g)/planta		(g)/planta		(g)/planta	
	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes
<i>Glomus clarum</i>	1,18 B	1,08	1,02	0,68	0,79	0,92 B
<i>Glomus etunicatum</i>	1,16 B	1,18	0,95	0,64	0,69	0,93 B
<i>Acaulospora sp.</i>	1,38 A	1,13	1,08	0,98	0,79	1,15 A
Testemunha	1,18 B	1,12	0,93	0,68	0,73	0,96 B
C.V.	3,8	8,99	6,8	4,5	7,5	3,7
Volume de substrato						
40 mL	1,15	1,08	0,91 B	0,63	0,70	0,86
100 mL	1,08	1,18	1,08 A	0,86	0,79	1,12
C.V.	15,8	17,31	9,5	12,3	17,9	18,4

Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Dentre os FMA, somente *Acaulospora sp.* incrementou a matéria fresca da parte aérea em orégano e das raízes em melissa (Tabela 3.2). As demais espécies de FMA não influíram sobre a matéria fresca das plantas aromáticas, provavelmente devido ao curto espaço de tempo entre a inoculação e a avaliação.

O orégano apresentou, em valores absolutos, melhores resultados em termos de matéria fresca da parte aérea e de raízes, tanto em 100 ml de substrato, quanto em 40 ml de substrato. O mesmo já tinha sido observado para a variável número de folhas/planta (Tabela 3.1), o que indica uma maior produção de massa vegetal para esta cultura em relação às outras duas.

Os resultados da primeira fase, cultivo em bandejas (Tabelas 3.1 e 3.2), indicam que o volume do recipiente influenciou na resposta das plantas, independentemente de estarem ou não micorrizadas. Este efeito pode ser atribuído a fatores químico, pois com maior volume de substrato há maior disponibilidade de nutrientes e a planta pode crescer mais, e físico, pois a altura do recipiente influenciou na economia hídrica e a velocidade das trocas gasosas (Schmitz, 1998; Kämpf, 2000).

Comparado ao cultivo a campo (no solo *in situ*), o recipiente limita o volume disponível às raízes, alterando especialmente as propriedades físicas do substrato, como a economia hídrica e a velocidade das trocas gasosas. A capacidade de retenção de água de um substrato depende de três forças: a matricial, a gravitacional e a osmótica. Dessas três forças, o recipiente influenciou diretamente na força gravitacional, sendo que quanto menor a altura do recipiente, maior será, proporcionalmente, a retenção de umidade do meio (Schmitz, 1998; Kämpf, 2000).

Dessa forma, atribuiu-se o melhor desempenho em crescimento vegetativo das plantas cultivadas em alvéolos grandes (100 ml de substrato), em comparação às plantas cultivadas em alvéolos pequenos (40 ml de substrato), ao fato de que o recipiente de maior volume tinha também uma altura superior. Quanto maior a altura de um recipiente, maior é a força gravitacional que atua sobre o substrato, aumentando a drenagem (Schmitz, 1998; Kämpf, 2000). Deduz-se que o substrato de menor volume ficou mais encharcado, diminuindo as trocas gasosas e reduzindo a capacidade fotossintética e, portanto, o desenvolvimento da parte aérea. Reforçando esta hipótese,

Goss (1977) e Dexter (1987) relatam a importância da relação ar:água, pois a baixa disponibilidade de oxigênio, em difusão no espaço de aeração, afeta o crescimento das raízes e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das culturas. Monette (1983) verificou maior proliferação de partes aéreas de videira (*Vitis vinífera* L.) em recipiente de 438 ml quando comparados com recipientes de 125 e 250 ml.

A necessidade em realizar o transplante das mudas para recipientes maiores, em um espaço de tempo em torno de trinta dias após a inoculação com FMA, determinou a realização da avaliação da primeira fase dos experimentos nesta mesma época. Devido a esse reduzido espaço de tempo entre a inoculação e a avaliação já era esperado ausência de efeito dos FMA nas plantas aromáticas testadas, o que de fato foi verificado em hortelã pimenta e melissa. Devido, talvez, a uma maior velocidade de colonização, propiciada por uma boa afinidade colonizador-hospedeiro, já verificada em outros estudos (Siqueira & Franco, 1988; Gianinazzi, 1991, apud Siqueira, 1994; Silveira et al. 2002a), *Acaulospora* sp. induziu maior matéria fresca em orégano, já na primeira fase.

Na segunda fase dos experimentos (Tabela 3.3), observa-se ausência de efeito dos FMA e dos volumes de substrato sobre o número de folhas e a área foliar para orégano e melissa. No entanto, mudas de hortelã-pimenta confirmaram a tendência da primeira etapa (Tabela 3.1), com as plantas inoculadas com as espécies *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp. apresentando um número de folhas por planta e, também, uma área foliar por planta significativamente superior à testemunha. Neste caso, observa-se um efeito de interação, ao nível de 5% de probabilidade, entre os fatores espécie de FMA e volume de substrato, sendo que para plantas cultivadas inicialmente em 40 ml de substrato as espécies *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp. apresentaram maior número de folhas/planta em relação às plantas inoculadas com *Glomus clarum*, enquanto que para plantas cultivadas inicialmente em 100 ml de

substrato ocorreu o inverso. Para a variável área foliar também ocorreu efeito de interação entre os fatores espécie de FMA e volume de substrato, sendo que plantas inoculadas com *Glomus clarum* apresentaram resultado superior às plantas inoculadas com *Glomus etunicatum* no cultivo inicial em 40 ml de substrato, ocorrendo o inverso no cultivo inicial em 100 ml de substrato.

TABELA 3.3 Número de folhas por planta e área foliar por planta de mudas de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e melissa (*Melissa officinalis*), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.

Orégano						
Tratamentos	Número de folhas/planta			Área foliar/planta (cm <sup>2</sup> )		
	Volume inicial de substrato			Volume inicial de substrato		
Espécie de FMA	40 ml	100 ml	Média	40 ml	100 ml	Média
<i>Glomus clarum</i>	36,2	37,2	36,7	76,6	78,9	77,7
<i>Glomus etunicatum</i>	35,3	35,5	35,4	72,9	78,1	75,5
<i>Acaulospora</i> sp.	35,3	37,2	36,3	75,6	78,1	76,8
Testemunha	35,3	40,1	37,7	76,4	79,5	77,9
Média	35,6	37,5		75,4	78,9	

Hortelã-pimenta				
Tratamentos	Número de folhas/planta		Área foliar/planta (cm <sup>2</sup> )	
	Volume inicial de substrato		Volume inicial de substrato	
Espécie de FMA	40 ml	100 ml	40 ml	100 ml
<i>Glomus clarum</i>	29,0 Bb	38,6 Aa	33,9 Ab	47,8 Ba
<i>Glomus etunicatum</i>	31,2 Ab	34,1 Ba	31,5 Bb	52,3 Aa
<i>Acaulospora</i> sp.	32,2 Aa	32,6 Ba	27,8 Cb	41,7 Ca
Testemunha	25,1 Cb	32,2 Ca	25,3 Db	34,3 Da
Efeito de interação	*		*	

Melissa						
Tratamentos	Número de folhas/planta			Área foliar/planta (cm <sup>2</sup> )		
	Volume inicial de substrato			Volume inicial de substrato		
Espécie de FMA	40 ml	100 ml	Média	40 ml	100 ml	Média
<i>Glomus clarum</i>	41,5	42,0	41,8	203,5	244,4	224,0
<i>Glomus etunicatum</i>	30,2	43,6	36,9	201,6	252,9	227,0
<i>Acaulospora</i> sp.	39,5	40,7	40,1	193,6	221,0	207,3
Testemunha	41,0	45,9	43,4	196,2	221,6	208,9
Média	38,0	43,0		198,7	235,0	

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Várias espécies de FMA ou isolados dos mesmos exibem infectividade elevada e podem ser pouco efetivos em promover crescimento, absorver e translocar nutrientes para a planta, (Siqueira & Franco, 1988; Silveira, 1992). Neste experimento, é provável a existência de uma maior afinidade das espécies de FMA testadas com hortelã pimenta do que com melissa e orégano, o que possibilitou a obtenção de diferenças significativas, em termos de número de folhas e área foliar, entre plantas micorrizadas e não micorrizadas de hortelã pimenta e não obtenção das mesmas diferenças para melissa e orégano.

Na Figura 3.1 é apresentado o número de ramos por planta de plantas aromáticas inoculadas ou não com FMA. Em mudas de orégano não houve diferença significativa no número de ramos/planta entre os tratamentos. Em hortelã pimenta *Glomus etunicatum* induziu maior número de ramos/planta em relação às plantas inoculadas com *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp., que não diferiram entre si e com a testemunha. Em melissa, *Glomus etunicatum* induziu maior número de ramos/planta em relação à testemunha, não diferindo, no entanto, das plantas inoculadas com *Glomus clarum* e *Acaulospora* sp. Estas, por sua vez, não diferiram da testemunha.

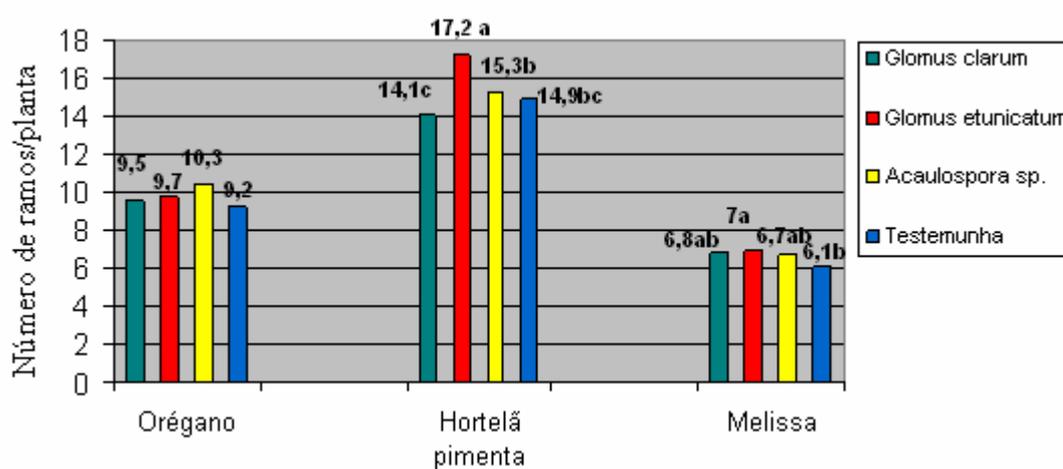


FIGURA 3.1 Número de ramos/planta de plantas aromáticas inoculadas ou não com FMA. Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan. Porto Alegre, RS. 2003.

Na Tabela 3.4 é apresentada a matéria fresca da parte aérea e de raízes/planta para as três plantas aromáticas aqui estudadas. Não houve interação significativa entre os fatores. Nesta fase notou-se uma semelhança estatística entre as plantas cultivadas, inicialmente, em 100 ml de substrato e em 40 ml de substrato. Para hortelã pimenta isso indica uma maior velocidade de crescimento daquelas plantas inicialmente cultivadas em 40 ml de substrato, pois na primeira fase observou-se maior matéria fresca da parte aérea nas plantas cultivadas em 100 ml de substrato e, na segunda etapa, esta diferença não se manteve. Nesse caso, o volume de recipiente foi moderador do desenvolvimento, havendo uma relação direta entre o volume de raízes e parte aérea. Ou seja, ao limitar-se o crescimento das raízes em hortelã pimenta, houve efeito direto na parte aérea. Para orégano e melissa o mesmo raciocínio não se aplica, pois não houve diferenças significativas na matéria fresca da parte aérea para o cultivo inicial em menor e maior volume de substrato.

Para hortelã-pimenta (Tabela 3.4), mudas inoculadas com *Glomus etunicatum* apresentaram matéria fresca da parte aérea e de raízes significativamente superior à testemunha, enquanto as outras duas espécies de FMA induziram a uma matéria fresca intermediária a estas. O fato de uma espécie de FMA induzir maior peso da matéria fresca da parte aérea e de raízes, em relação à testemunha, é um fator econômico importante, pois significa para o viveirista mais matéria prima para chá ou maior quantidade de essência da planta aromática para vender à indústria farmacêutica e de cosméticos. Também é sinônimo de eficiência na produção de inóculo de FMA, pois assim é garantida a produção significativa de raízes, as quais são fontes importantes de propágulos deste simbiote.

Cabello et al. (2005), estudando o efeito da inoculação de *Glomus mosseae* em *Mentha piperita* em substrato constituído de perlita : vermiculita (1:1; v:v), verificaram que esta espécie de FMA propiciou aumento na biomassa e na concentração de fósforo

nos tecidos de *M. piperita*. Vierheilig et al. (2004), citam que os FMA são capazes de promover maior desenvolvimento vegetativo da parte aérea em orégano e sálvia e aumentar a produção de óleo essencial de orégano.

TABELA 3.4 Matéria fresca da parte aérea e de raízes de plantas de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e melissa (*Melissa officinalis*), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.

Espécie de FMA	Orégano		Hortelã pimenta		Melissa	
	Matéria fresca (g)/planta		Matéria fresca (g)/planta		Matéria fresca (g)/planta	
	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes
<i>Glomus clarum</i>	13,51	7,25	10,42 AB	5,82 AB	37,27	11,42
<i>Glomus etunicatum</i>	13,00	6,72	14,56 A	7,72 A	38,44	12,41
<i>Acaulospora</i> sp.	14,01	7,06	12,01 AB	6,36 AB	35,01	13,09
Testemunha	12,74	6,65	9,28 B	5,70 B	34,30	10,85
C.V.	10,1	5,6	9,6	5,1	10,9	17,5
Volume de substrato						
40 mL	12,74	6,22	10,80	6,02	34,87	11,55
100 mL	13,91	7,61	12,33	6,79	38,14	12,33
C.V.	17,4	19,4	12,5	15,4	13,4	18,6

Médias seguidas de mesma letra, letra maiúscula na coluna e minúscula na Coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

A planta medicinal *Hyoscyamus niger* L é muito utilizada na Índia e Pandey et al. (1999), inocularam mudas desta espécie, infectadas ou não por *Meloidogyne incognita*, com *Glomus aggregatum*, *Glomus fasciculatum* e *Glomus mosseae*. Além de reduzir a infecção das plantas por este nematóide, as três espécies de FMA propiciaram aumento significativo da matéria seca da parte aérea em relação às plantas não micorrizadas, independentemente da presença do referido nematóide. Estes resultados confirmam que a inoculação de plantas aromáticas e medicinais com FMA pode aumentar a produção de biomassa das mesmas.

Não houve interação significativa entre os fatores espécie de FMA e volume inicial de substrato para matéria seca da parte aérea e de raízes (Tabela 3.5). À

semelhança do verificado para matéria fresca (Tabela 3.4), na matéria seca não houve diferenças significativas entre as plantas inicialmente cultivadas em 40 ml de substrato e em 100 ml de substrato.

TABELA 3.5 Matéria seca da parte aérea e de raízes e análise qualitativa de raízes (AQR) de mudas de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e melissa (*Mellissa officinalis*), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.

Espécie de FMA	Orégano		Hortelã pimenta		Melissa	
	Matéria seca (g)/planta		Matéria seca (g)/planta		Matéria seca (g)/planta	
	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes
<i>Glomus clarum</i>	2,19	3,51	2,49 B	1,3	5,53	3,07 AB
<i>Glomus etunicatum</i>	2,06	3,04	3,18 A	1,25	5,44	3,20 A
<i>Acaulospora</i> sp.	2,30	3,46	2,61 AB	1,19	5,16	2,94 AB
Testemunha	2,12	3,48	2,41 B	1,18	5,08	2,74 B
C.V.	6,2	13,4	7,8	6,4	8,1	5,69
<b>Volume de substrato</b>						
40 mL	2,12	3,31	2,49	1,11	4,85	2,82
100 mL	2,22	3,44	2,86	1,35	5,75	3,15
C.V.	15,6	19,3	11,4	12,5	9,3	11,9

Médias seguidas de mesma letra, letra maiúscula na coluna e minúscula na Coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Observa-se na Tabela 3.5 a ausência de diferenças significativas na matéria seca da parte aérea e de raízes entre os tratamentos aplicados ao orégano. Porém, para hortelã pimenta observa-se que plantas inoculadas com *Glomus etunicatum* apresentaram resposta superior à testemunha e as plantas inoculadas com *Glomus clarum*. Nas raízes, no entanto, não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Para melissa não houve diferenças significativas entre tratamentos na matéria seca da parte aérea, porém, houve para matéria seca de raízes, onde, novamente, *Glomus etunicatum* propiciou resposta superior à testemunha, com as outras duas espécies de FMA induzindo uma massa intermediária de raízes (Tabela 3.5).

Fazendo-se a relação matéria fresca da parte aérea de mudas micorrizadas/ matéria fresca da parte aérea da testemunha (Tabela 3.4), para as três culturas, encontrou-se que a matéria fresca da parte aérea de plantas micorrizadas foi 11,5% maior do que da testemunha. Fazendo a mesma relação para matéria seca da parte aérea (Tabela 3.5), verificou-se que a diferença entre plantas micorrizadas e a testemunha cai para 7,5%. Nas raízes, essa proporção passa de 12% na matéria fresca, para 3,24% na matéria seca. Isso significa que as plantas micorrizadas absorveram mais água, ratificando o efeito dos FMA em propiciar maior absorção de água (Read & Boyd, 1986; Allen, 1991). Em termos de desenvolvimento vegetativo da parte aérea, um acréscimo na produção de matéria fresca da ordem de 11,5% propiciada pela inoculação com FMA é expressivo, considerando-se que o objetivo maior é a obtenção do inóculo deste fungo.

Freitas et al. (2002) testaram o efeito da inoculação de FMA em *Mentha arvensis* L. e doses diferenciadas de P no desenvolvimento vegetativo da planta, na produção de óleo essencial e na colonização da mesma por este fungo. Somente na ausência de adubação fosfatada, com níveis abaixo de 50 mg Kg<sup>-1</sup> de P no substrato original, é que *Glomus clarum* e *Gigaspora margarita* propiciaram maior produção de matéria fresca em relação a plantas não inoculadas. Concluíram, ainda, que o teor de óleo essencial foi maior nos tratamentos com FMA na ausência de adubação fosfatada e que, com a elevação das doses de P, os teores de óleo essencial e colonização micorrízica decresceram para os tratamentos com os fungos *G. clarum* e *G. margarita*.

Nas Figuras 3.2 A, B e C, observa-se o aspecto geral das plantas obtidas nestes experimentos.



FIGURA 3.2 Aspecto geral das plantas medicinais. (A) Plantas de melissa (*Melissa officinalis*) inoculadas ou não com FMA, com 86 dias. (B) Plantas de orégano (*Origanum vulgare*) inoculadas ou não com FMA, com 118 dias. (C) Plantas de hortelã pimenta (*Mentha piperita*) inoculadas ou não com FMA, com 125 dias. Porto Alegre, RS. 2003.

Os resultados obtidos por Freitas et al. (2002) indicam que o puro e simples aumento da produção de biomassa de planta aromática inoculada com FMA, através do uso de adubação mineral, é uma questão complexa. Uma forma de aumentar a produção de biomassa obtida neste trabalho (Tabelas 3.4 e 3.5), seria, tendo como base de partida o substrato utilizado nestes experimentos, a realização de curvas independentes de calibração para N, P e K, aplicados às plantas aromáticas, com o objetivo de verificar seu efeito no aumento do desenvolvimento vegetativo destas plantas e na colonização do sistema radicular por FMA. Com isso, se obteria uma concentração ótima de cada um desses macronutrientes para serem utilizados pelos viveiristas na produção de plantas aromáticas e de inóculo de FMA.

Gupta & Janardhanan (1991) verificaram que palmarosa (*Cymbopogon martinii* var. *Motia*) colonizada por *Glomus aggregatum* produziu maior biomassa do que palmarosa sem FMA e que, como o óleo essencial de palmarosa é retirado das folhas e das inflorescências, este incremento na biomassa propiciada pelas micorrizas resulta em maior quantidade de óleo. Da mesma forma, podemos supor que hortelã pimenta colonizada por *Glomus etunicatum* deve produzir mais óleo essencial em relação à hortelã pimenta não colonizada, por ter sua biomassa aumentada. O fato de hortelã pimenta apresentar resposta diferenciada de acordo com a espécie de FMA deve-se a afinidade colonizador-hospedeiro, já citada por outros autores (Menge et al., 1980; Haas & Menge, 1990).

Através dos dados das Tabelas 3.6 e 3.7, percebe-se que todas as espécies de FMA formaram estruturas de colonização nas raízes das três plantas aromáticas testadas, independentemente do volume inicial de substrato. No caso de hortelã pimenta e melissa não houve diferenças na formação de arbúsculos entre espécies de FMA, no entanto para orégano, *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum* apresentaram quantidades superiores de arbúsculos no sistema radicular em relação à *Acaulospora* sp. (Tabela

3.6). Quanto à formação de vesículas, para hortelã pimenta a espécie *Glomus clarum* apresentou maior presença desta estrutura, não se verificando diferenças significativas nas demais espécies de FMA. Em orégano e melissa a presença de vesículas foi semelhante entre os FMA. As vesículas são estruturas de armazenamento de lipídios dos FMA e servem para nutrir o fungo, quando os arbúsculos senescem, propiciando, portanto, um maior tempo de vida aos FMA.

Neste experimento, a formação de vesícula não teve correlação com os pesos da matéria fresca e seca da parte aérea e de raízes, mas teve correlação significativa ( $r = 0,71$ ,  $p < 0,05$ ) com número de folhas e área foliar ( $r = 0,76$ ,  $p < 0,05$ ), ambas para hortelã pimenta, indicando, talvez, que a maior longevidade dos FMA, propiciada por uma maior quantidade de substâncias de reserva armazenada nas vesículas, propiciem maior número de folhas e maior área foliar.

Importante destacar que várias espécies de FMA exibem infectividade elevada e podem ser pouco efetivas em promover crescimento, absorver e translocar nutrientes para a planta (Haas & Menge, 1990). Neste caso, as mudas de hortelã pimenta inoculadas com *G. clarum* e *Acaulospora sp.* apresentaram infectividade elevada, mas foram menos eficientes do que *Glomus etunicatum*, em propiciar melhor desenvolvimento vegetativo da parte aérea nos parâmetros número de ramos (Figura 3.1), peso seco da parte aérea (Tabela 3.5) e peso da matéria fresca da parte aérea e de raízes (Tabela 3.4).

Costa et al. (2001), inocularam dois genótipos de acerola ('Barbados' e 'Miró'), com duas espécies de FMA (*G. margarita* e *G. etunicatum*) e concluíram que estas duas espécies propiciam maior crescimento das plantas 'Miró', mas as plantas do genótipo 'Barbados' foram mais beneficiadas pela inoculação de *G. margarita*. Este exemplo vem ao encontro dos resultados deste experimento, reforçando a idéia de que a eficiência da associação entre FMA e as plantas é regulada pelos genótipos dos dois

parceiros da simbiose.

TABELA 3.6 Presença de arbúsculos e vesículas no sistema radicular de mudas de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e melissa (*Melissa officinalis*), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.

Espécie de FMA	Orégano		Hortelã pimenta		Melissa	
	Arbúsculo <sup>(1)</sup>	Vesícula <sup>(2)</sup>	Arbúsculo <sup>(1)</sup>	Vesícula <sup>(2)</sup>	Arbúsculo <sup>(1)</sup>	Vesícula <sup>(2)</sup>
<i>Glomus clarum</i>	2,2 A	0,8 A	1,2 A	1,2 A	1,4 A	0,7 A
<i>Glomus etunicatum</i>	2,0 A	1,1 A	0,8 B	0,8 B	1,7 A	1,0 A
<i>Acaulospora</i> sp.	1,6 B	1,1 A	0,6 B	0,6 B	1,6 A	0,7 A
Testemunha	0,3 C	0,1 B	0 C	0 C	0,3 B	0,0 B
C.V.	3,6	5,2	4,0	4,8	5,3	5,7
Volume de substrato						
40 mL	1,5	0,7	1,5	0,7	1,1	0,6
100 mL	1,6	0,8	1,6	0,6	1,4	0,7
C.V.	11,3	18,1	10,1	9,6	11,5	8,9

Médias seguidas de mesma letra, letra maiúscula na coluna e minúscula na Coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

<sup>(1)</sup>Índice de presença de arbúsculos de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de arbúsculo no segmento de raiz; 1 = presença de 1 até 50 arbúsculos por segmento de raiz;

2 = presença de 51 até 100 arbúsculos por segmento de raiz; 3 = presença de mais de 100 arbúsculos por segmento de raiz.

<sup>(2)</sup> Índice de presença de vesículas de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de vesículas no segmento de raiz; 1 = presença de 1 até 50 vesículas por segmento de raiz;

2 = presença de 51 até 100 vesículas por segmento de raiz; 3 = presença de mais de 100 vesículas por segmento de raiz.

Através da Tabela 3.7, verifica-se que não houve diferenças significativas na presença de hifas entre as espécies de FMA aqui testadas nas culturas do orégano e da melissa.

Para hortelã-pimenta, no entanto, a espécie *Glomus clarum* apresentou quantidades superiores desta estrutura (Tabela 3.7). Juntamente com a maior presença de vesículas, essa quantidade superior de hifas ajuda a explicar a maior área foliar em alvéolo pequeno (Tabela 3.3) e maior número de ramos (Figura 3.1) propiciados por *G. clarum* em hortelã pimenta.

TABELA 3.7 Presença de hifas internas e colonização (Col.) no sistema radicular de mudas de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e melissa (*Melissa officinalis*), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.

Espécie de FMA	Orégano		Hortelã pimenta		Melissa	
	Hifa <sup>(1)</sup>	Col. <sup>(2)</sup>	Hifa <sup>(1)</sup>	Col. <sup>(2)</sup>	Hifa <sup>(1)</sup>	Col. <sup>(2)</sup>
<i>Glomus clarum</i>	1,52 A	87,06 A	2,05 A	90,17 A	1,26 A	83,37 A
<i>Glomus etunicatum</i>	1,79 A	81,16 A	1,10 B	90,50 A	1,54 A	86,15 A
<i>Acaulospora</i> sp.	1,52 A	85,78 A	1,18 B	87,86 A	1,33 A	83,25 A
Testemunha	0,49 B	11,88 B	0,31 C	11,97 B	0,45 B	07,53 B
C.V.	6,9	2,7	6,3	4,2	5,7	3,0
Volume de substrato						
40 mL	1,28	63,93	1,27	67,73 B	1,08	62,15 B
100 mL	1,38	69,00	1,05	74,43 A	1,21	68,00 A
C.V.	13,2	10,1	9,8	7,0	12,7	6,2

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra, letra maiúscula na coluna e minúscula na Coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

<sup>(1)</sup>Índice de presença de hifas de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de hifas de FMA ; 1 = escasso desenvolvimento de hifas de FMA ; 2 = desenvolvimento moderado de hifas de FMA; 3 = intenso desenvolvimento de hifas.

<sup>(2)</sup> Porcentagem de colonização de raízes por FMA = divisão do número de segmentos de raízes colonizados (hifas, arbúsculos ou vesículas) pelo número total de segmentos de raízes observadas.

Em termos de colonização do sistema radicular de orégano, hortelã pimenta e melissa por FMA (Tabela 3.7), observaram-se excelentes percentagens de colonização propiciadas pelas espécies *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp., todas acima de 80%. Não se observaram diferenças significativas entre as espécies de FMA para percentagem de colonização nas três espécies de plantas aromáticas estudadas.

No caso da percentagem de raízes colonizadas, encontrou-se uma maior colonização naquelas plantas inicialmente cultivadas 100 ml de substrato, principalmente, no caso de hortelã pimenta e melissa. A explicação para tal comportamento, provavelmente, é devido à existência de um maior volume de raízes nas condições físicas do substrato, que, em alvéolos pequenos, em função de um maior teor de humidade, pode ter prejudicado a colonização inicial.

Houve efeito de interação, significativa a 1% de probabilidade pela análise de variância, para número de esporos entre os fatores espécies de FMA e volume de substrato onde as plantas foram cultivadas inicialmente, para as três espécies de plantas aromáticas (Tabela 3.8). No cultivo inicial em 40 ml de substrato observa-se que *Acaulospora sp* propiciou uma produção de esporos em hortelã pimenta e melissa superior às espécies *Glomus etunicatum* e *Glomus clarum*. No cultivo inicial em 100 ml de substrato, no entanto, não houve diferenças significativas no número de esporos produzidos pelas três espécies de FMA em hortelã pimenta, e, no cultivo de melissa, as espécies *Glomus clarum* e *Acaulospora sp*. apresentaram um número de esporos superior a *Glomus etunicatum*.

No cultivo inicial de orégano em 40 ml de substrato (Tabela 3.8), *Glomus etunicatum* produziu um número de esporos inferior a *Acaulospora sp*. e semelhante a *Glomus clarum*. No cultivo inicial de orégano em 100 ml de substrato, tanto *Acaulospora sp*. quanto *Glomus etunicatum* produziram um número de esporos superior a *Glomus etunicatum*.

De uma maneira geral, o número de esporos é pequeno em todos os tratamentos, levando-se em consideração a produção de esporos (Elfstrand et al., 2005; Vestberg, et al., 2005). Explica-se pelo fato de que quando o interesse é a produção de esporos, deve-se provocar um estresse hídrico às plantas na fase final de cultivo, visando provocar a esporulação, pois os esporos são estruturas de resistência dos fungos.

No entanto, mais do que quantidades absolutas de esporos produzidos por espécie de FMA interessa saber que estes esporos estão viáveis, sendo capazes de germinar e colonizar novas raízes da planta hospedeira e isso foi verificado neste trabalho através das percentagens de colonização e presenças de hifas, arbúsculos e vesículas nas raízes das plantas estudadas (Tabelas 3.7, 3.8, 3.9) (Figuras 3.3 a 3.7).

TABELA 3.8 Número de esporos em 100 g de substrato de cultivo de mudas de orégano (*Origanum vulgare*), hortelã pimenta (*Mentha piperita*) e melissa (*Melissa officinalis*), inoculadas com 3 espécies de FMA em dois volumes iniciais de substrato, aos 125, 132 e 127 dias após a inoculação, respectivamente. Porto Alegre, RS. 2003.

<u>Espécie de FMA</u>	Orégano			
	Volume inicial de substrato			
	40 ml		100 ml	
<i>Glomus clarum</i>	92,5	ABb	106,0	Aa
<i>Glomus etunicatum</i>	85,2	Ba	90,2	Ba
<i>Acaulospora sp.</i>	100,5	Ab	109,2	Aa
Testemunha	3,8	Cb	24,7	Ca
Interação	*			

<u>Espécie de FMA</u>	Hortelã pimenta			
	Volume inicial de substrato			
	40 ml		100 ml	
<i>Glomus clarum</i>	85,2	Bb	96,5	Aa
<i>Glomus etunicatum</i>	72,5	Cb	91,2	Aa
<i>Acaulospora sp.</i>	92,0	Ab	109,2	Aa
Testemunha	11,0	Db	31,0	Ba
Interação	*			

<u>Espécie de FMA</u>	Melissa			
	Volume inicial de substrato			
	40 ml		100 ml	
<i>Glomus clarum</i>	79,0	Bb	103,5	Aa
<i>Glomus etunicatum</i>	79,2	Bb	95,2	Ba
<i>Acaulospora sp.</i>	93,0	Ab	110,0	Aa
Testemunha	0,2	Cb	8,2	Ca
Interação	*			

<sup>1)</sup>Médias seguidas de mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na Coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

<sup>2)</sup> Número de esporos de FMA presentes em 100 g de substrato.

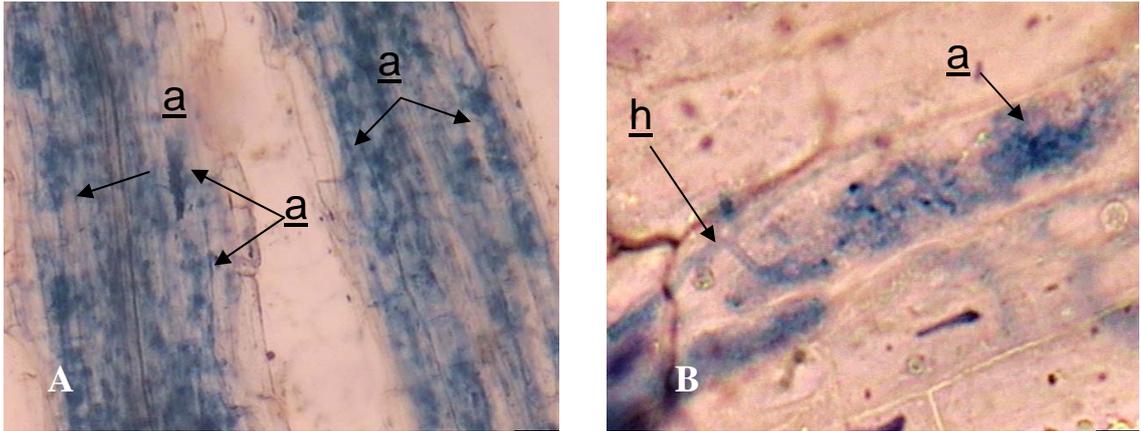


FIGURA 3.3 (A) Vista geral da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizada por *Glomus etunicatum*. a= arbúsculos colonizando o interior das células do córtex (Aumento de 200x). (B) Vista do córtex da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizado por *Acaulospora* sp. a = arbúsculos; h= hifas.(Aumento de 400x). Porto Alegre, RS. 2003.

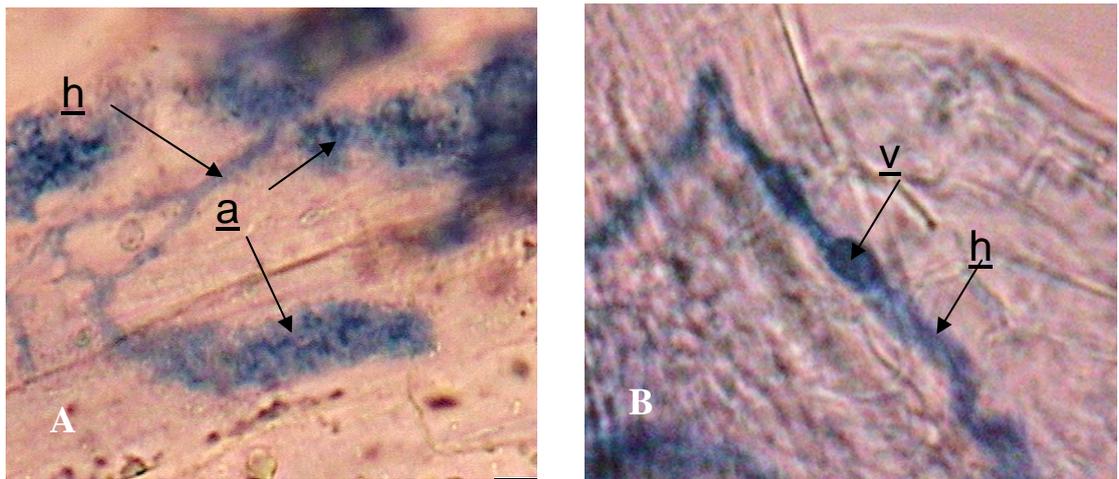


FIGURA 3.4 (A) Vista do córtex da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizado por *Acaulospora* sp.. a= arbúsculos colonizando; h= hifas (Aumento de 400x). (B) Vista do córtex da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizado por *Glomus etunicatum*. v= vesícula e h= hifas presentes no espaço intercelular (Aumento de 200x). Porto Alegre, RS. 2003.

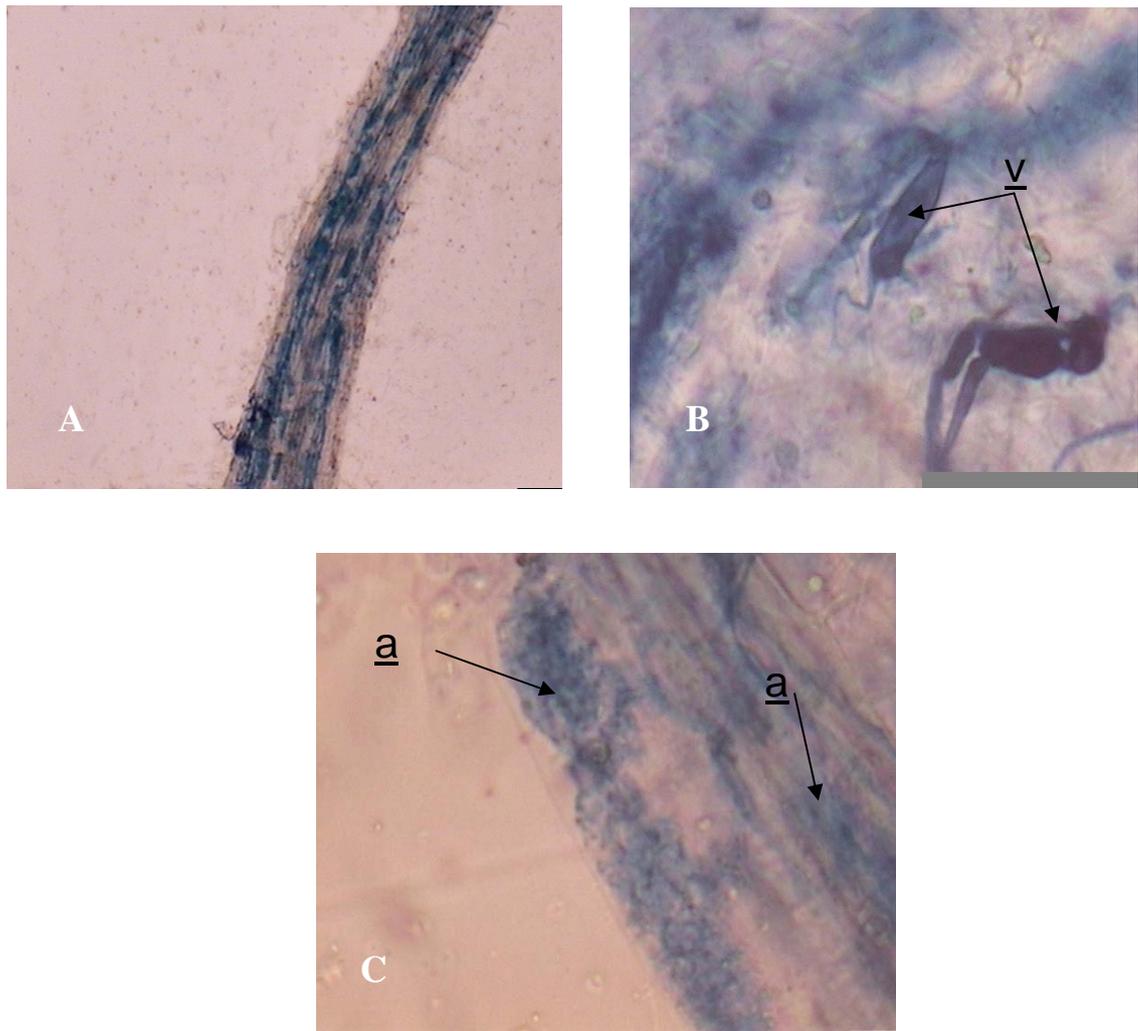


FIGURA 3.5 (A) Vista do córtex da raiz de orégano (*Origanum vulgare*) colonizada por *Glomus clarum*.(Aumento de 200x). (B) Vista do córtex de hortelã pimenta (*Mentha piperita*)colonizado por *Glomus clarum*. V= vesículas presentes no espaço intercelular (Aumento de 400x). (C) Vista do córtex da raiz de hortelã pimenta (*Mentha piperita*)colonizada por *Acaulospora* sp. a= arbúsculos no interior das células (Aumento de 200x). Porto Alegre, RS. 2003.

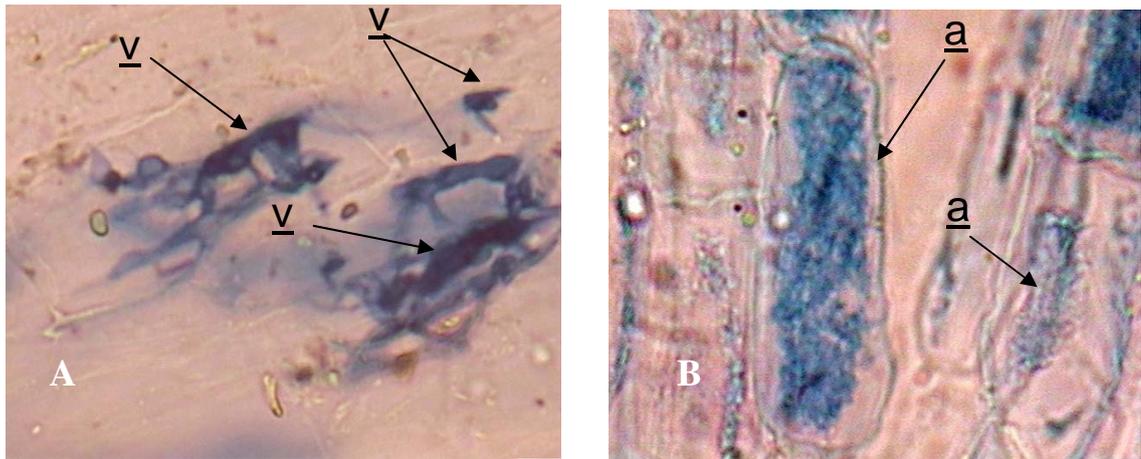


FIGURA 3.6 (A) Vista do córtex da raiz de melissa (*Melissa officinalis*) colonizado por *Glomus clarum*. v= Vesículas presentes no espaço intercelular (Aumento de 400x). (B) Vista do córtex da raiz de melissa (*Melissa officinalis*) colonizado por *Acaulospora* sp. a= arbúsculos colonizando o interior das células (Aumento de 400x). Porto Alegre, RS.

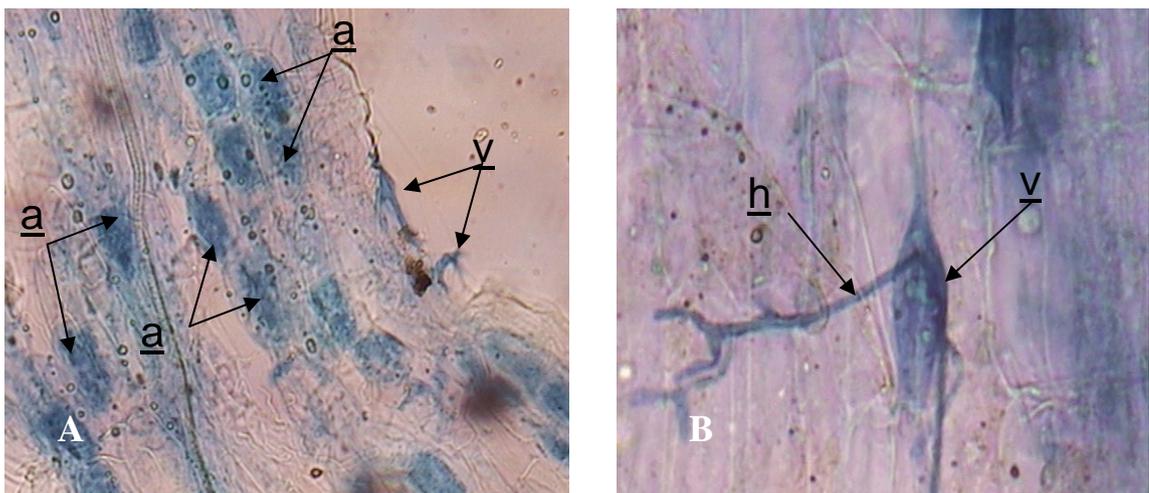


FIGURA 3.7 (A) Vista de raiz de melissa (*Melissa officinalis*) colonizada por *Glomus clarum*. a = arbúsculo colonizando o interior da célula do córtex.;v = Vesícula presente no espaço intercelular do córtex. (Aumento de 400x). (B) Vista do córtex da raiz de melissa (*Melissa officinalis*) colonizada por *Glomus etunicatum*. v=vesícula e h= hifa presentes no espaço intercelular (Aumento de 400x). Porto Alegre, RS. 2003.

### 3.4 CONCLUSÕES

*Origanum vulgare*, *Mentha piperita* e *Melissa officinalis* podem ser utilizadas como plantas multiplicadoras das espécies de FMA *Glomus clarum*, *Acaulospora* sp. e *Glomus etunicatum*.

A influência no desenvolvimento vegetativo de *Origanum vulgare*, *Mentha piperita* e *Melissa officinalis* varia de acordo com a espécie de FMA estudada e de acordo com o parâmetro estudado.

O cultivo inicial em 100 mL de substrato propicia melhor colonização do sistema radicular em *Mentha piperita* e *Melissa officinalis* do que o cultivo inicial em 40 mL de substrato.

O cultivo inicial de *Mentha piperita* em 100 mL de substrato propicia melhor desenvolvimento vegetativo da parte aérea do que o cultivo inicial em 40 mL de substrato.

## **CAPÍTULO IV**

### **EFICIÊNCIA DOS INÓCULOS DE FMA PRODUZIDOS A PARTIR DE PLANTAS AROMÁTICAS EM PORTA-ENXERTOS DE PLANTAS FRUTÍFERAS**

#### **4.1 Introdução**

Os porta-enxertos são largamente utilizados na fruticultura em virtude de sua resistência a fatores bióticos (resistência a moléstias e pragas) e abióticos (tolerância a sais e a solos encharcados).

Além disso, vários estudos têm demonstrado a eficiência dos FMA em acelerar o desenvolvimento vegetativo e a resistência a moléstias em mudas frutíferas (Azcón-Aguilar & Barea, 1997; Chu, 1997; Pinochet et al., 1998; Pozo et al., 2002; Souza et al., 2005).

A funcionalidade da simbiose está baseada na troca bi-direcional de nutrientes. Carboidratos sintetizados pelo sistema fotosintético das plantas são liberados pelas células das raízes do hospedeiro para o fungo, melhorando os recursos de carbono para o mesmo. Em contrapartida, os nutrientes minerais são absorvidos do solo pelo micélio extraradical dos FMA e são transportados para a planta (Bago et al., 1998a; Bago et al., 2003). Este micélio é compreendido por uma rede de hifas muito finas, que se ramificam no solo, exploram o ambiente e absorvem nutrientes minerais.

Mosse & Hepper (1975) descobriram que estas hifas são capazes de ramificarem-se à semelhança de um "arbúsculo" e de formar esporos. Bago et al. (1998b), nomearam esse conjunto de hifas por BAS (*Branched Absorbing Structures*) e os esporos nelas formados por BAS esporos. Primeiramente essas estruturas foram verificadas somente em cultivo *in vitro*, mas recentemente comprovou-se sua presença em condições naturais (Bago et. al., 2005). Portanto, estas estruturas aumentam significativamente a área de absorção de nutrientes e água no solo para a planta, na medida em que comportam-se como uma extensão do sistema radicular.

Mecanismos ativos e passivos estão envolvidos na transferência de nutrientes do FMA para o hospedeiro. O mecanismo se inicia com um transporte ativo no plasmalema da hifa externa, sendo seguido de um transporte passivo até o plasmalema do arbúsculo, terminando com outro transporte ativo no plasmalema da célula do hospedeiro (Woolhouse, 1975, apud Siquiera, 1985). Rausch et al. (2001), identificaram uma proteína de membrana específicas de células de raízes colonizadas por FMA, o transportador de fósforo StPt3. Este transportador está situado na membrana da célula do córtex da planta, na interface com o arbúsculo e é responsável por fazer a passagem dos nutrientes do arbúsculo para a célula da planta. Essas informações, por um lado justificam a capacidade dos FMA em absorver e translocar nutrientes às plantas (Rosand & Dias, 1985; Allen, 1991) e, por outro, evidenciam a grande afinidade existente entre os dois parceiros da simbiose. Nesta relação, embora não haja especificidade, existem graus diferenciados de eficiência simbiótica entre as espécies de FMA e as espécies de plantas, que é a capacidade do fungo em promover crescimento ou outro benefício qualquer à planta, em condições definidas. Várias espécies de FMA ou isolados dos mesmos exibem infectividade elevada e podem ser pouco efetivos em promover crescimento, absorver e translocar nutrientes para a planta, ou mesmo reduzir os danos causados por fitopatógenos (Siqueira & Franco, 1988; Silveira, 1992).

Dessa forma, o objetivo deste capítulo consiste em verificar a eficiência dos inóculos de *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp., produzidos em plantas aromáticas (Capítulo 3), sobre colonização do sistema radicular e o desenvolvimento vegetativo de porta-enxertos de videira cv. SO4 (*Vitis berlandieri* X *Vitis riparia*), citros citrangeiro ‘Troyer’ (*Poncirus trifoliata* L. RAF. X *Citrus sinensis* L. Osb.) e, como dados complementares, pessegueiro cv. Okinawa (*Prunus persica* L. Bats. variedade *vulgaris*).

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Experimento 1: Inoculação do porta-enxerto SO4 com FMA.

Porta-enxertos de videira SO4 foram multiplicados por micropropagação no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura, Fac. Agronomia da UFRGS, a partir de explantes fornecidos pelo Departamento de Engenharia Rural do Centro de Ciências Agrárias da UFSC. As mudas foram micropropagadas em tubos de ensaio, fechados com papel alumínio e filme plástico, contendo 15ml de meio de cultura DSD1 (Silva & Doazan, 1995) com sacarose (20 g L<sup>-1</sup>) e agar (6,0 g L<sup>-1</sup>), isento de reguladores de crescimento e com pH 5,8. Partes lenhosas da planta foram utilizadas como explantes para multiplicação, com duas gemas cada. As culturas *in vitro* foram mantidas em câmara de crescimento durante 80 dias a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas e umidade relativa do ar de 60 a 70%. O experimento propriamente dito iniciou-se na fase de aclimatização das plantas em casa de vegetação. Para tanto, as plantas do cultivo *in vitro* foram lavadas com água destilada para retirar os restos de meio de cultura e eliminou-se o excesso de raízes, deixando-se a parte aérea com uma altura em torno de 5 cm e 4 folhas. Em seguida, as plantas foram transplantadas para copos plásticos de 300 ml com dois orifícios de 0,5cm cada na sua

base, para permitir a irrigação por capilaridade. O substrato utilizado nesta fase foi uma mistura do substrato comercial Plantmax ® + vermiculita (2:1; v:v). Ao substrato adicionou-se água na proporção (substrato:água) 3:1 v:v.

No momento da transferência para aclimatização as plantas receberam os respectivos tratamentos, constituídos da adição de 20 g do inoculante de três espécies de FMA, multiplicados em plantas aromáticas (Capítulo 3) adicionado no terço médio do recipiente. Após a adição do inóculo o recipiente foi completado com substrato até a sua borda.

Os tratamentos aplicados foram os seguintes:

- 1- Testemunha, sem FMA;
- 2- Inoculação com *Glomus clarum* produzido em orégano (*Origanum vulgare* L.);
- 3- Inoculação com *Glomus etunicatum* produzido em orégano (*Origanum vulgare*);
- 4- Inoculação com *Acaulospora* sp. produzido em orégano (*Origanum vulgare*);
- 5- Inoculação com *Glomus clarum* produzido em hortelã pimenta (*Mentha piperita* L.);
- 6- Inoculação com *Glomus etunicatum* produzido em hortelã pimenta (*Mentha piperita* );
- 7- Inoculação com *Acaulospora* sp. produzido em hortelã pimenta (*Mentha piperita*);
- 8- Inoculação com *Glomus clarum* produzido em melissa (*Melissa officinalis* L.);
- 9- Inoculação com *Glomus etunicatum* produzido em melissa (*Melissa officinalis*);

10- Inoculação com *Acaulospora sp.* produzido em melissa (*Melissa officinalis*).

Em seguida, os porta-enxertos foram transplantados para estes copos, os quais foram dispostos em bandejas plásticas redondas, uma para cada tratamento e repetição a fim de evitar contaminação. Estas bandejas possuíam um diâmetro de 35 cm e 5 cm de altura e foram posicionados em bancadas na casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Horticultura e Silvicultura, Faculdade de Agronomia da UFRGS. Logo após o transplante e sobre os copos contendo as plantas, colocaram-se copos plásticos transparentes, dispostos com a abertura para baixo. No início este copos continham 1 orifício pequeno e, a cada 2 dias, faziam-se mais dois furos de dimensões semelhantes, até chegar-se a 30-32 orifícios, a partir do qual os mesmos foram removidos, concluindo-se a aclimatização em um período em torno de 35 dias.

Após este período, os porta-enxertos de videira, com seus respectivos tratamentos, foram transferidos para sacos plásticos pretos de 4 litros contendo substrato autoclavado a 105 °C por três vezes seguidas em intervalo de 24 horas e de constituição idêntica ao utilizado para cultivar as plantas aromáticas após o transplante (Capítulo 3).

Aproximadamente seis meses após a inoculação mediram-se altura das plantas, do colo até o ápice do ramo principal; diâmetro do ramo principal, na altura do colo; número de folhas por planta; área foliar; teores de macro e micronutrientes dos tecidos da parte aérea e colonização do sistema radicular. As metodologias utilizadas para estas análises são as mesmas descritas no Capítulo 3 para as plantas aromáticas.

Para a análise de macro e micronutrientes, a parte aérea de cada planta (folhas

e ramos) foi lavada com água destilada e, em seguida, pesada em balança de precisão. Logo após, o material foi acondicionado em sacos de papel e levados à estufa, onde procedeu-se sua secagem, a 60° C, até peso constante. Após, pesou-se o material em balança de precisão. As amostras de parte aérea foram moídas em moinho, acoplado com peneira de 20 malhas por polegada. Em seguida, todas as partes aéreas constituintes de uma parcela foram misturadas e homogeneizadas, formando uma amostra composta. Este material foi encaminhado ao Laboratório de Análises de Solos e Tecidos da Faculdade de Agronomia - UFRGS, para a realização das referidas análises.

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados em arranjo fatorial, com 10 plantas por parcela e 3 repetições.

Na interpretação dos resultados, primeiramente verificou-se a premissa básica da ANOVA de normalidade e homocedasticidade através da análise dos gráficos de probabilidade normal de resíduos e de resíduos vs. valores preditos. Após,

Na interpretação dos resultados, primeiramente verificou-se a premissa básica da ANOVA de normalidade e homocedasticidade através da análise dos gráficos de probabilidade normal de resíduos e de resíduos vs. valores preditos. Após, foi realizada análise de variância, sendo a significância das diferenças entre as médias avaliada pelo teste de Duncan, através do programa estatístico SAS. Também, utilizou-se análise de correlação entre as variáveis estudadas. Os dados referentes a quantificação de estruturas de FMA nas raízes (presença de hifas, arbúsculos e vesículas) foram transformados pela aplicação da fórmula  $\sqrt{x + 1}$ , dada a presença, não elevada, de valores zero nos resultados.

#### 4.2.2 Experimento 2: Influência da quantidade de inóculo de FMA sobre o crescimento de citrangeiro ‘Troyer’.

Para a produção de porta-enxertos de citrangeiro ‘Troyer’, utilizaram-se copos plásticos de 500ml de volume. Adicionou-se substrato autoclavado a 105 °C por três vezes seguidas em intervalo de 24horas e de constituição idêntica ao utilizado para cultivar as plantas aromáticas após o transplante (Capítulo 3), até a metade do copo. Na seqüência adicionou-se, ou não, os inóculos de FMA na porção intermediária dos copos, completando-se o volume dos mesmos com substrato estéril. Em seguida foram semeadas 6 sementes de citrangeiro ‘Troyer’ por copo plástico e, depois de 14 dias da germinação das mesmas, fez-se o desbaste deixando-se 1 plântula por vaso. Após dois meses de cultivo fez-se o transplante para sacos de polietileno preto de 4 litros, contendo o mesmo substrato utilizado nos copos.

O delineamento experimental adotado foi em blocos casualizados, em arranjo fatorial, com 10 plantas por parcela e 4 repetições.

Os tratamentos utilizados foram:

- 1- Inoculação com 10g de inóculo de *Acaulospora* sp. produzido em *Mentha piperita*;
- 2- Inoculação com 20g de inóculo de *Acaulospora* sp. produzido em *Mentha piperita*;
- 3- Inoculação com 10g de inóculo de *Glomus etunicatum* produzido em *Mentha piperita*;
- 4- Inoculação com 20g de inóculo de *Glomus etunicatum* produzido em *Mentha piperita*;
- 5- Testemunha, sem inoculação com FMA.

Após seis meses da inoculação das plantas com os FMA fez-se avaliação da matéria fresca e seca da parte aérea e das raízes, presença de estruturas do fungo no

sistema radicular (arbúsculos, vesículas, hifas), e colonização radicular por FMA, conforme metodologia descrita no Capítulo 3.

Para realização da análise de substâncias de reservas, as amostras de parte aérea (folhas e caule) e de raízes foram secas à 65°C até peso constante, foram moídas, separadamente, em moinho, acoplado com peneira de 20 malhas por polegada. De cada amostra coletou-se aproximadamente 1 g, as quais foram acondicionadas individualmente em saquinhos feitos com tela especial para filtragem de alimentos e, novamente levadas para estufa à 65 °C, até peso constante, anotando-se o peso de cada saquinho. Estes foram submetidos à digestão, segundo adaptações ao método descrito por Priestley (1965), apud Souza (1990). Este método tem a finalidade de extrair toda e qualquer substância de reserva e produtos sintetizados pelas plantas, tais como, carboidratos, gorduras, ácidos graxos, etc, permanecendo somente as fibras. As amostras foram colocadas em Erlenmeyer de 1 litro, contendo uma solução aquosa com 5% de ácido tricloroacético (99%) e 35% de metanol (99,8%), permanecendo sob aquecimento em bico de Bunsen, em capela com exaustor, por 8 horas. A partir da 3ª hora, até completar 8 horas, foi adicionada água destilada à solução, à medida que a mesma ia evaporando, visando manter sempre o mesmo volume de líquido, suficiente para manter as amostras imersas na solução.

Concluído o processo, as amostras foram lavadas com água destilada e postas novamente a secar em estufa, à 65°C, até peso constante. A diferença de peso das amostras antes e após a digestão consistiu o teor de substâncias de reserva que as amostras continham.

Na interpretação dos resultados, primeiramente verificou-se a premissa básica da ANOVA de normalidade e homocedasticidade através da análise dos gráficos de probabilidade normal de resíduos e de resíduos vs. valores preditos. Após, foi realizada

análise de variância, sendo a significância das diferenças entre as médias avaliada pelo teste de Duncan, através do programa estatístico SAS. Também, utilizou-se análise de regressão e correlação entre as variáveis estudadas. Os dados referentes a quantificação de estruturas de FMA nas raízes (presença de hifas, arbúsculos e vesículas) foram transformados pela aplicação da fórmula  $\sqrt{x + 1}$ , dada a presença de valores zero nos resultados, o que inviabiliza a realização da análise de variância.

#### **4.2.3 Experimento 3: Inoculação do porta-enxerto de pessegueiro 'Okinawa' com FMA.**

Este experimento foi implantado, conduzido e avaliado por José Luiz da Silva Nunes, dentro do seu projeto de Doutorado, porém, utilizando o inóculo de FMA produzido em plantas aromáticas estudado nesta Tese de Doutorado. Os dados parciais deste experimento, com a concordância do referido autor, estão sendo aqui utilizados para ratificar a eficiência dos inóculos produzidos em plantas aromáticas.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e em telado de sombrite (50%), situados no setor de Horticultura da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Eldorado do Sul, RS. Carços do porta-enxerto 'Okinawa' foram semeados em areia esterilizada, em geladeira a temperatura de 4 °C, em bandejas plásticas, visando interromper a dormência do embrião e facilitar a germinação, por um período de 90 dias. A areia foi previamente desinfestada em autoclave a 120 °C por uma hora. Logo após, quando os caroços começaram a se abrir, as sementes foram retiradas do caroço e semeadas em leito de areia, também previamente desinfestada em autoclave a 120°C por uma hora, situado em casa de vegetação.

Após ocorrer a germinação e emergência das plântulas, quando o epicótilo apresentava aproximadamente 5 cm de comprimento ( $\pm$  15 dias), as mesmas foram

repicadas para sacos plásticos pretos (5 litros), contendo substrato constituído de terra argilosa: areia: resíduo decomposto de casca de acácia negra (2:2:1, v:v:v). Esta fase foi conduzida em telado de sombrite (50%). A areia utilizada tinha granulometria média (entre 0,6 e 1 mm) semelhante à comumente empregada na construção civil. O solo utilizado na composição do substrato foi coletado na Estação Experimental de Eldorado do Sul, da UFRGS, na camada B. Este solo é caracterizado como ARGISSOLO VERMELHO Distrófico típico, unidade de mapeamento São Jerônimo (Embrapa, 1999). O resíduo decomposto de casca de Acácia-negra foi coletado em um depósito a céu aberto da empresa Ecocitrus, localizada no município de Montenegro, RS. Este material foi peneirado em malha de 5 mm, para uniformizar a sua granulometria. O substrato também foi previamente desinfestado com solução de formaldeído, 10%.

No momento da repicagem, as plantas receberam os respectivos tratamentos, constituídos da adição de 30 g do inoculante de três espécies de FMA, multiplicados em orégano (Capítulo 3) adicionado no terço médio do recipiente. Após a adição do inóculo o recipiente foi completado com substrato até a sua borda.

O delineamento experimental utilizado foi fatorial, em blocos casualizados, com 20 plantas por parcela e quatro repetições.

Os tratamentos aplicados para o porta-enxerto 'Okinawa' foram os seguintes:

- 1 - Testemunha, sem FMA;
- 2 - Inoculação com *Glomus clarum*;
- 3 - Inoculação com *Glomus etunicatum*;
- 4 - Inoculação com *Acaulospora sp.*

Após 360 dias da instalação do experimento, mediu-se a altura das plantas, do colo até o ápice da haste principal, o diâmetro da haste principal, na altura do colo, das 20 plantas de cada parcela. Para tanto, foi utilizada uma régua graduada e um paquímetro, da marca RS Baty, respectivamente. Para determinação da área foliar e da

colonização radicular com FMA foram coletadas 5 plantas por parcela e repetição e utilizou-se a mesma metodologia descrita no Capítulo 3 para plantas aromáticas.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Experimento 1: Inoculação de Porta-enxerto SO4 com FMA.

Na da Tabela 4.1 são apresentadas a altura da parte aérea, o número de folhas por planta e área foliar por planta de porta-enxertos de videira (SO4), inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados em três espécies de plantas aromáticas. Observa-se que, para altura, independentemente da planta medicinal utilizada como multiplicadora de FMA, as espécies *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum* propiciaram, na média, resultados significativamente superiores à testemunha, enquanto plantas inoculadas com *Acaulospora* sp. não diferiram dos demais tratamentos. Para número de folhas por planta não houve diferenças significativas entre os tratamentos, porém todas as espécies de FMA testadas induziram, na média, área foliar por planta superior à testemunha.

Os resultados da Tabela 4.1 indicam que os FMA propiciaram desenvolvimento vegetativo da parte aérea do porta-enxerto SO4 superior à testemunha, propriedade essa já verificada em porta-enxertos de videira por outros pesquisadores (Agostini, 2002; Carniel, 2004).

Por outro lado, esse melhor desenvolvimento vegetativo dos porta-enxertos micorrizados indicam que a colonização das raízes dos mesmos por FMA foi efetiva, o que pode ser comprovado, também, pela Tabela 4.2, onde constam os valores para presença de hifas, arbúsculos, vesículas e percentagem de colonização por FMA dos porta-enxertos de videira SO4.

TABELA 4.1 Altura da parte aérea, número de folhas e área foliar por planta de porta-enxertos de videira SO4, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.

		Altura (cm)				
		Espécie de FMA				
Planta Aromática		<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	Testemunha	Média
<i>Origanum vulgare</i>		53,1	61,8	55,8		56,9
<i>Mentha piperita</i>		56,5	55,0	55,7		55,7
<i>Mellissa officinalis</i>		55,1	56,8	45,0		52,3
Média		54,9 a	57,8 a	52,1 ab	49,7 b	

		Número de folhas/planta				
		Espécie de FMA				
Planta Aromática		<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	Testemunha	Média
<i>Origanum vulgare</i>		12,2	12,1	12,4		12,2
<i>Mentha piperita</i>		12,8	12,5	12,4		12,6
<i>Mellissa officinalis</i>		12,0	12,3	11,5		11,9
Média		11,1	11,1	12,1	11,1	

		Área foliar (cm <sup>2</sup> )				
		Espécie de FMA				
Planta Aromática		<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	Testemunha	Média
<i>Origanum vulgare</i>		957,2	958,0	1114,4		1009,9
<i>Mentha piperita</i>		963,7	1014,5	994,2		990,8
<i>Mellissa officinalis</i>		1029,2	1074,9	924,2		1009,4
Média		983,4 a	1015,8 a	1010,9 a	723,5 b	

Médias seguidas de mesma letra, letra minúscula na Coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Através da Tabela 4.2, verifica-se que não houve diferenças significativas entre as espécies de FMA, para hifas, vesículas, arbúsculos e percentagem de colonização do sistema radicular de SO4. Entre as espécies de plantas aromáticas multiplicadoras do inóculo, verifica-se que *Mellissa officinalis* propiciou um número de hifas significativamente superior a *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* e uma quantidade de vesículas significativamente superior a *Origanum vulgare*. *Mentha piperita* propiciou um número superior de hifas em relação à *Origanum vulgare*, porém não diferiu desta em relação ao número de vesículas. Para percentagem de colonização do sistema radicular e presença de arbúsculos nas raízes de SO4, não houve diferenças significativas entre as espécies aromáticas multiplicadoras de FMA.

TABELA 4.2 Presença de estruturas de FMA (hifas, arbúsculos, vesículas) e colonização das raízes de porta-enxertos de videira SO4, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.

Hifas <sup>(1)</sup>					
Planta Aromática	Espécie de FMA			Testemunha	Média
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.		
<i>Origanum vulgare</i>	0,67	0,83	0,92		0,81 C
<i>Mentha piperita</i>	0,92	1,33	1,33		1,19 B
<i>Mellissa officinalis</i>	1,75	1,75	1,5		1,67 A
Média	1,2 a	1,34 a	1,27 a	0,23 b	

Arbúsculos <sup>(2)</sup>					
Planta Aromática	Espécie de FMA			Testemunha	Média
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.		
<i>Origanum vulgare</i>	0,8	1,42	0,87		1,03
<i>Mentha piperita</i>	0,92	1,03	1,17		1,04
<i>Mellissa officinalis</i>	1,42	1,17	1,17		1,25
Média	1,04 a	1,21 a	1,07 a	0,18 b	

Vesículas <sup>(3)</sup>					
Planta Aromática	Espécie de FMA			Testemunha	Média
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.		
<i>Origanum vulgare</i>	0,42	1	0,42		0,61 B
<i>Mentha piperita</i>	0,42	1	1,5		0,97 AB
<i>Mellissa officinalis</i>	1,67	1,58	1,5		1,8 A
Média	0,83 b	1,19 a	1,14 ab	0 c	

Colonização <sup>(4)</sup> (%)					
Planta Aromática	Espécie de FMA			Testemunha	Média
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.		
<i>Origanum vulgare</i>	75,67	82,33	77,33		78,47
<i>Mentha piperita</i>	79,67	82,33	79,67		80,56
<i>Mellissa officinalis</i>	82,33	86,67	82,33		83,78
Média	79,22 a	83,78 a	79,78 a	17,33 b	

Médias seguidas de mesma letra, letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

<sup>(1)</sup>Índice de presença de hifas de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de hifas de FMA ; 1 = escasso desenvolvimento de hifas de FMA ; 2 = desenvolvimento moderado de hifas de FMA; 3 = intenso desenvolvimento de hifas.

<sup>(2)</sup>Índice de presença de arbúsculos de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de arbúsculo no segmento de raiz; 1 = presença de 1 até 50 arbúsculos por segmento de raiz;

2 = presença de 51 até 100 arbúsculos por segmento de raiz; 3 = presença de mais de 100 arbúsculos por segmento de raiz.

<sup>(3)</sup> Índice de presença de vesículas de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de vesículas no segmento de raiz; 1 = presença de 1 até 50 vesículas por segmento de raiz; 2 = presença de 51 até 100 vesículas por segmento de raiz; 3 = presença de mais de 100 vesículas por segmento de raiz.

<sup>(4)</sup> Porcentagem de colonização de raízes por FMA = divisão do número de segmentos de raízes colonizados (hifas, arbúsculos ou vesículas) pelo número total de segmentos de raízes observadas.

As plantas aromáticas permitiram boas percentagens de colonização do sistema radicular de SO4, todas acima de 75%. No entanto, a intensidade de colonização, dada pelos índices de presenças de hifas, arbúsculos e vesículas nas raízes desta planta, não foram elevadas para as plantas que foram colonizadas a partir de inóculos produzidos em orégano e hortelã pimenta. Já verificou-se em trabalho anterior (Silveira, 1999) que a infectividade na fase de porta-enxerto não é muito elevada, porém com o passar do tempo, já na fase de muda enxertada, os índices de presença de arbúsculos, hifas e vesículas se intensificam. É provável que o mesmo tenha ocorrido com o porta-enxerto SO4 micorrizado com inóculo de orégano e hortelã pimenta, sendo necessário mais tempo de colonização do sistema radicular para apresentar uma intensidade mais elevada dessas estruturas.

Nesse sentido, os resultados indicam que inóculos de *Glomus clarum*, *Glomus etunicatum* e *Acaulopsora* sp. produzidos em melissa apresentam uma maior velocidade de formação de hifas do sistema radicular de SO4, em relação aos inóculos produzidos em orégano e hortelã pimenta e maior velocidade de formação de vesículas em relação aos inóculos produzidos em orégano.

Importante ressaltar que, analisando-se as percentagens de colonização das raízes por FMA de todas as espécies testadas e os resultados de área foliar destes tratamentos, encontrou-se uma correlação significativa a 5% de probabilidade e com um coeficiente de correlação igual a 62, entre percentagem de colonização e área foliar. Portanto, 62% da área foliar do porta-enxerto SO4 é devido ao efeito da colonização por FMA, confirmando que estes fungos induziram maior desenvolvimento vegetativo da parte aérea em SO4.

Na Tabela 4.3 apresenta-se as quantidades de N, P e K na parte aérea de porta-enxerto SO4 inoculados ou não com FMA. Não verificou-se diferenças

significativas nos teores destes nutrientes entre os tratamentos testados. Talvez pelo bom nível de nutrientes do substrato (tabela em anexo) e pelo curto tempo de cultivo dos porta-enxertos até a data da avaliação, os FMA não tenham propiciado um aumento significativo no conteúdo destes nutrientes na parte aérea das plantas. Importante ressaltar, no entanto, que plantas inoculadas com *Glomus etunicatum* tenderam em apresentar maior conteúdo destes macronutrientes na parte aérea em relação aos demais tratamentos.

TABELA 4.3 Quantidade de N, P, K (mg/planta) na parte aérea de porta-enxertos de videira SO<sub>4</sub>, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.

N				
Planta Aromática Multiplicadora	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora sp.</i>	
<i>Origanum vulgare</i>	16,15	17,65	17,37	
<i>Mentha piperita</i>	15,88	17,04	15,89	
<i>Mellissa officinalis</i>	16,85	19,35	15,44	
Média	16,29	18,01	16,23	16,29

P				
Planta Aromática Multiplicadora	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora sp.</i>	
<i>Origanum vulgare</i>	1,33	1,32	1,25	
<i>Mentha piperita</i>	1,16	1,23	1,25	
<i>Mellissa officinalis</i>	1,19	1,39	1,05	
Média	1,23	1,31	1,18	1,24

K				
Planta Aromática Multiplicadora	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora sp.</i>	
<i>Origanum vulgare</i>	9,13	9,56	9,03	
<i>Mentha piperita</i>	7,33	8,86	8,61	
<i>Mellissa officinalis</i>	8,42	10,06	8,03	
Média	8,29	9,49	8,56	8,47

Através da Tabela 4.4 observa-se que não houve diferenças significativas entre tratamentos para os conteúdos nutricionais de Ca, Mg e S na parte aérea do porta-enxerto SO<sub>4</sub>.

TABELA 4.4 Quantidade de Ca, Mg e S (mg/planta) na parte aérea de porta-enxertos de videira SO<sub>4</sub>, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de espécies de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.

Ca				
Planta Aromática Multiplicadora	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora sp.</i>	
<i>Origanum vulgare</i>	11,94	13,24	11,81	
<i>Mentha piperita</i>	11,60	13,93	11,12	
<i>Mellissa officinalis</i>	12,64	13,93	11,12	
Média	12,06	13,70	11,35	11,73

Mg				
Planta Aromática Multiplicadora	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora sp.</i>	
<i>Origanum vulgare</i>	2,74	2,87	2,71	
<i>Mentha piperita</i>	2,62	2,74	2,52	
<i>Mellissa officinalis</i>	2,74	3,10	2,47	
Média	2,70	2,90	2,57	2,61

S				
Planta Aromática Multiplicadora	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora sp.</i>	
<i>Origanum vulgare</i>	2,11	1,98	1,88	
<i>Mentha piperita</i>	1,83	1,57	1,88	
<i>Mellissa officinalis</i>	1,96	2,01	1,48	
Média	1,97	1,85	1,75	1,89

Esperava-se encontrar conteúdos significativamente superiores de macronutrientes na parte aérea das plantas micorrizadas, especialmente de P. As hifas micorrízicas externas às raízes funcionam como extensão do sistema radicular, aumentando sua capacidade em explorar maior volume de solo. Estas hifas podem atingir até 8 cm além da superfície da raiz, possibilitando a absorção daqueles nutrientes de baixa mobilidade, além da zona de depleção. Esta capacidade de aumento na absorção de nutrientes é responsável pelo aumento no crescimento da planta. Vários autores destacam a importância dos FMA na absorção de P, principalmente, em condições tropicais, onde os solos apresentam baixos teores de P disponível, devido a

sua alta capacidade de fixação nos colóides do solo (Rosand & Dias, 1985; Colozzi-Filho & Balota, 1994). Através da Tabela 4.5 observa-se que este efeito de maior absorção de nutrientes pelas plantas micorrizadas ocorreu, neste experimento, com os micronutrientes.

TABELA 4.5 Quantidade de Zn, Fe, Mn e B (mg/planta) na parte aérea de porta-enxertos de videira SO4, inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 105 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.

Zn				
Planta Aromática	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	
<i>Origanum vulgare</i>	0,11	0,13	0,10	
<i>Mentha piperita</i>	0,10	0,13	0,11	
<i>Mellissa officinalis</i>	0,11	0,16	0,10	
Média	0,11 b	0,14 a	0,10 b	0,11 b
Fe				
Planta Aromática	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	
<i>Origanum vulgare</i>	1,26	1,45	1,17	
<i>Mentha piperita</i>	1,08	1,30	1,25	
<i>Mellissa officinalis</i>	1,26	1,42	0,98	
Média	1,20 b	1,40 a	1,13 c	1,13 c
Mn				
Planta Aromática	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	
<i>Origanum vulgare</i>	0,78	0,85	0,72	
<i>Mentha piperita</i>	0,71	0,80	0,65	
<i>Mellissa officinalis</i>	0,67	0,94	0,67	
Média	0,72 b	0,86 a	0,68 b	0,94 a
B				
Planta Aromática	Espécie de FMA			Testemunha
	<i>Glomus clarum</i>	<i>Glomus etunicatum</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	
<i>Origanum vulgare</i>	0,33	0,40	0,33	
<i>Mentha piperita</i>	0,31	0,31	0,30	
<i>Mellissa officinalis</i>	0,33	0,39	0,35	
Média	0,32 b	0,37 a	0,33 b	0,32 b

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Observa-se que *Glomus etunicatum* induziu maior absorção de Zn em relação aos demais tratamentos. *Glomus etunicatum* e *Glomus clarum* induziram maior absorção de Fe em relação à testemunha. *Glomus etunicatum* induziu maior absorção de

B em relação à testemunha e aos demais tratamentos. Em concordância com estes resultados, Silveira (1992), cita que os FMA possibilitam uma maior absorção de outros nutrientes, além do P, que movimentam-se também por difusão e que são, portanto, de baixa mobilidade. Como exemplo, este autor cita os elementos Zn, Cu, Ca, S, Br, I, Cl, Al, Si (Tabela 4.5).

Em relação ao Mn esta tendência não foi observada, com a Testemunha apresentando, inclusive, quantidades mais elevadas deste nutrientes em relação às plantas colonizadas por *Acaulospora* sp. e *Glomus etunicatum*. Pode-se imaginar que isso ocorra por ser este um metal pesado, já que diversos autores afirmam que os FMA podem “proteger” as plantas micorrizadas de efeitos tóxicos dos metais pesados (Al, Mn, Zn, Cd, Cu, Pb) no solo (González-Chávez et al., 2003) ou induzir tolerância à planta a estes elementos (Pouyú et al., 1998; Vivas et al., 2003; González-Guerrero, 2005). González-Chávez et al. (2003), estudaram a função da glicoproteína insolúvel, Glomalina, produzida pelas hifas dos fungos micorrízicos, no seqüestro de elementos potencialmente tóxicos (PTEs), denominação também utilizada para metais pesados. Os autores concluíram que a glomalina pode ser considerada uma substância bioestabilizadora em solos poluídos, pois retém PTEs. No entanto, não existem dados suficientes neste trabalho para comprovar que os FMA protegeram as plantas dos metais pesados.

Para comprovar este efeito, faz-se necessário a realização de um experimento de porta-enxertos inoculados com várias espécies de FMA e cultivados em substrato contaminado e não contaminado por metais pesados. Através de análises nutricionais nos tecidos dos porta-enxertos e nos respectivos substratos, além das análises de desenvolvimento vegetativo, é possível saber quais espécies de FMA são eficientes em induzir resistência aos metais pesados e por quanto tempo.

### 4.3.2 Experimento 2: Influência da quantidade de inóculo de FMA sobre o crescimento do citrangeiro ‘Troyer’.

Através da Tabela 4.6 visualiza-se a altura da parte aérea, matéria seca da parte aérea e de raízes e o conteúdo em substâncias de reserva da parte aérea e de raízes do citrangeiro ‘Troyer’ inoculado ou não com FMA. Nem as espécies de FMA, nem a quantidade de inóculo influenciaram significativamente sobre a altura do citrangeiro ‘Troyer’.

TABELA 4.6 Altura da parte aérea, matéria seca da parte aérea e de raízes e conteúdo em substâncias de reserva da parte aérea e de raízes do citrangeiro ‘Troyer’, inoculados com 2 espécies de FMA multiplicados em hortelã pimenta, aos 145 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.

Espécie de FMA	Altura/planta (cm)			Matéria seca da parte aérea(g)		
	Quantidade de inóculo <sup>(1)</sup>			Quantidade de inóculo <sup>(1)</sup>		
	10 g	20 g	Média	10 g	20 g	Média
<i>Glomus etunicatum</i>	12,74	13,92	13,33	0,38	0,36	0,37 A
<i>Acaulospora sp.</i>	14,02	13,72	13,87	0,25	0,26	0,25 B
Testemunha			12,74			0,36 A
Média	13,97	14,14		0,31	0,31	

Espécie de FMA	Matéria seca de raízes (cm)		
	Quantidade de inóculo <sup>(1)</sup>		
	10 g	20 g	Média
<i>Glomus etunicatum</i>	0,14	0,16	0,15
<i>Acaulospora sp.</i>	0,12	0,11	0,12
Testemunha			0,16
Média	0,15	0,13	

Espécie de FMA	Substâncias de reserva (g/planta)					
	Parte aérea			Raízes		
	Quantidade de inóculo <sup>(1)</sup>			Quantidade de inóculo <sup>(1)</sup>		
	10 g	20 g	Média	10 g	20 g	Média
<i>Glomus etunicatum</i>	14,52	15,95	15,23 A	4,52	4,27	4,39
<i>Acaulospora sp.</i>	10,71	12,53	11,62 B	3,72	3,53	3,62
Testemunha			12,92 AB			5,41
Média	13,11	14,24		4,12	3,90	

Médias seguidas de mesma letra, letra maiúscula na coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan. <sup>(1)</sup>Inóculo seco à sombra.

Em relação a matéria seca da parte aérea (Tabela 4.6), porta-enxertos inoculados com *Acaulospora sp.* apresentaram resposta inferior à *Glomus etunicatum* e à Testemunha, sendo que estes dois últimos tratamentos não diferiram entre si para esta

variável. Não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos para matéria seca de raízes, apesar da testemunha apresentar uma ligeira superioridade.

Plantas inoculadas com *Glomus etunicatum* apresentaram um conteúdo em substâncias de reserva superior às plantas inoculadas com *Acaulospora* sp., sendo que a testemunha não diferiu entre estes dois tratamentos. Verifica-se a tendência de plantas inoculadas com 20 g de inóculo de *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp. apresentarem maior conteúdo em substâncias de reserva em relação às plantas inoculadas com 10 g, mesmo que não seja estatisticamente significativo. Para o conteúdo de substâncias de reservas nas raízes do citrangeiro ‘Troyer’ não houve diferenças significativas, no entanto a testemunha apresentou uma tendência de melhor resposta para esta variável em relação às plantas inoculadas com *Glomus etunicatum* e *Acaulospora* sp.

Souza et al. (2003) inocularam citrangeiro ‘Troyer’ com *Glomus clarum* e com *Acaulospora scrobiculata*, cultivado em dois substratos distintos (S1: solo + areia, 1:1, v:v; S2: solo + areia + resíduo decomposto de casca de Acácia- negra, 2:2:1, v:v:v). Os autores verificaram que somente para àqueles porta-enxertos cultivados no substrato mais pobre nutricionalmente (S1) houve efeito dos FMA em promover maior desenvolvimento vegetativo da parte aérea e de raízes em citrangeiro ‘Troyer’ e somente a espécie *Acaulospora scrobiculata* propiciou este efeito. Importante salientar que o substrato utilizado neste experimento possui uma constituição semelhante ao substrato S2, do referido trabalho.

Portanto, o mais provável é que o bom conteúdo nutricional do substrato tenha possibilitado um bom desenvolvimento do sistema radicular do citrangeiro ‘Troyer’ diminuindo sua dependência micorrízica para absorver água e nutrientes e o efeito dos FMA em propiciar maior desenvolvimento vegetativo das plantas colonizadas.

Em mudas micorrizadas o mais comum é um maior desenvolvimento

vegetativo da parte aérea em detrimento do sistema radicular, pois este tende a translocar nutrientes e água para a parte aérea. Em contrapartida, a parte aérea realiza mais fotossíntese e envia fotoassimilados para o sistema radicular, onde os FMA gastam na produção de estruturas (arbúsculos e vesículas) e de hifas, as quais não são totalmente detectadas na pesagem, pois há perdas das raízes mais finas no processo de lavagem das raízes antes da pesagem. Dessa forma, espera-se que a relação peso seco de raízes/peso seco da parte aérea seja menor em mudas inoculadas com FMA em relação às plantas não inoculadas. Neste trabalho, isso se verifica, utilizando-se os dados da Tabela 20, para plantas inoculadas com *G. etunicatum*, porém não se verifica para plantas inoculadas com *Acaulospora* sp.

Através da Tabela 4.7 verifica-se elevada intensidade de hifas e arbúsculos de *Glomus etunicatum* e de *Acaulospora* sp. em raízes do citrangeiro ‘Troyer’, tanto para aplicação de 10 quanto de 20 g de inóculo. Também são verificadas boas percentagens de colonização do sistema radicular do porta-enxerto para as duas espécies de FMA testadas. A presença de vesículas nas raízes do porta-enxerto não foi elevada, porém essa é uma estrutura de reserva de lipídios deste fungo e, existem espécies de alguns gêneros de FMA, como *Gigaspora* e *Scutelospora* (Siqueira, 1994), que sequer as formam, sem comprometer, com isso, o processo de colonização. Portanto, não são imprescindíveis para o processo de simbiose entre o colonizador e o hospedeiro. Além disso, algumas espécies necessitam de mais tempo para formar estas estruturas de reserva (Siqueira & Franco, 1988).

TABELA 4.7 Presença de estruturas de FMA (Hifas, Arbúsculos, Vesículas) e colonização das raízes de porta-enxertos de citros (citrangueiro ‘Troyer’), inoculados com 3 espécies de FMA multiplicados a partir de plantas aromáticas, aos 145 dias após a inoculação. Porto Alegre, RS. 2004.

Espécie de FMA	Arbúsculo <sup>(1)</sup>			Hifa <sup>(2)</sup>		
	Quantidade de inóculo <sup>(2)</sup>			Quantidade de inóculo <sup>(2)</sup>		
	10 g	20 g	Média	10 g	20 g	Média
<i>Glomus etunicatum</i>	2,40	2,68	2,54 A	1,35	1,51	1,55 A
<i>Acaulospora sp.</i>	2,73	2,60	2,66 A	1,66	1,44	1,55 A
Testemunha			0,70 B			0,62 B
Média	2,56	2,64		1,51	1,47	

Espécie de FMA	Vesícula <sup>(3)</sup>			Colonização (%) <sup>(4)</sup>		
	Quantidade de inóculo <sup>(2)</sup>			Quantidade de inóculo <sup>(2)</sup>		
	10 g	20 g	Média	10 g	20 g	Média
<i>Glomus etunicatum</i>	0,05	0,11	0,08 B	81,75	82,25	82,00 A
<i>Acaulospora sp.</i>	0,36	0,27	0,31A	87,0	83,0	85,00 A
Testemunha			0			16,75 B
Média	0,21	0,19		84,37	82,62	

Médias seguidas de mesma letra, letra maiúscula na coluna e minúscula na Coluna, não diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

<sup>(1)</sup>Índice de presença de arbúsculos de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de arbúsculo no segmento de raiz; 1 = presença de 1 até 50 arbúsculos por segmento de raiz;

2 = presença de 51 até 100 arbúsculos por segmento de raiz; 3 = presença de mais de 100 arbúsculos por segmento de raiz.

<sup>(2)</sup>Índice de presença de hifas de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de hifas de FMA ; 1 = escasso desenvolvimento de hifas de FMA ; 2 = desenvolvimento moderado de hifas de FMA; 3 = intenso desenvolvimento de hifas.

<sup>(3)</sup> Índice de presença de vesículas de FMA, segundo Nemeç (1992):

0 = inexistência de vesículas no segmento de raiz; 1 = presença de 1 até 50 vesículas por segmento de raiz;

2 = presença de 51 até 100 vesículas por segmento de raiz; 3 = presença de mais de 100 vesículas por segmento de raiz.

<sup>(4)</sup> Porcentagem de colonização de raízes por FMA = divisão do número de segmentos de raízes colonizados (hifas, arbúsculos ou vesículas) pelo número total de segmentos de raízes observadas.

Verifica-se a não significância do efeito da quantidade de inóculo na presença de estruturas de FMA e na percentagem de colonização de raízes do citrangeiro ‘Troyer’ por *Glomus etunicatum* e *Acaulospora sp.* Como também não houve diferenças no desenvolvimento vegetativo da parte aérea do citrangeiro ‘Troyer’ entre a aplicação de 10 ou 20 g de inóculo, conclui-se que o melhor é a aplicação de 10 g de inóculo destas duas espécies de FMA, visando reduzir gastos com as quantidades necessárias a serem produzidas de inóculo de FMA (Tabela 4.7).

A resposta de crescimento da planta à simbiose com FMA pode ter relação com a proporção de micélio fúngico intra e extraradicular, o que, por sua vez, pode

estar relacionado à espécie do FMA. Dessa forma, mesmo que haja uma grande colonização intrarradicular, pode ocorrer uma baixa eficiência simbiótica decorrente da ausência de micélio extrarradicular suficiente para explorar o substrato.

Nogueira et al. (1998) avaliaram a produção de micélio externo por duas espécies de FMA, em mutualismo com soja, e verificaram que *Gigaspora margarita* Becker & Hall produziu menor quantidade de micélio externo e apresentou menor eficiência micorrízica em relação à *Glomus intraradices*. Uma análise de correlação indicou alta correlação entre produção de micélio externo e percentagem de colonização radicular para *G. margarita* ( $r = 0,90$ ) e para *G. intraradices* ( $r = 0,89$ ). Também houve boa correlação entre micélio externo dos FMA e a eficiência relativa da micorrização ( $r = 0,60$ ). Portanto, a boa fertilidade do substrato pode ter inibido o desenvolvimento do micélio extraradical do citrangeiro ‘Troyer’ micorrizado, prejudicando a proporção micélio fúngico intra e extraradicular.

Em virtude disso, e mesmo apresentando elevada percentagem de colonização, citrangeiro ‘Troyer’ micorrizado não apresentou desenvolvimento vegetativo superior aqueles não micorrizados.

#### 4.3.3 Experimento 3: Inoculação do porta-enxerto ‘Okinawa’ com FMA.

As avaliações deste experimento foram realizadas por José Luiz da Silva Nunes.

Dentre os porta-enxertos avaliados o pessegueiro foi o que mostrou uma maior dependência com as espécies de FMA produzidas em orégano (Tabela 4.8). O referido porta-enxerto quando inoculado com *Acaulospora* sp., *Glomus clarum* ou *Glomus etunicatum* apresentou maior altura, maior diâmetro e maior área foliar em relação à testemunha, confirmando a eficiência do inóculo aqui estudado.

TABELA 4.8 Altura, diâmetro do caule e área foliar do porta-enxerto de pessegueiro cv. Okinawa no momento da enxertia (360dias), inoculados com três espécies de FMA multiplicados em orégano (*Origanum vulgare*). Porto Alegre, RS. 2004.

Tratamentos	Altura (cm)	Diâmetro (mm)	Área foliar (cm <sup>2</sup> /planta)
<i>Acaulospora</i> sp.	136,21 a	8,22 a	879,78 a
<i>Glomus clarum</i>	126,63 bc	7,67 b	739,82 b
<i>Glomus etunicatum</i>	129,04 b	7,75 b	764,31 b
Testemunha	119,23 d	7,24 c	657,14 c

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

Dentre as espécies de FMA a mais eficiente foi *Acaulospora* sp, repetindo o verificado com o porta-enxerto de videira SO4 (Tabela 4.1), onde esta espécie de FMA multiplicada em orégano apresentou melhores resultados em termos de número de folhas por planta e área foliar do que as espécies *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*. Esses dados podem indicar uma maior afinidade de orégano com *Acaulospora* sp., em relação às outras duas espécies de FMA. Os dados de colonização radicular, esporos e de estruturas de FMA (Figura 4.1, 4.2 e 4.3) em ‘Okinawa’, confirmam esta hipótese, onde *Acaulospora* sp. promoveu um maior colonização, número de esporos, hifas, vesículas e arbúsculos.

No entanto, as três espécies de FMA apresentaram excelentes percentagens de colonização e presença de esporos nas raízes do porta-enxerto ‘Okinawa’. Confirmando, mais uma vez, a eficiência destes inóculos (Figuras 4.1 e 4.2).

A través da Figura 4.3 observa-se, também, que as três espécies de FMA multiplicadas em orégano apresentaram boa intensidade de hifas, vesículas e arbúsculos nas raízes do porta-enxerto ‘Okinawa’, ratificando a eficiência destes inóculos.

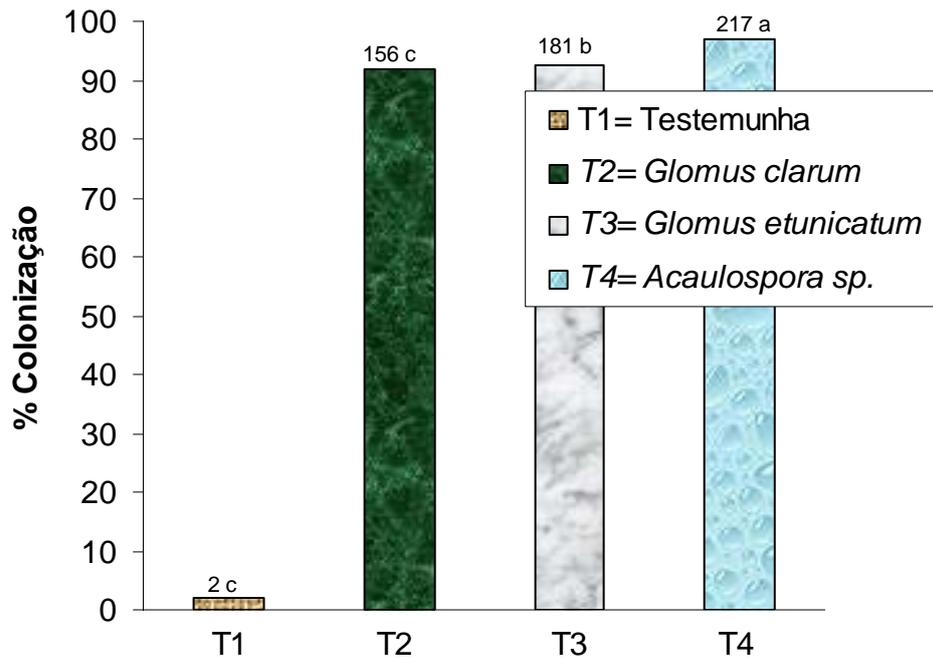


FIGURA 4.1 Colonização radicular (%) por espécie de FMA (*Acaulospora sp.*, *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*) de plantas dos porta-enxertos de pessegueiro cv. Okinawa, no momento da enxertia (360 dias). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

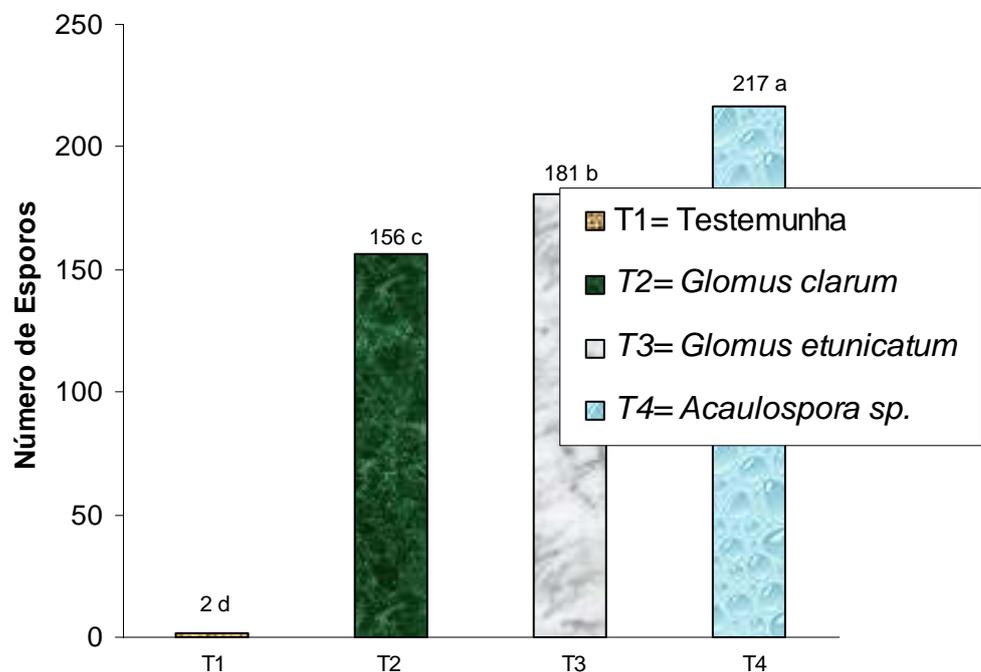


FIGURA 4.2 Número de esporos/100g de substrato por espécie de FMA (*Acaulospora sp.*, *Glomus clarum* e *Glomus etunicatum*) de plantas dos porta-enxertos de pessegueiro cv. Okinawa, no momento da enxertia (360 dias). Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

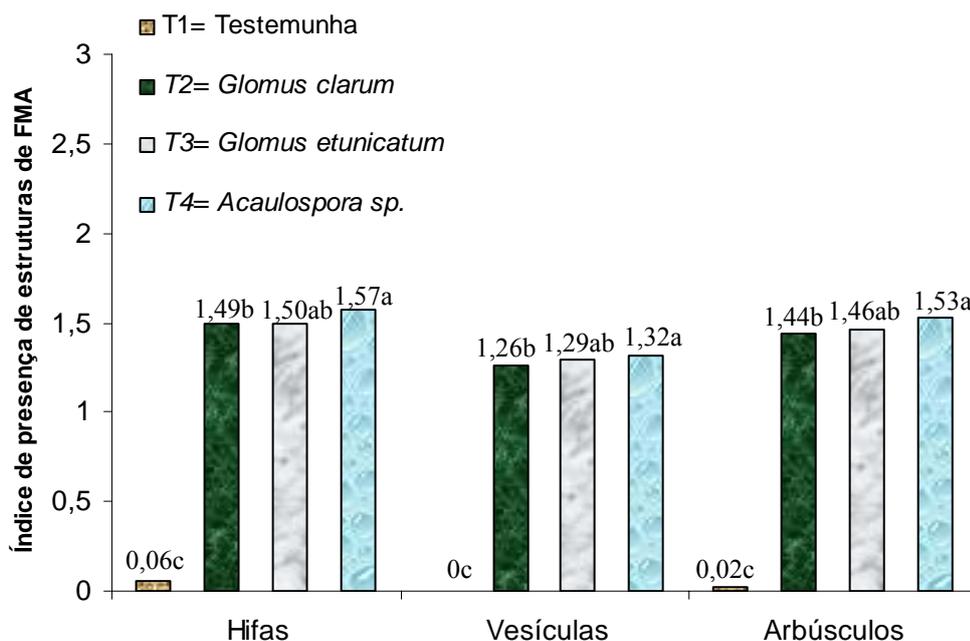


FIGURA 4.3 Hifas, vesículas e arbúsculas presentes no sistema radicular de plantas dos porta-enxertos de pessegueiro cv. Okinawa, no momento da enxertia (360 dias). Médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Duncan ao nível de 5% de significância.

Os resultados obtidos com os porta-enxertos de plantas frutíferas deste capítulo indicam que as plantas aromáticas poderão ser utilizadas futuramente para multiplicar as espécies autóctones de FMA de parreirais da Serra Gaúcha identificadas nesta Tese, permitindo assim, a inoculação de porta-enxertos de videira com estes fungos. Tudo indica que, além da videira, este protocolo de produção de FMA e inoculação em porta-enxertos poderá ser utilizado em outras espécies de plantas frutíferas, já que os inóculos de FMA produzidos em plantas aromáticas (Capítulo 3) também colonizaram com eficiência porta-enxertos de citros e de pessegueiro. Todavia, deve-se levar em consideração que há graus diferenciados de afinidade entre os FMA e as espécies de plantas hospedeiras, sendo necessários estudos prévios para escolha da melhor combinação de espécies destes dois simbiontes.

#### **4.4 CONCLUSÕES**

Há viabilidade de uso de inóculos de FMA produzidos a partir de plantas aromáticas na produção de mudas frutíferas.

A eficiência dos FMA é variável com a espécie de fungo e do hospedeiro.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES GERAIS

A caracterização de espécies de FMA nos parreirais da Serra Gaúcha é mais exata com a utilização em conjunto dos métodos morfológico e molecular.

A análise molecular de maior eficiência na caracterização dos FMA é o seqüenciamento do rDNA 18S de esporos em comparação com o teste TTGE.

*Origanum vulgare*, *Mentha piperita* e *Melissa officinalis* podem ser utilizadas como plantas multiplicadoras das espécies de FMA *Glomus clarum*, *Acaulospora* sp. e *Glomus etunicatum*.

A influência dos FMA no desenvolvimento vegetativo de *Origanum vulgare*, *Mentha piperita* e *Melissa officinalis* varia de acordo com a espécie inoculada deste fungo.

Os inóculos testados colonizaram com eficiência, apesar de diferentes intensidade, as raízes de porta-enxertos de videira (cv. SO4), de citros (citrangeiro 'Troyer') e de pessegueiro (cv. Okinawa).

## CAPÍTULO VI

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA FAPESP. **Orégano, a erva do bem**. Disponível em: <<http://www.agencia.fapesp.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2005.
- AGOSTINI, S. **Fungos micorrízicos arbusculares e o desenvolvimento vegetativo de porta-enxerto de videira**. 2002. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- ALLEN, M.F. **The ecology of mycorrhizae**. San Diego: Cambridge University Press, 1991. 184p.
- ALVES, A.A.C.; WEBER, O.B.; SIEVERDING, E. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em áreas sob cultivo de mandioca. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FAEPE, 1989. p. 44.
- APEX. **Brasil reforça participação no mercado mundial de vinhos**. Disponível em: <<http://www.ccfb.com.br/publicacoes/noticias/00004.php>>. Acesso em: 3 jan. 2006.
- ÁVILA, A.L. **Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em cultivos de videira (*Vitis* sp.)**. 2004. 59f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.68, 1997. p. 1-24.
- BAGO, B.; AZCÓN-AGUILAR C, PICHE, Y. Architecture and developmental dynamic of the external mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices* grown under monoxenic conditions. **Mycologia**, New York, v.90, p. 52-62, 1998a.

- BAGO, B.; AZCÓN-AGUILAR, C.; GOULET, A. et al. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 139, p. 375-388, 1998b.
- BAGO, B.; PFEFFER, E.P.; ABUBAKER, J.; JUN, J. et al. Carbon Export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. **Plant Physiology**, Rockville, v. 131, p. 1496-1507, 2003.
- BAGO, B.; CANO, C. Breaking Myths on Arbuscular Mycorrhizas in Vitro Biology. In: DECLERCK, S. ed. **Soil Biology**. Berlin: Springer-Verlag, 2005. v.4. p. 112-138.
- BAREA, J.M.; AZCÓN, R.; AZCÓN-AGUILAR, C. 2005. Interactions Between Mycorrhizal Fungi and Bacteria to Improve Plant Nutrient Cycling and Soil Structure. In: BUSCOT, F.; VARMA, A. (Eds.) **Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions**. Berlin: Springer-Verlag, 2005. p. 195-212.
- BERBARA, R. L.L.; FONSECA, H.M.A.C. Colonização Radicular e Esporulação de Fungos Micorrízicos Arbusculares In Vitro. In: SIQUEIRA, J. O. (Ed.) **Avanços em Fundamentos e Aplicação de Micorrizas**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. p. 39-66.
- BERCH, S.M.; TRAPPE, J.M. A new species of endogonaceae, *Glomus hoi*. **Mycologia**, New York, v.77, n.4, p. 654-657, 1985.
- BLANCO, R.A. **Melissa**. Disponível em: <http://www.jardimdeflores.com.br/ervas/a23melissa.html>>. Acesso em: 15 jan. 2006.
- BLASZKOWSKI, J. **Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), Endogono and Complexipes species deposited in the Department of plant Pathology**. Homepage: Disponível em: <<http://www.agro.ar.szczecin.pl/~jblaszkowski/>>. Acesso em: 10 nov. 2005.
- BLASZKOWSKI, J. Polish endogonaceae. VII. *Acaulospora capsicula* sp. nov. **Mycologia**, New York, v.82, n. 6, p. 794-798, 1990.
- BIO-RAD LABORATORIES. **The DCode™ Universal Mutation Detection System**. [S.L.], 1996. 76p. (Catálogo número 170-9080 até 170-9104).
- BONONI, V.L.R.; GRANDI, R.A.P.; LOPES, S.A.R.; RODRIGUES, E.; FONSECA, M.P. Micorrizas vesículo-arbusculares em *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) O. Kuntze. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FAEPE, 1989. p. 42.
- BÜTTENBENDER, D. **Utilização de fungos micorrízicos arbusculares em porta-enxertos de videira**. 2001. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- CABELLO, M.N. Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from hydrocarbon polluted soils. **Journal Basic Microbiology**, Weinheim, v. 39, n.2, p. 89-95, 1999.

- CABELLO, M.N; IRRAZABAL, G.; BUCSINSZKY, A.M. et al. Effect of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, and a rock-phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium thomii*, on *Mentha piperita* growth in a soilless medium. **Journal of Basic Microbiology**, Weinheim, v. 45, n.3, p.182-189, 2005.
- CARDONO, J.T. **Produção in vitro de fungos micorrízicos arbusculares em raízes de tomateiro**. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- CARDOSO, E. J.B.N.; LAMBAIS, M.R. Aplicações práticas de Micorrizas Vesículo-Arbusculares (MVA). In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: S.B.C.S., 1992. p. 257-282.
- CARNIEL, E. **Controle biológico de *Fusarium sp.* em porta-enxertos de videira pelo uso de fungos micorrízicos**. 2004. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- CAUS, M. Gaúchos projetam a safra de 2025. **Jornal Pioneiro**, Caxias do Sul, 24 set. 2005. Indicadores Econômicos, p. 8.
- CALVET, C.; BAREA, J.M.; PERA, J. In Vitro Interactions Between the Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae* and Some Saprophytic Fungi Isolated From Organic Substrates. **Soil Biology Biochemistry**, Elmsford, v.24, n.8, p.775-780, 1992.
- CHU, E.Y.; ENDO, T.; STEIN, R.L.B. et al. Avaliação da inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares sobre a incidência da Fusariose da Pimenta-do-Reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.205-208, 1997.
- COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E. L. Micorrizas Arbusculares. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. (Eds.) **Manual de Métodos Empregados em Microbiologia Agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.383-418.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3. ed. Passo Fundo: SBCS- Núcleo Regional Sul, 1994. 224p. I
- CORNEJO, P.; AZCÓN-AGUILAR, C.; BAREA, J.M.; FERROL, N. 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. **FEMS: Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 241, p.265-270, 2004.
- COSTA, C.M.C.; MAIA, L.C.; CAVALCANTE, U.M.T. et al. Influência de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento de dois genótipos de aceroleira (*Palpighia emarginata* D.C.) **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.4, p.893-901, 2001.
- DANIELL, T.J.; HUSBAND, R.; FITTER, A.H.; YOUNG, J.P.W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. **FEMS: Microbiology Ecology**, Oxford, v. 36, p.203-209, 2001.

- DEXTER, A.R. Compression of soils around roots. **Plant and Soil**, The Hague, v.97. n.3, p.401-406, 1987.
- ELFSTRAND, M.; FEDDERMANN, N.; INEICHEN, K. et al. Ectopic expression of the mycorrhiza-specific chitinase gene Mtchit 3-3 in medicago truncatula root-organ cultures stimulates spore germination of glomalean fungi. **New Phytologist**, Oxford, v.167, p. 557-570, 2005.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Brasília: Embrapa SPI; Rio de Janeiro:Embrapa CNPS, 1999. 412p.
- FAO. **World reference base for soil resources**. Roma: FAO, 1999. 88 p.
- FOCCHI, S.S.; DAL SOGLIO, F.K.; CARRENHO, R.; et al. Fungos micorrízicos arbusculares em cultivos de citros sob manejo convencional e orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.39, n.5, p.469-476, 2004.
- FRANKE, M.; BELLEI, M.; SANTOS, R.C.F.; GALLOTTI, G. Presença e infectividade de fungos micorrízicos tipo VA (FMVA) em solos de pomares de videira em Santa Catarina. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FAEPE, 1989. p. 50.
- FREITAS, M.S.M.; MARTINS, M.A. Crescimento e produção de óleo essencial em plantas de *Mentha arvensis* L. em resposta à inoculação com micorrizas. In: FERTBIO, 25., 2002, Rio de Janeiro. **Resumo Extendido...** Rio de Janeiro: SBCS, 2002. R240. 1CD-ROM.
- GALET, P. **Precis d' Ampelographie Pratique**. Montpellier: DEHAN, 1985. 256p.
- GEROLA, A.A.F. **Colonização, composição e diversidade de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em videiras da região de marialva, PR**. 1998. 89f. Dissertação (Mestrado Produção Vegetal) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Maringá, Maringá, 1998.
- GEDERMANN, J.W. Relation of a large soil-borne spore to phytomycetous mycorrhizal infections. **Mycologia**, New York, v.47, p.619-632, 1955.
- GEDERMANN, J.W.; NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal Endogone extracted from soil by wet sieving and decantinf. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 46, p.235-244, 1963.
- GIOVANNINI, E. **Produção de uvas para vinho, suco e mesa**. Porto Alegre: Renascença, 1999. 364p.
- GOLLOTTE, A.; TUINEN, D.V.; ATKINSON, D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. **Mycorrhiza**, Verlag, v.14, p. 111-117, 2004.

- GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.C.; CARRILO-GONZÁLEZ, WRIGHT, S.F. et al. The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. **Environmental Pollution**, Oxford, v.130, p.317-323, 2004.
- GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; AZCÓN-AGUILAR, C.; MOONEY, M. et al. Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. **Fungal Genetic and Biology**, Oxford, v. 42, p. 130-140, 2005.
- GOSS, M.J. Effects of Mechanical Impedance on Root Growth in Barley (*Hordeum vulgare* L.) **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.28, n.102, p.96-111, 1977.
- GUERRERO, R.C. **Inoculación de hongos micorrícicos en variedades comerciales de olivo (*Olea europaea* L.): efectos sobre el crecimiento, nutrición e inducción de enzimas hidrolíticas relacionadas con el establecimiento de la simbiosis y/o protección frente a enfermedades.** 2003. 186 f. Tesis (Doctorado) - Universidad de Granada, Granada, 2003.
- GUPTA, M.L.; JANARDHANAN, K.K. Mycorrhizal association of *Glomus aggregatum* with palmarosa enhances growth and biomass. **Plant and Soil**, The Hague, v.131, p. 261-263, 1991.
- HAAS, J.H.; MENGE, J.A. VA mycorrhizal fungi and soil characteristics in avocado (*Persea americana* mill.) orchard soil. **Plant and Soil**, The Hague, v.127, n.2, p. 207-212, 1990.
- HERRERA-PERAZA, R.A.; FERRER, R.L.; SIEVERDING, E. *Glomus brohultii*: a new species in the arbuscular mycorrhiza forming glomerules. **Journal of Applied Botany**, Göttingen, v.77, p. 37-40, 2003.
- KÄMPF, A.N. (Coord.) **Produção comercial de plantas ornamentais.** Guaíba: Agropecuária, 2000. 254 p.
- KHUN, G.; HIJRI, M.; SANDERS, I.R. Evidence for the evolution of multiple genome in arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, Sydney, v.414, p. 745-748, 2001.
- LOPES, P.Z. **Cultivo in vitro de tomateiro, menta e videira para produção de inóculo de fungo micorrízico arbuscular.** 2003. 68f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- LOVATO, P.E.; MARCHESINI, G.; KOLLER, O.; BRIDI, A.M. Avaliação de micorrização em goiabeira e citrus de pomares de Santa Catarina. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FAEPE, 1989. p. 48.
- MA, W.K.; SICILIANO, S.D.; GERMIDA, J.J. A PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 1589-1597, 2005.

- MENGE, J.A.; LARUE, J.; LABANAUSKAS, C.K.; JOHNSON, E.L.V. The effect of two mycorrhizal fungi upon growth and nutritiom of avocado seedlings grown with six fertilizer treatments. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, New York, v.105, n.3, p.400-404, 1980.
- MONNETTE, P. Influence of size of culture vessel in vitro proliferation of grape in a liquid medium. **Plant cell, Tissue and organ culture**, Hague, v.2, p. 327-332, 1983.
- MORTON, J.B.; REDECKER, D. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archaeospora and Paraglomus, based on concordant molecular and morphological characters. **Mycologia**, New York, v. 93, n.1, p.181-195, 2001.
- MORTON, J.B. **International Culture Collection of (Vesicular) Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM)**. Disponível em: <<http://invam.caf.wvu.edu/index.html>>. Acesso em: 15 de setembro de 2005.
- NEMEC, S. *Glomus intraradix* effects on citrus roostock seedling growth in various potting media. **Journal of Agricultural Science**, Cambrige, v.118, p.315-323, 1992.
- MOSSE, B.; HEPPER, C. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ cultures. **Physiological Plant Pathology**, Oxford, v.5, p. 215-223, 1975.
- NCBI National Center for Biotechnology Information. **National Library of medicine**. Disponível em : <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 08 jul. 2005.
- NOGUEIRA, M.A.; PACOVSKY, R.S.; CARDOSO, E.L.B.N. Produção de Micélio Externo Por Fungos Micorrízicos Arbusculares e Sua Relação Com a Eficiência Simbiótica. In: FERTBIO 98 - Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma, 1998, Caxambu. **Livro de Resumos**. Lavras: SBCS, 1998. p. 806.
- NUNES, J.L.S.; GRASSELLI, V.; SILVEIRA, S.V.; SOUZA, P.V. et al. Ocorrência de Micorrizas Arbusculares em Pomares de Pessegueiro Conduzidos sob sistemas integrado e Convencional: resultados preliminares. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO SOBRE PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS, 5., 2003, Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 85.
- OEHL, F.; SIEVERDING, E. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of central Europe. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 69, n.5, p. 2816-2824, 2003.
- OEHL, F.; SIEVERDING, E. Pacispora, a New Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungal Genus in the Glomeromycetes. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Göttingen, v. 78, p.72-82. 2004.
- OEHL, F.; WIEKEM, A.; SIEVERDING, E. *Glomus aureum*, a new sporocarpic species in the Glomales from European grasslands. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, Göttingen, v. 77, p.111-115. 2003.

- PANDEY, R.; GUPTA, M.L.; SINGH, H.B.; KUMAR, S. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi alone or in combination with *Meloidogyne incognita* on *Hyoscyamus niger* L. **Bioresource Technology**, Essex, v. 69, n. 3 p. 275-278, 1999.
- PAWLOWSKA, T.E.; TAYLOR, J.W. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. **Nature**, Sydney, NPG, v. 427, p. 733-737, 2004.
- PINOCHET, J.; CALVET, C.; CAMPRUBÍ, A. et al. C.Inducing Tolerance to the Root-lesion Nematode *Pratylenchus vulnus* by Early Mycorrhizal Inoculation of Micropropagated Myrobalan 29c Plum Rootstock. **Journal Of The American Society For Horticultural Science**, New York, v. 123, n. 3, p. 342-347, 1998.
- POMMER, C.V. **Uva: tecnologia de produção, pós-colheita e mercado**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2003. 778 p.
- POUYÚ, E.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; Fungos Micorrízicos Arbusculares no Crescimento, Absorção, Translocação e Acúmulo de Metais Pesados em Espécies Arbóreas. In: FERTBIO 98 - Interrelação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas: Consolidando um Paradigma, 1998, Caxambu. **Livro de Resumos**. Lavras: SBCS, 1998. p. 822.
- POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D. J. **VA Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC Press, 1984. 234 p.
- POZO, M. Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 368, p. 525-534, 2002.
- RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER. et al. A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature**, Sydney, v. 414, p. 462-466, 2001.
- READ, D. J.; BOYD, R. Water relations of mycorrhizal fungi and their host plants. In: AYRES, P.G.; BOYD, L.(Ed.) **Water, fungi and plants**: British Mycological Society Symposium, 11. London: Syndicate of the University of Cambridge, 1986. p. 287-303.
- REDECKER, D. Specific PCR primers to identify mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, Verlag, v.10, p.73-80, 2000.
- REDECKER, D. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant and Soil**, The Hague, v.244, p.67-73, 2002.
- RODRIGUEZ, A.; DOUGALL, J.C.; DODD, J.C. et al. The large subunit ribosomal RNA genes of *Entrophospora* infreqes comprise sequences related to two different glomalean families. **New Phytologist**, Oxford, v. 152, p.159-167, 2001.
- ROMERO, A.G.F.; SIQUEIRA, J.O. Atividade de Flavonóides sobre esporos do Fungo Micorrízico *Gigaspora Gigantea* In Vitro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, p. 517-522, 1996.

- ROSAND, P.C.; DIAS, R. Associações micorrízicas e a nutrição mineral das plantas. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1985, Lavras. **Anais...** Lavras: FAEPE, 1985. p. 33-59.
- SCHARF, R.; OLIVEIRA, V.L.; ANJOS, J.T. Caracterização das populações nativas de fungos MVA em solos cultivados com pessegueiro (*Prunus persicae*) no Estado de Santa Catarina. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FAEPE, 1989. p. 49.
- SCHENCK, N.C.; PEREZ, Y. **Manual for identification of VA mycorrhizal fungi.** Gainesville: University of Florida. Florida, 1988. 241 p.
- SCHIMITZ, J. A. K., **Cultivo de Poncirus trifoliata L. Raf. em Recipientes: Influência de Substratos e de Fungos Micorrízicos Arbusculares.** 1998. 144 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.
- SCHMITZ, J.A.K; SOUZA, P.V.D.; FREITAS, R.S; CARNIEL, E.; CARRENHO, R. Ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares em citros no estado do Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 27., 1999, Brasília. **Resumos...** Brasília: SBCS, 1999. 1CD-ROM.
- SCHMITZ, E.H. A demanda em substrato para a citricultura no RS. In: Kämpf, A. N.; FERMINO, M.H. (E.ds.) ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS: a base da produção vegetal em recipientes, 2000, Porto Alegre. **Anais.** Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 155-156.
- SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, Cambridge, v. 105, n.12, p. 1413-1421, 2001.
- SILVA FILHO, G.N.; ZIMERMANN FILHO, A.; SCHARF, R.; BASSO, C. Avaliação da população de fungos endomicorrízicos de tipo VA (FMVA) em solos cultivados com macieira em Santa Catarina. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FAEPE, 1989. p. 46.
- SILVA-JÚNIOR, J. P.; SIQUEIRA, J. O. Colonização Micorrízica e Crescimento da Soja Com Diferentes Fungos e Aplicação do Isoflavonóide Formononetina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.6, p.953-959, 1998.
- SILVA, A.L.; DOAZAN, J.P. Une méthode d'irradiation aux rayons gamma appliquée à des porte-greffes de vigne *in vitro*. **Journal International Des Sciences de la Vigne et Duvin**, Bordeaux, v. 29, p.1-9, 1995.
- SILVEIRA, A. P. D. Micorrizas In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: S.B.C.S., 1992. p 257-282.
- SILVEIRA, S.V. **Influência de fungos micorrízicos arbusculares em mudas de abacateiro (*Persea sp.*)**. 1999. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

- SILVEIRA, S.V.; SOUZA, P.V.D; BENDER, R.J.; KOLLER, O.C. Effect of Arbuscular Mycorrhizae on cv. Carmem Avocado Plants. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.33, n.7 & 8, p.1323-1333, 2002a.
- SILVEIRA, S.V. ; SOUZA, P. V.D; FERMINO, M.H. Influência da Matéria Orgânica do Substrato na Colonização pelo Fungo Micorrízico Arbuscular *Glomus clarum*, em Aveia Branca (*Avena sativa* L.). In: ENCONTRO NACIONAL DE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 3., 2002, Campinas. **Resumos...**Campinas: IAC, 2002b. p. 117.
- SILVEIRA, T.S. **Fungos micorrízicos arbusculares em *Ilex paraguariensis***. Porto Alegre, 2002. 82 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A.A. Micorrizas. In: SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC-ESAL, 1988. p.125 -177.
- SIQUEIRA, J. O. Micorrizas : forma e função. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1985, Lavras. **Anais...** Lavras: FAEPE, 1985. p. 5-32.
- SIQUEIRA, J. O.; SAGGIN JR., O.J., COLOZZI FILHO, A., GUIMARÃES, P.T.G. Fungos endomicorrízicos nativos, *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum* na formação de mudas de cafeeiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 3., 1989, Piracicaba. **Resumos...** Piracicaba: FAEPE, 1989. p. 16.
- SIQUEIRA, J. O. Micorrizas Arbusculares. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. p. 151-194.
- SOUZA, P.V.D. de **Efeito de Concentração de etefon e pressões de pulverização foliar no raleio de frutinhas em tangerineiras (*Citrus deliciosa* Tenore) cv. Montenegrina**. Porto Alegre, 1990. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990.
- SOUZA, P. V. D. de **Optimización de la producción de plantones de cítricos en vivero. Inoculación con micorrizas vesiculares-arbusculares**. Valencia, 1995. 201 f. Tese (Doutorado) - Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, 1995.
- SOUZA, P.V.; CARNIEL, E.; SCHMITZ, A.; SILVEIRA, S.V. Influência de substratos e fungos micorrízicos arbusculares no desenvolvimento vegetativo do porta-enxerto Flying Dragon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 27, n.2, p. 285-287, 2005.
- SOUZA, P.V; CARNIEL, E.; SCHMITZ, A.; SILVEIRA, S.V. Substratos e Fungos Micorrízicos Arbusculares no Desenvolvimento Vegetativo de Citrange Troyer. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, n.3 v.16, p. 84- 88, nov. 2003.

- STÜRMER, S. L.; MORTON, J. B. Developmental patterns defining morphological characters in spores of four species of *Glomus*. **Mycologia**, New York, v.89, n.1, p.72-81, 1997.
- ST-ARNAUD M.; HAMEL, C.; VIMARD, B. et al. 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**, Cambridge, v.100, p. 328-332, 1996.
- TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEN, H. et al. **Análises de solos, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 215 p. (Boletim Técnico de Solos, 5).
- VESTBERG, M.; SAARI, K.; KUKKONEN, S. et al. Mycotrophy of crops in rotation and soil amendment with peat influence the abundance and effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal in field soil. **Mycorrhiza**, New York, v. 15, p. 447-458.
- VIERHEILIG, H.; THANASAN, K.; NOVAK, J. The effect of mycorrhization on qualitative and quantitative parameters of *Origanum vulgare* and *Salvia officinalis*. In: COST ACTION 8.38: Exploring and exploiting the natural AM diversity in stressed soil-plant systems. **Abstract...** Granada: Estación Experimental del Zaidín, CSIC. 2004. p. 64.
- VIVAS, A.; VOROS, B.; BIRÓ, B.; CAMPOS, E.; BAREA, J.M. AZCÓN, R. Symbiotic efficiency of autochthonous arbuscular mycorrhizal fungus (*G. mosseae*) and *Brevibacillus* sp. Isolated from cadmium polluted soil under increasing cadmium levels. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 126, p. 179-189, 2003.
- ZANDAVALLI, R.B. 2001 **Aspectos ecológicos e fisiológicos em micorrizas em *Araucária angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze**. 2001. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Botânica, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

## APÊNDICES

APÊNDICE 1. Teores de matéria orgânica, macronutrientes e de pH encontrados no substrato utilizado nos experimentos dos capítulos 3 e 4. Porto Alegre, RS. 2003.

	M.O. (%)	Fósforo (mg dm <sup>-3</sup> )	Potássio (mg dm <sup>-3</sup> )	Ca (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	Mg (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	pH H <sub>2</sub> O
Substrato	6.4	16	98	8.5	0.9	6.4

APÊNDICE 2. Teores de micronutrientes e Capacidade de Troca de Cátions (CTC) encontrados no substrato utilizado nos experimentos dos capítulos 3 e 4. Porto Alegre, RS. 2003.

	S (mg dm <sup>-3</sup> )	Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	B (mg dm <sup>-3</sup> )	Mn (mg dm <sup>-3</sup> )
Substrato	8.0	2.4	0.9	0.9	7

APÊNDICE 5. Interpretação dos resultados das determinações de enxofre, cobre, zinco e boro para os solos e condições do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (Comissão de fertilidade - RS e SC, 1994).

Teor no solo	Enxofre	Cobre	Zinco	Boro
	-----mg dm <sup>-3</sup> -----			
Baixo	<2,0	<0,15	<0,20	<0,1
Médio	2,0-5,0	0,15-0,40	0,20-0,50	0,1-0,3
Suficiente	>5,0*	>0,40	>0,50	>0,3

\*10mg/L para leguminosas e culturas exigentes em enxofre (brássicas, liliáceas, etc.).

APÊNDICE 6. Teor total de sais solúvies (TTSS) e características físicas substrato utilizado nos experimentos dos capítulos 3 e 4. Porto Alegre, RS. 2003.

Tratamentos	
TTSS (g L <sup>-1</sup> )	0,97
DU (Kg m <sup>-3</sup> )	1010
DS (Kg m <sup>-3</sup> )	841
MS (g 100g <sup>-1</sup> )	83
PT ( m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0,71
EA ( m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0,21
AFD ( m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0,24
AD ( m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0,27
AT (m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0,02
CRA (10) ( m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0,50
CRA (50) ( m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0,25
CRA (100) ( m <sup>3</sup> m <sup>-3</sup> )	0,23
CE (1:0) (dS m <sup>-1</sup> )	0,18

Teor Total de Sais Solúveis (TTSS); Densidade úmida (DU); Densidade Seca (DS); Porosidade Total (PT); Espaço de Aeração (EA); Água Disponível (AD); Água Facilmente Disponível (AFD); Água Tamponante (AT); Água Remanescente (AR-100); CRA (10)= capacidade de retenção de água na pressão de sucção de 10 cm; CRA (50)= capacidade de retenção de água na pressão de sucção de 50 cm CRA (100)= capacidade de retenção de água na pressão de sucção de 100 cm; CE= condutividade elétrica.