

PRODUÇÃO DE MICÉLIO EXTERNO POR FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES E CRESCIMENTO DA SOJA EM FUNÇÃO DE DOSES DE FÓSFORO⁽¹⁾

M. A. NOGUEIRA⁽²⁾ & E. J. B. N. CARDOSO⁽³⁾

RESUMO

Em uma associação entre duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (*Glomus intraradices* ou *Gigaspora margarita*) e soja (*Glycine max* L. Merrill cv. IAC-8), avaliaram-se a produção de massa de material seco da parte aérea (MSPA), a massa de material seco de vagens (MSV), a colonização radicular, a concentração de N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn na parte aérea e vagens, além das estimativas do comprimento de micélio externo ativo (MEA) e micélio externo total (MET). As plantas receberam cinco doses de fósforo (0, 25, 50, 100 e 200 mg kg⁻¹) e as avaliações foram feitas em quatro épocas (15, 30, 60 e 90 dias). A inoculação da soja com *G. margarita* resultou em redução transitória de crescimento aos 60 dias, enquanto aumentos na MSPA devidos à inoculação com os FMAs foram mais evidentes aos 90 dias. A colonização radicular, a produção de MEA e de MET apresentaram relação negativa com o incremento das doses de P nos tratamentos com FMAs. A menor produção de MEA e a fase de crescimento lento mais prolongada observadas no tratamento com *G. margarita* podem ter colaborado para a redução do crescimento das plantas aos 60 dias. O comprimento de MEA produzido por *G. intraradices* aumentou com o tempo e diminuiu com o aumento das doses de P. Esses efeitos foram menos evidentes para *G. margarita*. As concentrações de Fe e Mn nas vagens aos 90 dias foram menores nos tratamentos inoculados com FMAs nas menores doses de P, nas quais foi observada maior colonização radicular.

Termos para indexação: Micorriza arbuscular, micélio externo, ferro, manganês.

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor, apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" em outubro de 1997. Parcialmente apresentado no XXVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Rio de Janeiro, 1997. Recebido para publicação em outubro de 1997 e aprovado em dezembro de 1999.

⁽²⁾ Pós-Graduando em Solos e Nutrição de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ. Caixa Postal 9, CEP 13418-900. Piracicaba (SP). Bolsista do CNPq. E-mail: nogueira@carpa.ciagri.usp.br

⁽³⁾ Professora Titular do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ/USP. Bolsista do CNPq. E-mail: ejbncard@carpa.ciagri.usp.br.

SUMMARY: *EXTERNAL MYCELIUM PRODUCTION BY ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI AND GROWTH OF SOYBEAN FERTILIZED WITH PHOSPHORUS*

*The objective of this work was to study the association between soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. IAC 8) and two different arbuscular-mycorrhizal (AM) fungi (*Gigaspora margarita* or *Glomus intraradices*), grown under increasing rates of phosphorus (0, 25, 50, 100 and 200 mg kg⁻¹) and harvested at four times (15, 30, 60 and 90 days). The assessed variables were: shoot dry weight, pod dry weight, root colonization by AM fungi, the concentrations of N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, and Zn in shoots and pods, estimation of the length of total external mycelium (TEM) and the length of active external mycelium (AEM). There was a temporal growth reduction in the soybean-G. margarita association at 60 days, and shoot dry weight increase due to AM fungus colonization was more evident at 90 days. Increasing P rates decreased root colonization in both fungi, likewise with TEM and AEM. Colonization by G. margarita was less efficient in a soybean symbiosis because it grew slower than G. intraradices and presented less AEM. This may have been the reason for growth reduction in the soybean-G. margarita association at 60 days. Length of AEM in G. intraradices inoculated soils increased with time and decreased with increasing P rates. Changes in AEM were less evident for the soybean-G. margarita. Iron and manganese concentrations in pods at 90 days were lower in plants colonized by AM fungi at low P rates, where colonization levels were high.*

Index terms: Arbuscular mycorrhiza, external mycelium, iron, manganese.

INTRODUÇÃO

A colonização radicular e a resposta do hospedeiro à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) dependem da interação do sistema simbiote e as mais variadas condições, tais como: as características do solo (Pacovsky et al., 1986; Sylvia, 1988; Lambais & Cardoso, 1990) e a fase de desenvolvimento do hospedeiro (Bethlenfalvay et al. 1982d). A disponibilidade de P é o fator edáfico que mais afeta as micorrizas arbusculares, havendo uma relação inversa com a dependência micorrízica (Ojala et al., 1983; Cardoso et al., 1986).

Segundo Abbott & Robson (1981), a falta de relação entre infectividade e eficiência do FMA em promover o crescimento de culturas anuais pode estar relacionada com o tempo necessário ao estabelecimento da colonização radicular. Lambais & Cardoso (1990) observaram que o processo de colonização radicular de *Stylosanthes guianensis* por *Gigaspora margarita* foi mais lento do que o observado para outras espécies de FMAs, o que, provavelmente, limitou a resposta da planta à micorrização por essa espécie de FMA.

Em alguns casos, não raramente observa-se que a inoculação de plantas com FMAs pode resultar na redução do crescimento do hospedeiro nos estádios iniciais, quando há grande deslocamento de fotoassimilados para o endófito (Bethlenfalvay et al., 1982b).

Alguns autores têm voltado suas atenções para o estudo da relação entre o micélio interno e o externo à raiz (Bethlenfalvay et al. 1982a; Abbott & Robson, 1985) e seu impacto no crescimento do hospedeiro. O crescimento da planta pode variar com a proporção entre micélio fúngico interno e externo (Abbott & Robson, 1981). Respostas negativas (parasitismo) podem ser resultantes de uma grande colonização radicular pelo FMA e pouco crescimento externo (Bethlenfalvay et al. (1982c). De forma contrária, o parasitismo também poderá ocorrer quando houver pouca colonização radicular e grande produção de micélio externo (Cardoso-Filho et al., 1999).

Os fatores que influenciam a colonização micorrízica, como a disponibilidade de P, também atuam na porção externa da simbiose (Nagahashi et al., 1996). Alguns autores têm observado correlação positiva entre comprimento de micélio externo total (MET) e disponibilidade de P no substrato (Cardoso-Filho et al., 1999; Melloni & Cardoso, 1999b). Todavia, esses resultados contrariam as observações de Abbott & Robson (1985) e Miranda & Harris (1994), os quais observaram decréscimos nas quantidades de MET com o incremento do teor de P no solo.

O micélio externo ativo (MEA) tem sido avaliado pelo uso de diacetato de fluoresceína (FDA) (Schubert et al., 1987; Hamel et al., 1990). Melloni & Cardoso (1999b) verificaram que o comprimento de MEA variou com o hospedeiro e com a espécie de

fungo micorrízico, além de apresentar correlação negativa com o aumento da disponibilidade de P no substrato.

O objetivo deste trabalho foi avaliar, em quatro épocas do ciclo da cultura, a infectividade e a eficiência de duas espécies de FMAs em soja em resposta a doses crescentes de P, a produção de MEA e MET, bem como o efeito da micorrização sobre a concentração de N, P, K, S, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn na parte aérea e vagens.

MATERIAL E MÉTODOS

O substrato de cultivo foi obtido pela mistura de uma amostra de solo classificado como Areia Quartzosa, série paredão vermelho distrófico, retirado da camada de 0-20 cm, no município de Piracicaba e areia de rio (3:1, v/v), lavada por cinco vezes. O uso desse substrato teve a finalidade de facilitar a remoção das raízes e do micélio externo.

Após a autoclavagem do substrato para a eliminação dos FMAs nativos, sua análise química revelou os seguintes resultados: pH CaCl_2 4,0; M.O. 14 g dm^{-3} ; P 4 mg dm^{-3} ; S-SO_4^{2-} 14,25 mg dm^{-3} ; K^+ 0,4; Ca^{2+} 5; Mg^{2+} 2; Al^{3+} 11; H + Al 31; S 7, T 38 $\text{mmol}_c \text{dm}^{-3}$; Cu 0,42; Fe 93; Mn 11; Zn 1,62 mg kg^{-1} . Com base nesses resultados, foi calculada a necessidade de calagem pelo método da saturação por bases, visando sua elevação a 80% e a adubação com K e S (Raij et al., 1996). Foram adicionados 0,67 g kg^{-1} de calcário dolomítico, PRNT 131%, incubando-se por 15 dias. Após esse período, adicionaram-se 0,04 g kg^{-1} de KCl (50% K_2O) e 0,04 g kg^{-1} de gesso ($\text{Ca}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 18% S). Não foi fornecido N mineral.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial (3x5x4), correspondente a três tratamentos fúngicos (controle, *Glomus intraradices* ou *Gigaspora margarita*), cinco doses de P (0, 25, 50, 100 e 200 mg kg^{-1}) na forma de superfosfato triplo moído (< 0,5 mm) e quatro épocas de avaliação (15, 30, 60 e 90 dias após o transplântio), com três repetições.

Cada unidade experimental foi constituída de um vaso de cerâmica de 4 dm^3 , impermeabilizado e desinfestado internamente, antes de receber 4 kg do substrato (3 dm^3). As sementes foram pré-germinadas em areia por três dias. Transplantaram-se cinco plântulas do cultivar IAC-8 por parcela, inoculadas no momento do transplântio com as estirpes Semia 587 e Semia 5019 de *Bradyrhizobium japonicum*. Após uma semana, foi feito o desbaste, mantendo-se duas plantas, ocasião em que receberam, na forma de solução, os seguintes micronutrientes, em mg kg^{-1} de substrato: B - 0,25 (H_3BO_3); Cu - 0,75 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); Mo - 0,05 ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e Zn - 2,5 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

A infestação do substrato com cada FMA foi feita com uma suspensão de esporos extraídos por peneiramento úmido (Gerdemann & Nicolson, 1963), provenientes de vasos de multiplicação em *Brachiaria decumbens*, seguido de centrifugação em solução de sacarose 500 g L^{-1} . O volume de cada suspensão foi ajustado para possibilitar a obtenção de cerca de 200 esporos ao pipetar 10 mL, os quais foram adicionados e incorporados nos cinco centímetros superficiais do substrato. O tratamento-controle (sem FMA) recebeu o mesmo volume de suspensão proveniente de vasos com *Brachiaria* sem FMAs, visando manter a mesma microbiota dos tratamentos que receberam FMAs. O experimento foi realizado em casa de vegetação de agosto a novembro de 1996, tendo as plantas recebido irrigações diárias com água destilada, conforme a necessidade.

Em cada época de colheita, as plantas foram lavadas, secas em estufa a 65°C, determinando-se a massa do material seco da parte aérea (MSPA = folhas + pecíolos + ramos + vagens). As vagens também tiveram sua matéria seca determinada separadamente (MSV). As vagens e a parte aérea remanescente (folhas + pecíolos + ramos = parte vegetativa) foram moídas separadamente e submetidas a determinações dos teores de N por destilação semi-microKjeldahl após digestão sulfúrica. Determinaram-se também P (colorimetria), S (turbidimetria), K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn (espectrofotometria de absorção atômica) após digestão nítrico-perclórica (Sarruge & Haag, 1974). As raízes foram retiradas do substrato, lavadas e armazenadas em AFA (2 L de álcool etílico; 0,5 L de formol; 0,1 L de ácido acético glacial em 4 L de água destilada) até o momento da determinação da percentagem de colonização radicular pelo método de interseção em placa quadriculada (Giovanetti & Mosse, 1980) após a coloração das raízes (Phillips & Hayman, 1970). A extração do micélio externo foi feita pelo método Cardoso-Filho et al. (1999), modificado por Melloni & Cardoso (1999a), colocando-se a membrana com os micélios sobre uma lâmina de microscópio e não entre duas lâminas, conforme método original. A estimativa do comprimento do micélio externo ativo e total foi feita segundo Schubert et al. (1987). Os resultados foram submetidos à análise de variância, desdobrando-se os fatores, ou a interação entre eles, com aplicação do teste *t* de Student aos fatores qualitativos e análises de regressão aos fatores quantitativos. Para a estabilização da variância, os dados de percentagem de colonização radicular foram transformados em $\text{arc sen}(\sqrt{x/100})^{1/2}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Colonização Radicular

As raízes das plantas não inoculadas com FMAs foram analisadas e apresentaram-se isentas de

colonização em todas as épocas. Aos 15 dias, também não havia colonização radicular, mesmo nos tratamentos inoculados com FMAs. Bethlenfalvay et al. (1982b) também não observaram colonização aos 14 dias em plantas de soja inoculadas com FMAs.

A primeira constatação de colonização radicular foi feita aos 30 dias (Figura 1). Nessa época, a percentagem de colonização para ambos FMAs foi menor que 5%, não havendo diferenças estatísticas entre os tratamentos inoculados em qualquer dose de P. À exceção dos tratamentos com 100 e 200 mg kg⁻¹ de P, os quais limitaram a evolução da colonização radicular, a fase exponencial da colonização por *G. intraradices* ocorreu entre 30 e 60 dias, enquanto *G. margarita* apresentou pouca evolução nesse intervalo. *G. intraradices* atingiu 75% de colonização aos 60 dias no tratamento que não recebeu P, havendo diminuição da colonização com o aumento das doses de P. Minnhoni et al. (1993), estudando a simbiose de *Glomus macrocarpum* em soja, observaram apenas uma tendência de diminuição da colonização radicular com o aumento das doses de P em que a máxima foi de 70 mg kg⁻¹. Faquin (1988) também observou que a colonização radicular não foi influenciada mesmo na dose de 90 mg kg⁻¹ de P. Contudo, deve-se salientar que naqueles trabalhos foram utilizados solos oxídicos, nos quais a disponibilidade de P certamente foi restringida pela fixação do elemento, tornando-o menos disponível. Siqueira et al. (1984), utilizando solo arenoso, também observaram relação inversa entre colonização radicular de soja e disponibilidade de P, a qual caiu de 60%, na dose 0, para 10%, na dose 160 mg kg⁻¹, aos 70 dias.

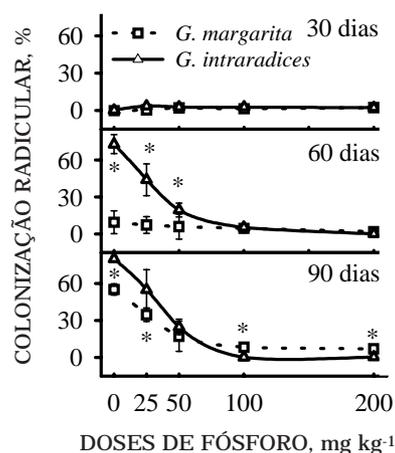


Figura 1. Colonização radicular de soja por fungos micorrízicos arbusculares, considerando as doses de P, aos 30, 60 e 90 dias do transplantio. * Diferenças significativas entre fungos na mesma dose, pelo teste *t* a 5%. Barras verticais representam o desvio-padrão de três repetições, quando maiores que os símbolos.

G. margarita apresentou fase exponencial de colonização radicular apenas entre 60 e 90 dias, especialmente no tratamento sem adição de P e na dose 25 mg kg⁻¹. Fase de crescimento lento mais prolongada de *G. margarita* também foi observada por Lambais & Cardoso (1990). Diferentes espécies ou populações de FMAs apresentaram curvas variadas de colonização de acordo com o tempo, dependendo das condições edáficas (Abbott & Robson, 1985). A interação genética do fungo com a planta talvez seja o fator de maior importância no que se refere à colonização pelos FMAs (Lambais & Cardoso, 1990). Aos 90 dias e nas doses de P de 100 e 200 mg kg⁻¹, *G. margarita* apresentou colonização radicular significativamente maior (cerca de 15%) em relação a *G. intraradices* (cerca de 3%). Cardoso et al. (1986) observaram que a diminuição da micorrização de citrus, decorrente do aumento da disponibilidade de P, variou com a espécie do FMA. Esse comportamento também foi constatado neste trabalho (Figura 1, aos 60 e 90 dias), o que reforça a hipótese de que a maior ou menor sensibilidade do fungo ao aumento da disponibilidade de P é um fator intrínseco à espécie, o que pode refletir na sua eficiência em estabelecer a simbiose com o hospedeiro (Abbott & Robson, 1981; Lambais & Cardoso, 1990).

Massa do Material Seco da Parte Aérea (MSPA)

A produção de MSPA diferiu significativamente entre os tratamentos com fungos micorrízicos apenas aos 60 e 90 dias (Quadro 1).

Aos 60 dias, os tratamentos com e sem inoculação não diferiram estatisticamente entre si no tratamento sem adição de P, no qual o teor de P disponível no substrato, determinado pelo método da resina, foi de 4 mg kg⁻¹ (dados não apresentados). Esse teor, classificado como muito baixo (Raj et al., 1996), foi limitante mesmo na presença dos FMAs. Na dose de 25 mg kg⁻¹ de P (15 mg kg⁻¹ de P disponível), a inoculação com *G. intraradices* propiciou incremento de matéria seca 23,5 e 19,7% superior à do tratamento com *G. margarita* e do controle, respectivamente. A percentagem de colonização radicular por *G. intraradices* e *G. margarita* era cerca de 45 e 10%, respectivamente (Figura 1), permitindo que a primeira espécie fosse mais eficiente em auxiliar o crescimento do hospedeiro. Nas doses de 50 e 100 mg kg⁻¹ de P, a inoculação com *G. margarita* levou a produções de MSPA estatisticamente menores do que o controle. Nesse caso, *G. margarita* ainda estava em fase de estabelecimento da simbiose (crescimento lento), resultando numa depressão transitória de crescimento do hospedeiro, pois o FMA ainda não estaria contribuindo para o desenvolvimento da planta, mas constituindo um dreno de carbono. Estudos de Harris et al. (1985) revelaram que 17 e 8% dos fotoassimilados totais da planta de soja foram consumidos pelo fungo micorrízico aos 42 dias e no

Quadro 1. Produção de matéria seca pela parte aérea de plantas de soja (g vaso⁻¹) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (*G. margarita* ou *G. intraradices*) ou não inoculadas (Controle), sob doses crescentes de fósforo, aos 15, 30, 60 e 90 dias do transplântio

| Fungo | Dose de Fósforo (mg kg ⁻¹) | | | | |
|------------------------|--|---------|---------|---------|----------|
| | 0 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| 15 dias | | | | | |
| Controle | 0,67 a | 0,78 a | 0,80 a | 0,90 a | 0,85 a |
| <i>G. margarita</i> | 0,73 a | 0,85 a | 1,09 a | 0,93 a | 0,83 a |
| <i>G. intraradices</i> | 0,67 a | 0,86 a | 1,11 a | 0,75 a | 0,70 a |
| 30 dias | | | | | |
| Controle | 1,54 a | 3,36 a | 4,40 a | 5,64 a | 4,83 a |
| <i>G. margarita</i> | 1,52 a | 3,31 a | 3,88 a | 5,79 a | 4,64 a |
| <i>G. intraradices</i> | 1,67 a | 3,57 a | 4,89 a | 4,68 a | 5,43 a |
| 60 dias | | | | | |
| Controle | 3,44 a | 18,42 b | 34,94 a | 38,23 b | 36,68 ab |
| <i>G. margarita</i> | 3,66 a | 17,84 b | 28,08 b | 32,10 c | 36,96 a |
| <i>G. intraradices</i> | 4,68 a | 22,04 a | 33,04 a | 42,26 a | 33,77 b |
| 90 dias | | | | | |
| Controle | 3,80 b | 23,13 b | 48,90 b | 56,27 a | 49,60 a |
| <i>G. margarita</i> | 8,70 a | 24,90 b | 47,25 b | 55,67 a | 52,20 a |
| <i>G. intraradices</i> | 7,60 a | 30,80 a | 55,70 a | 55,95 a | 51,85 a |

Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, dentro de cada época, não diferem entre si (teste t, 5%).

final do ciclo da cultura, respectivamente. Conforme Jakobsen (1995), pode-se observar depressão transitória de crescimento nas primeiras fases da colonização em plantas com reservas limitadas de carbono, principalmente em condições de alta disponibilidade de P. Bethlenfalvay et al. (1982b) também observaram inibição inicial de crescimento em soja, o que foi atribuído a uma demanda de carboidratos pelo endófito, numa fase em que a relação parte aérea/raiz e a capacidade fotossintética do hospedeiro eram baixas.

Aos 90 dias (Quadro 1), a inoculação com *G. intraradices* nos tratamentos com 0, 25 e 50 mg kg⁻¹ de P acarretou maior acúmulo de MSPA. A inoculação com *G. margarita* somente resultou em diferença significativa superior à do controle no tratamento sem adição de P, o que demonstra que a simbiose com esse fungo foi menos eficiente em auxiliar o crescimento da planta, quando P foi adicionado ao substrato. Nas doses de 100 e 200 mg kg⁻¹ de P, não houve diferenças significativas entre os tratamentos com FMAs nem entre esses e o controle. Segundo Jakobsen (1995), as diferenças na eficiência simbiótica entre fungos micorrízicos parecem estar ligadas muito mais à variação da capacidade de transporte de P pelo fungo do que às quantidades de carbono que esse consome do hospedeiro. Silveira & Cardoso (1990) observaram que o FMA mais

eficiente em promover o crescimento de feijoeiro foi aquele que propiciou maior influxo de P pelo sistema radicular da planta.

Massa do Material Seco de Vagens (MSV)

A análise estatística dos resultados da produção de vagens, obtidos aos 60 e 90 dias, revelou interações duplas dos fatores épocas de colheita e fungos micorrízicos. Foram constatados (Quadro 2) efeitos positivos da inoculação com *G. intraradices* apenas aos 90 dias, com incremento de produção de vagens em relação ao controle, que, por sua vez, não diferiu significativamente do tratamento inoculado com *G. margarita*. Novamente, foi constatada maior eficiência do primeiro fungo em relação ao segundo.

Micélio Externo Ativo (MEA)

Não houve efeito das doses de P sobre o micélio externo ativo (MEA) produzido nos tratamentos com FMAs e controle, apenas aos 15 dias (Figura 2). Nas demais épocas, obtiveram-se ajustes de regressão significativos para os FMAs, com efeitos negativos das doses de P sobre o comprimento do MEA. No substrato do tratamento-controle, também foi observado MEA, resultado da presença de fungos não-micorrízicos, provavelmente introduzidos durante a instalação e realização do experimento.

Quadro 2. Produção de matéria seca de vagens por plantas de soja (g vaso^{-1}) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (*G. margarita* ou *G. intraradices*) ou não inoculadas (Controle), sob doses crescentes de fósforo, aos 60 e 90 dias do transplântio

| Fungo | Dose de Fósforo (mg kg^{-1}) | | | | | Média |
|------------------------|---|-------|-------|-------|-------|---------|
| | 0 | 25 | 50 | 100 | 200 | |
| 60 dias | | | | | | |
| Controle | 0,13 | 0,66 | 0,97 | 0,98 | 1,00 | 0,75 a |
| <i>G. margarita</i> | 0,20 | 0,69 | 1,48 | 0,75 | 1,46 | 0,92 a |
| <i>G. intraradices</i> | 0,18 | 0,86 | 1,23 | 0,78 | 0,87 | 0,78 a |
| 90 dias | | | | | | |
| Controle | 1,69 | 11,91 | 18,34 | 16,68 | 13,36 | 12,98 b |
| <i>G. margarita</i> | 3,24 | 13,17 | 17,21 | 13,36 | 16,46 | 12,69 b |
| <i>G. intraradices</i> | 3,94 | 15,52 | 19,60 | 17,16 | 19,13 | 15,07 a |

Médias de doses de fósforo seguidas pela mesma letra, dentro de cada época, não diferem entre si (teste *t*, 1%).

As hifas de fungos não-micorrízicos nem sempre podem ser diferenciadas visualmente das hifas de FMAs, dificuldade que também foi relatada por Abbott & Robson (1985) e Sylvia (1988).

Aos 30 e 60 dias, foram obtidos modelos matemáticos de regressão significativos para os tratamentos com FMAs, com altos valores de coeficiente de determinação, demonstrando influência negativa do aumento das doses de P sobre o MEA, de maneira análoga à colonização radicular (Figura 1). No tratamento-controle, o MEA somente foi influenciado pelas doses de P aos 60 dias, o que reforça a afirmação de que o micélio originário de fungos não-micorrízicos estão menos sujeitos aos efeitos inibitórios das doses de P. Aos 90 dias, as produções de MEA nos tratamentos com *G. margarita* e no controle foram semelhantes, sem efeitos de doses de P. Esse comportamento pode explicar a menor eficiência deste fungo, quando comparado ao *G. intraradices*, o qual, mesmo prejudicado pelo aumento das doses de P, apresentou os maiores valores de MEA, o que provavelmente refletiu nas maiores produções de MSPA e MSV aos 90 dias (Quadros 1 e 2).

Embora *G. margarita* tenha atingido percentagem de colonização radicular superior à observada para *G. intraradices* aos 90 dias nas duas maiores doses de P (Figura 1), a produção de MEA por esse fungo foi inferior à produzida por *G. intraradices* em todas as doses de P (Figura 2). Aos 30 dias, o tratamento com *G. margarita* apresentou maior desenvolvimento inicial de MEA no tratamento sem adição de P; contudo, provavelmente, em virtude da falta de adaptação ao substrato (Abbot & Robson, 1985), passou a apresentar menores produções de MEA que o tratamento com *G. intraradices* nas

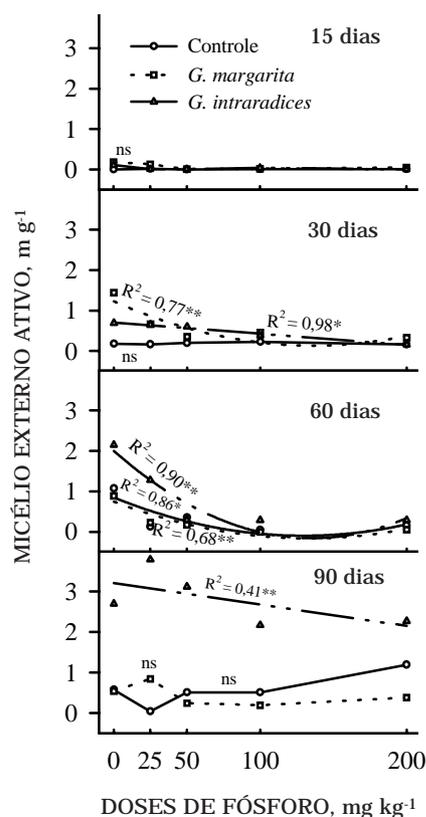


Figura 2. Estimativa do comprimento de micélio externo ativo em substrato cultivado com soja inoculada com fungos micorrízicos arbusculares (*G. margarita* ou *G. intraradices*) ou não inoculada (Controle), aos 15, 30, 60 e 90 dias do transplântio, considerando as doses de P. * Modelos matemáticos de regressão significativos a 5%; ** = significativos a 1%; ns = não-significativos pelo teste F.

épocas seguintes, com valores estatisticamente iguais aos do controle. A concentração de P no hospedeiro parece influenciar a quantidade ou a composição dos exsudatos radiculares, o que pode afetar o crescimento do micélio externo dos FMAs (Tawarayama et al., 1996). Fatores físicos, químicos e biológicos do substrato também podem afetar a integridade do micélio externo e comprometer a translocação de nutrientes dos FMAs ao hospedeiro (Sylvia, 1988).

O comprimento de MEA de *G. intraradices* aumentou com o tempo em todas as doses de P (Figura 2), enquanto no tratamento com *G. margarita* foi semelhante ao do controle. Schubert et al. (1987), Sylvia (1988) e Hamel et al. (1990) observaram que, em geral, a porcentagem de MEA em relação ao micélio externo total (MET) é alta no início do estabelecimento da simbiose, diminuindo conforme sua evolução. Neste estudo, porém, observou-se o contrário, principalmente para *G. intraradices*, para o qual a proporção de MEA em relação ao MET foi cerca de 5% aos 15 dias, chegando a cerca de 20% aos 90 dias (dados não apresentados).

Como a absorção de nutrientes pela hifa do fungo ocorre por processo ativo, o aumento do MEA, produzido por *G. intraradices* e, conseqüentemente, da superfície disponível para absorção, melhoraria o estado nutricional do hospedeiro associado a esse fungo, principalmente nas doses mais baixas de P. Entretanto, a planta teve pouco tempo para se beneficiar da interação, pois já havia concluído mais de 75% do seu ciclo aos 90 dias.

Micélio Externo Total (MET)

Embora alguns autores (Sylvia, 1988; Hamel et al., 1990) tenham sugerido a subtração da quantidade de micélio externo total (MET) encontrada nos substratos-controles daquela dos substratos inoculados com FMAs, neste estudo, esse procedimento não foi realizado. Em algumas situações, houve maior comprimento de MET no tratamento-controle, supostamente pelos mesmos motivos apresentados para MEA, além de que interações não conhecidas podem ocorrer entre os FMAs e fungos não-micorrízicos. Novamente, houve dificuldade de diferenciação visual entre as hifas de FMAs e os fungos não-micorrízicos (Abbott & Robson, 1985; Sylvia 1988).

De maneira geral, houve tendência de aumento da produção de MET ao longo do tempo (o tratamento com *G. intraradices* produziu, na média das doses de P, 3,4 m g⁻¹, aos 15 dias, e 7,5 m g⁻¹, aos 90 dias), tendendo o aumento das doses de P a diminuir o MET (Figura 3), embora não se tenham obtidos ajustes de modelos matemáticos significativos. Resultados com a mesma tendência foram obtidos por Miranda & Harris (1994).

É interessante notar que apenas aos 60 dias ficou bem evidente a diminuição do MET com o aumento

das doses de P. Esta observação ressalta a importância de avaliar a produção de MET, bem como as outras variáveis relacionadas em diversas fases do ciclo do hospedeiro (Bethlenfalvay et al., 1982d), visto que o estabelecimento da simbiose com o FMA é um processo dinâmico, em que as mais variadas condições do hospedeiro influenciarão o simbiote, e vice-versa, tanto no que se refere à disponibilidade de P quanto à adaptação do FMA às condições do meio.

Alguns autores (Abbott & Robson, 1985; Sylvia, 1988; Hamel et al., 1990) levantaram questão sobre qual a longevidade da hifa no solo, pois observaram grande incremento da colonização radicular, mas não foi constatado aumento do micélio externo no mesmo período. Uma explicação para o fato seria a rápida reciclagem da hifa externa ou sua degradação por microrganismos do solo. Nesse experimento, houve, em geral, aumentos do MET com o tempo (Figura 3).

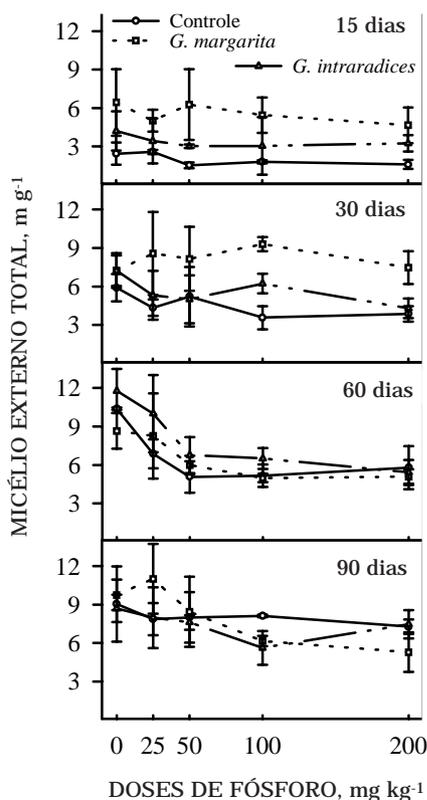


Figura 3. Estimativa do comprimento de micélio externo total em substrato cultivado com soja inoculada com fungos micorrízicos arbusculares (*G. margarita* ou *G. intraradices*) ou não inoculada (Controle), aos 15, 30, 60 e 90 dias do transplante, considerando as doses de P. Barras verticais representam o desvio-padrão de três repetições, quando maiores que os símbolos.

Segundo Abbott & Robson (1985), a capacidade de o FMA colonizar o hospedeiro e produzir micélio externo deve ser considerada na seleção de fungos mais eficientes. Por outro lado, Schubert et al. (1987) salientaram que há pouca relação entre MET e absorção de nutrientes, motivo pelo qual se deve dar mais importância à distribuição espacial dos dois componentes do micélio no solo, considerando também a parte ativa. Sob esse aspecto e nas condições deste experimento, *G. margarita* foi o fungo menos eficiente para as plantas de soja, por ter produzido menos MEA (Figura 2), embora apresentasse nas duas primeiras épocas, tendência de maior produção de MET (Figura 3). Essa baixa eficiência de *G. margarita* em soja foi observada anteriormente, mas apenas para aspectos relacionados com a planta, ou seja, produção de biomassa (Cardoso, 1986; Lambais & Cardoso, 1990). Neste experimento, os aspectos relacionados com o FMA (produção de MEA e MET) permitiram sugerir que a menor eficiência de *G. margarita* em auxiliar o crescimento da soja pode ser atribuída, dentre outros fatores, à menor produção de micélio externo ativo.

Nutrientes

Com relação à concentração de nutrientes na parte vegetativa (folhas + pecíolos + ramos), não se observaram efeitos expressivos da presença dos FMAs, inclusive para o fósforo (dados não apresentados). Contudo, a concentração de ferro e manganês nas vagens foi influenciada pela presença dos FMAs, dependendo da dose de P (Figuras 4a e 4b, respectivamente). A disponibilidade inicial de Fe e Mn no substrato (93 e 11 mg kg⁻¹, respectivamente) é considerada alta (Raij et al., 1996). Entretanto, a inoculação com FMAs nos tratamentos com as menores doses de P resultou em menores concentrações de Fe e Mn nas vagens. É possível que esse comportamento esteja relacionado com a maior percentagem de colonização radicular, comprimento de MEA e MET obtidos nesses tratamentos (Figuras 1, 2 e 3, respectivamente). Com o aumento das doses de P, com a redução da colonização, MEA e MET, as concentrações de Fe e Mn aumentaram até à dose de 100 mg kg⁻¹, com posterior diminuição na dose 200 mg kg⁻¹, com um comportamento quadrático. Nas menores doses de P, o controle sem FMA apresentou as maiores concentrações de Fe e Mn, com diminuição linear com o aumento das doses. Como na dose de 200 mg kg⁻¹ de P, o decréscimo da concentração de Fe e Mn nas vagens ocorreu tanto na presença quanto na ausência dos FMAs, parece haver um efeito atribuível ao P, provavelmente pela formação de complexos de baixa solubilidade com o Fe e Mn, tornando-os menos disponíveis (Habte & Soedarjo, 1996). Esses resultados revelam o efeito protetor dos FMAs em condições de alta disponibilidade de Fe e Mn, quando a colonização radicular e o micélio externo não são limitados pela disponibilidade de P.

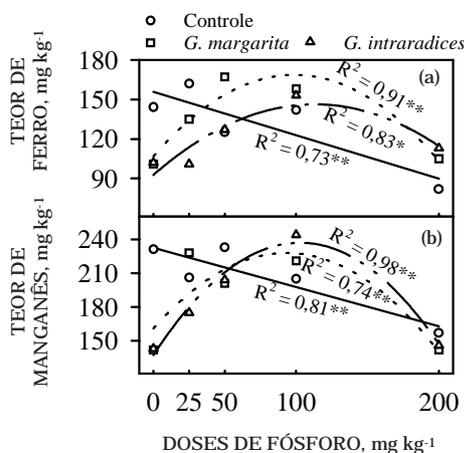


Figura 4. Teores de Fe (a) e Mn (b) nas vagens de plantas de soja inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (*G. margarita* ou *G. intraradices*) ou não inoculadas (Controle), aos 90 dias do transplantio, considerando as doses de P. * Modelos matemáticos de regressão significativos a 5%; ** = significativos a 1% pelo teste F.

Cardoso (1985; 1986) também observou diminuições da concentração de Mn em tecidos de soja na presença de FMAs. Pacovsky et al. (1986) constataram, além de menores teores de Mn, diminuições nos teores de Fe em plantas micorrizadas, sugerindo que mudanças de pH na micorrizosfera podem alterar o estado de oxidação do Mn, o que levaria à alteração da sua absorção. Contudo, os mecanismos pelos quais a micorrização auxilia a proteção da planta contra alta disponibilidade de Fe e Mn, ainda não são conhecidos, sendo necessários mais estudos para sua elucidação.

CONCLUSÕES

1. O fungo micorrízico arbuscular *G. margarita* apresentou menor eficiência no estabelecimento da simbiose com soja, com fase de crescimento lento mais prolongada e menor produção de micélio externo ativo.
2. O incremento das doses de fósforo afetou, de forma diferenciada, o estabelecimento da simbiose entre cada um dos fungos micorrízicos arbusculares e a soja.
3. O incremento das doses de P causou decréscimo do micélio externo ativo, mas não influenciou o micélio externo total na mesma intensidade.
4. Quando ocorreu alta disponibilidade de Fe e Mn no substrato, a presença dos fungos micorrízicos arbusculares auxiliou o hospedeiro na prevenção da absorção excessiva desses íons, quando suficiente colonização radicular foi atingida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Raymond S. Pacovsky, pelas sugestões apresentadas e pela correção do Summary; aos técnicos Denise Lourdes Colombo Mescolotti e Luís Fernando Baldesin, do Laboratório de Microbiologia do Solo (Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ/USP), pelos auxílios prestados durante a instalação e realização do experimento.

LITERATURA CITADA

- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. Infectivity and effectiveness of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi: effect of inoculation type. *Aust. J. Agric. Res.*, 32:631-639, 1981.
- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 99:245-255, 1985.
- BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S. & PACOVSKY, R.S. Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: development of the endophyte. *Phytopathology*, 72:894-897, 1982a.
- BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S. & PACOVSKY, R.S. Parasitic and mutualistic associations between a mycorrhizal fungus and soybean: development of the host plant. *Phytopathology*, 72:889-893, 1982b.
- BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S. & PACOVSKY, R.S. Relationships between host and endophyte development in mycorrhizal soybeans. *New Phytol.* 90:537-543, 1982c.
- BETHLENFALVAY, G.J.; PACOVSKY, R.S.; BROWN, M.S. & FULLER, G. Mycotrophic growth and mutualistic development of host plant and fungal endophyte in an endomycorrhizal symbiosis. *Plant Soil*, 68:43-54, 1982d.
- CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D. & OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citrus. *R. Bras. Ci. Solo*, 10:25-30, 1986.
- CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fosfato-de-rocha na simbiose soja-*Rhizobium*. *R. Bras. Ci. Solo*, 9:125-130, 1985.
- CARDOSO, E.J.B.N. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em soja, com *Rhizobium japonicum* e fosfato de rocha, em função do tipo de solo. *R. Bras. Ci. Solo*, 10:17-23, 1986.
- CARDOSO-FILHO, J.A.; PACOVSKI, R.S. & CARDOSO, E.J.B.N. Growth and metabolic activity of the extramatrical mycelium of endomycorrhizal maize plants. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:807-815, 1999.
- FAQUIN, V. Cinética da absorção de fosfato, nutrição mineral, crescimento e produção da soja sob influência de micorriza vesículo-arbuscular (MVA). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1988. 136p. (Tese de Doutorado)
- GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *endogone* extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 46:235-244, 1963.
- GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, 84:489-500, 1980.
- HABTE, M. & SOEDARJO, M. Response of *Acacia mangium* to vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculation, soil pH, and soil P concentration in an oxisol. *Can. J. Bot.*, 74:155-161, 1996.
- HAMEL, C.; FYLES, H. & SMITH, D.L. Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital stains. *New Phytol.*, 115:297-302, 1990.
- HARRIS, D.; PACOVSKY, R.S. & PAUL, E.A. Carbon economy of soybean-*Rhizobium-Glomus* associations. *New Phytol.*, 101:427-440, 1985.
- JAKOBSEN, I. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. In: VARMA, A. & HOCK, B., eds. *Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology*. Berlin, Springer-Verlag, 1995. p.297-324.
- LAMBAIS, M.R. & CARDOSO, E.J.B.N. Response of *Stylosanthes guianensis* to endomycorrhizal fungi inoculation as affected by lime and phosphorus applications. *Plant Soil*, 129:283-289, 1990.
- MELLONI, R. & CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. I. Método empregado. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:53-58, 1999a.
- MELLONI, R. & CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares em plantas cítricas. II. Comparação entre diferentes espécies cítricas e endófitos. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:59-67, 1999b.
- MINHONI, M.T.A.; CARDOSO, E.J.B.N. & EIRA, A.F. Efeitos da adição de fosfato de rocha, bagaço de cana-de-açúcar, fosfato solúvel e fungo micorrízico no crescimento e na absorção de nutrientes por plantas de soja. *R. Bras. Ci. Solo*, 17:173-178, 1993.
- MIRANDA, J.C.C. & HARRIS, P.J. The effect of soil phosphorus on the external mycelium growth of arbuscular mycorrhizal fungi during the early stages of mycorrhiza formation. *Plant Soil*, 166:271-280, 1994.
- NAGAHASHI, G.; DOUDS Jr., D.D. & ABNEY, G.D. Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. *Mycorrhiza*, 6:403-408, 1996.
- OJALA, J.C.; JARRELL, W.M.; MENGE, J.A. & JOHNSON, E.L.V. Comparison of soil phosphorus extractants as predictors of mycorrhizal dependency. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47:958-962, 1983.
- PACOVSKY, R.S.; BETHLENFALVAY, G.J. & PAUL, E.A. Comparison between P-fertilized and mycorrhizal plants. *Crop Sci.*, 26:151-156, 1986.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assesment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 55:158-161, 1970.

- RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. & FURLANI, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo. Campinas, Instituto Agronômico de Campinas, 1996. 285p. (Boletim técnico, 100)
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análises químicas em plantas. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1974. 56p.
- SCHUBERT, A.; MARZACHÍ, C.; MAZZITELLI, M.; CRAVERO, M.C. & BONFANTE-FASOLO, P. Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol & Schenck. New Phytol., 107:183-190, 1987.
- SILVEIRA, A.P.D. & CARDOSO, E.J.B.N. Kinetics of phosphorus uptake, growth and mineral nutrition of mycorrhizal and non-mycorrhizal bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 8., Wyoming, 1990. Abstracts. Wyoming, Jackson, 1990. p.264.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H. & VALLE, R.R. Effects of P on formation of the VAM symbiosis. Pesq. Agropec. Bras., 19:1465-1474, 1984.
- SYLVIA, D.M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biol. Biochem., 20:39-43, 1988.
- TAWARAYA, K.; WATANABE, S. & YOSHIDA, E. Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. Mycorrhiza, 6:57-59, 1996.