

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

**IEDA RIBEIRO COELHO**

**PRODUÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO:  
OTIMIZAÇÃO EM SUBSTRATO COM ADUBOS ORGÂNICOS**

**RECIFE  
2012**

**IEDA RIBEIRO COELHO**

**PRODUÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO:  
OTIMIZAÇÃO EM SUBSTRATO COM ADUBOS ORGÂNICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Orientadora: Prof. Dra. Leonor Costa Maia  
Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Sergio Barbosa da Silva

**RECIFE  
2012**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Coelho, Ieda Ribeiro**

**Produção de inóculo micorrízico: otimização em substrato com adubos orgânicos/ Ieda Ribeiro Coelho– Recife: O Autor, 2012.**

**42 folhas : tab.**

**Orientadora: Leonor C. Maia**

**Coorientador: Fábio B. Silva**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biologia de Fungos, 2012.**

**Inclui bibliografia**

- 1. Fungos micorrízicos 2. Adubos e fertilizantes I. Maia, Leonor C. (orientadora) II. Silva, Fábio B. (coorientador) III. Título**

**579.5**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB- 2012- 302**

**IEDA RIBEIRO COELHO**

**PRODUÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO:  
OTIMIZAÇÃO EM SUBSTRATO COM ADUBOS ORGÂNICOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 08/03/2012

**COMISSÃO EXAMINADORA  
MEMBROS TITULARES**

---

Dr. Fábio Sergio Barbosa da Silva (Co-orientador)/UPE

---

Dr<sup>a</sup>. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante/ UFPE

---

Dr<sup>a</sup>. Claudia Elizabete Pereira de Lima/UFPE

**MEMBROS SUPLENTES**

---

Dr. Gladstone Alves da Silva/UFPE

---

Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos/Fundação Oswaldo Cruz - CPqAM

**A Jeová Deus,  
Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Considerando essa dissertação como resultado de uma caminhada que se inicia, agradecer pode não ser uma tarefa fácil nem justa. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma contribuíram para a construção do meu trabalho.

Então agradeço a Jeová Deus e especificamente a algumas pessoas pela contribuição direta no projeto do meu desempenho nessa caminhada.

Aos meus pais minha gratidão pela existência de amor e dignidade que sempre me proporcionou mesmo aquele ausente, mas que permanece vivo nos meus ideais.

À Maria do Socorro de Araújo Jordão pela grande amizade, pelo fortalecimento espiritual, pelos momentos de descontração e por me mostrar que as diferenças podem ser importantes na nossa vida.

Ao meu irmão Expedito Ribeiro Coelho, pelas inúmeras vezes que me auxiliou.

À Dra. Leonor Costa Maia, pela paciência e credibilidade em minha possibilidade de realizar esse trabalho, mesmo com pouco tempo de trabalho em conjunto.

Ao Dr. Fábio Sérgio Barbosa da Silva, pela co-orientação, por contribuir para amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que levaram à execução e conclusão dos meus objetivos e, sobretudo, pela paciência.

À Dra. Maryluce Albuquerque, pela grande ajuda em todas as etapas do experimento e pelas referências bibliográficas.

Aos professores da UFPE, que de uma forma ou de outra colaboraram para realização desse trabalho partilhando seus conhecimentos e experiências.

À Renata Ohanna, pela amizade, paciência e pelos conselhos.

Aos colegas do LEFAM, pela imensa ajuda em todas as etapas da dissertação.

À professora Lindete Martins e seu orientando, Rubens, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Micorrizas, pela disposição em ajudar e por minimizarem a distancia.

À Valdirene Pedone Bonfim, pela parceria, incentivo e acima de tudo pela sua atenção e presteza em todos os momentos.

Ao PPG-BF por abrir as portas, possibilitando que eu compartilhasse conhecimentos com professores e colegas da pós-graduação.

À UPE, por ceder espaço físico para desenvolver esse trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq pelo financiamento que possibilitou a execução do projeto.

## RESUMO

O sistema de produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) usando areia e vermiculita irrigados com solução nutritiva é promissor. Porém, fontes orgânicas adicionadas ao substrato de cultivo podem estimular a esporulação dos FMA e substituir a solução nutritiva. O objetivo deste estudo foi selecionar substratos orgânicos que, adicionados ao sistema areia:vermiculita, maximizem a produção de inóculo micorrízico. Foram conduzidos três experimentos: o primeiro para selecionar o substrato orgânico para produção de inóculo; o segundo para determinar a infectividade dos inóculos que produziram mais esporos; o terceiro para avaliar a eficiência dos inóculos produzidos. No primeiro experimento testaram-se quatro substratos usando areia e vermiculita adicionados de: (a) solução nutritiva = controle; (b) 10 % de vermicomposto; (c) 10 % de pó de coco; (d) 10 % de Tropstrato® e quatro isolados de FMA: *Acaulospora longula*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Dentiscutata heterogama* e *Gigaspora albida*. Como hospedeiro, utilizou-se painço (*Panicum miliaceum*). Após 60 dias de manutenção dos potes em telado quantificaram-se os esporos. No segundo experimento, utilizaram-se amostras dos inóculos produzidos com 10 % de vermicomposto. Amostras do inóculo, constituído por esporos, hifas e raízes colonizadas, foram diluídas nas proporções 1:10; 1:100; 1:1000 (v/v) com areia autoclavada utilizando-se milho como planta hospedeira. Após 30 dias em telado, foi avaliada a presença de estruturas micorrízicas nas raízes para determinar o número mais provável de propágulos infectivos. Raízes cultivadas no substrato 1:10 também foram usadas para avaliação da infectividade dos inóculos pelo método da percentagem média de infecção. No terceiro experimento, os isolados produzidos com vermicomposto (10%) foram testados quanto à eficiência em plantas de milho, em solo coletado em área de Caatinga nativa. Após 70 dias da inoculação avaliou-se a biomassa das mudas. A produção de esporos variou em função da fonte orgânica adicionada. O vermicomposto adicionado à areia e vermiculita proporcionou maior esporulação para o isolado de *A. longula*, em relação aos demais substratos. O inóculo de *A. longula* produzido também apresentou elevado número de propágulos infectivos e eficiência em promover acúmulo de biomassa em plantas de milho. Conclui-se que o sistema de produção de inóculo utilizando areia e vermiculita + 10 % vermicomposto favorece a produção de inóculo infectivo de *A. longula*, com o fungo beneficiando o crescimento do hospedeiro.

**Palavras-chave:** FMA. Biofertilizantes. Vermicomposto.

## ABSTRACT

The system of production of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) using sand and vermiculite irrigated with nutrient solution is promising. However, organic amendments added to the substrate can stimulate sporulation of AMF and replace the nutrient solution. The aim of this study was to select organic substrates which, added to the system sand: vermiculite, maximize the production of mycorrhizal inoculum. Three experiments were conducted: the first to select the organic substrate for the production of inoculum; the second to determine the infectivity of inoculum that produced more spores; the third to evaluate the efficiency of the inoculum produced. In the first experiment, the treatments consisted of four substrates [sand and vermiculite added of: (a) nutrient solution = control; (b) 10 % of vermicompost; (c) 10 % of coconut powder; (d) 10 % Tropstrato®] and four AMF: *Acaulospora longula*, *Claroideoglossum etunicatum*, *Dentiscutata heterogama* and *Gigaspora albida*. *Panicum miliaceum* (millet) was used as host. After 60 days of maintenance of the pots in a greenhouse the spores were quantified. In the second experiment, inoculum produced with 10% vermicompost was used. Samples of inoculum consisting of spores, hyphae and colonized roots were diluted [1:10, 1:100, 1:1000 (v / v)] with autoclaved sand using *Zea mays* (maize) as host plant. After 30 days in the greenhouse the presence of mycorrhizal structures was assessed in the roots to determine the most probable number of infective propagules. Roots grown in the substrate 1:10 were also used to evaluate the infectivity of the inoculum by the average percentage of infection. In the third experiment, the efficiency of the inoculum produced in vermicompost (10 %) was tested in maize plants, in soil collected in an area of native Caatinga. After 70 days of inoculation, biomass of the seedlings was evaluated. The production of spores varied according to the organic source added. The vermicompost added to sand and vermiculite provided the highest number of spores of *A. longula*, compared to other substrates. The inoculum of *A. longula* also showed a high number of infective propagules and promoted biomass accumulation in maize plants. In conclusion, the inoculum production system using sand and vermiculite + 10 % vermicompost favors the production of infective inoculum of *A. longula* with the fungus benefiting the host growth.

**Key-words:** AMF. Biofertilizer. Vermicompost.

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Métodos usados para produção de FMA .                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 15 |
| Tabela 2. Ensaios que testaram a eficiência de inóculos de FMA.                                                                                                                                                                                                                                                                             | 21 |
| Tabela 3. Caracterização física e química dos substratos usados para produção de inóculo de FMA.                                                                                                                                                                                                                                            | 24 |
| Tabela 4. Produção de esporos de fma (ga- <i>Gigaspora albida</i> ; ce- <i>claroideoglomus etunicatum</i> ; al- <i>Acaulospora longula</i> ; dh- <i>Dentiscutata heterogama</i> ) em substratos à base de areia e vermiculita adicionados de substratos orgânicos, utilizando painço como hospedeiro, 60 dias após a inoculação, em telado. | 27 |
| Tabela 5. Número de propágulos infectivos nos inóculos produzidos em substratos à base de areia e vermiculita adicionados de 10 % de vermicomposto e colonização micorrízica em raízes de milho 30 dias após a inoculação.                                                                                                                  | 29 |
| Tabela 6. Matéria fresca e seca de plantas de milho ( <i>Zea mays</i> ) cultivadas em solo nativo da caatinga, inoculadas com 10 ml de solo-inóculo, e mantidas em casa de vegetação por 70 dias.                                                                                                                                           | 30 |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                          |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                | <b>10</b> |
| <b>2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>                                                                                      | <b>12</b> |
| 2.1 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES.....                                                                                | 12        |
| 2.2 PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FMA.....                                                                                      | 14        |
| 2.3 SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FMA.....                                                                      | 17        |
| <b>2.3.1 Resíduo da casca do coco (pó de coco).....</b>                                                                  | <b>18</b> |
| <b>2.3.2 Vermicomposto .....</b>                                                                                         | <b>19</b> |
| 2.4 INFECTIVIDADE DE INÓCULOS DE FMA.....                                                                                | 20        |
| 2.5 EFETIVIDADE DE INÓCULOS DE FMA .....                                                                                 | 20        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                                        | <b>23</b> |
| 3.1 EXPERIMENTO 1 – SELEÇÃO DE SUBSTRATOS ORGÂNICOS PARA PRODUÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO .....                           | 23        |
| 3.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE INÓCULO MICORRÍZICO PRODUZIDO EM SUBSTRATOS COM ADUBOS ORGÂNICOS ..... | 25        |
| 3.3 EXPERIMENTO 3 - EFETIVIDADE DE FMA MULTIPLICADOS EM SUBSTRATOS COM ADUBOS ORGÂNICOS .....                            | 25        |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                                                                    | <b>27</b> |
| <b>5 CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                | <b>32</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                 | <b>33</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Trabalhos desenvolvidos no Brasil e em outros países têm relatado a importância dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) tanto para a agricultura como para programas de reflorestamento de áreas degradadas (TRISTÃO et al. 2006, SILVA et al. 2008, CHAUDHARY et al. 2008, SINGH et al. 2011). O Brasil apresenta grande potencial para utilização dessa ferramenta biotecnológica (SOUZA et al. 2006b); no entanto, um dos entraves para a aplicação dos FMA é a produção de inóculo em larga escala, dificultada pelo fato desses fungos serem biotróficos obrigatórios.

Vários métodos têm sido testados para a produção de inóculo micorrízico; entre os mais conhecidos estão a aeroponia, a hidroponia, o cultivo *in vitro*, e a produção em potes e em campo (IJDO et al. 2011). Tradicionalmente, a multiplicação desses fungos é feita em “potes de cultura”, onde são cultivados em associação com raízes de uma planta hospedeira, em determinado substrato (GAUR; VARMA 2007).

O substrato escolhido para cultivo dos FMA pode influenciar diretamente a produção e a infectividade do inóculo (BABY; MANIBHUSHANRAO 1996, JAYARATNE; SIRIWARDENE 2000), e deve conter os nutrientes mínimos para garantir a sobrevivência da planta hospedeira para que o fungo possa esporular e multiplicar (JARSTFER; SYLVIA 1992; SILVA et al. 2005).

Um sistema promissor é o uso de areia e vermiculita, que favorece a produção de glomerosporos com elevada infectividade (SILVA et al. 2005; 2007). No entanto, a suplementação de solução nutritiva ao substrato é um empecilho à operacionalização do sistema. O uso de fontes orgânicas adequadas poderia resolver o problema, reduzindo o custo de produção, considerando que tais materiais fornecem nutrientes de forma balanceada (SILVA et al. 2008, DOUDS Jr. et al. 2010).

A capacidade infectiva e a eficiência dos isolados produzidos são aspectos importantes para definir a qualidade do inóculo (GIANINAZZI; VOSÁTKA 2004). A infectividade pode ser estimada a partir da observação de estruturas fúngicas na raiz por várias técnicas que indicarão a viabilidade do inóculo (FELDMANN; IDCZAK 1994; INVAM 2010). Porém, a eficiência do isolado nem sempre está relacionada com o grau de colonização micorrízica (CORKIDI et al. 2004), sendo necessário testar também a efetividade do inóculo.

A produção em larga escala de inóculo de FMA infectivo e eficiente, utilizando materiais de baixo custo e de fácil acesso continua sendo uma necessidade para viabilizar a aplicação desses fungos na agricultura e em programas de recuperação ambiental. Objetivou-se neste

trabalho selecionar substratos orgânicos que maximizem a produção de inóculo micorrízico de qualidade.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES

Micorriza arbuscular é uma simbiose estabelecida entre fungos micorrízicos arbusculares (FMA) e um hospedeiro vegetal. Esta associação resulta em vantagem para os parceiros, com os FMA aumentando a absorção de nutrientes do solo e repassando-os para a planta que, em troca, fornece carboidratos para o fungo (SMITH; READ 2008). Além de melhorar o estado nutricional das plantas, os FMA desempenham papel ecológico na produção, sucessão e diversidade de espécies vegetais (KLIRONOMOS et al. 2000 ) e na qualidade do solo (RILLIG 2004).

Classificados anteriormente na ordem Glomales, do Filo Zigomycota (MORTON; BENNY 1990), os FMA hoje constituem o filo Glomeromycota, proposto por Schubssler et al. (2001). Esta classificação foi baseada em análises moleculares, especificamente no seqüenciamento do DNA ribossomal, sendo os fungos desse grupo separados em um clado monofilético. O filo Glomeromycota compreende os FMA e um membro que forma associação com cianobactérias: *Geosiphon pyriforme* (SCHUBSSLER et al. 2005). A classificação do filo vem sofrendo alterações, com novas famílias, gêneros e espécies sendo descritos. Um exemplo disso é que se em 2010 eram reconhecidos 19 gêneros (MAIA et al. 2010), hoje esse número chega a 29 gêneros (OEHL et al. 2011).

As micorrizas arbusculares são caracterizadas por algumas estruturas, tais como hifas intercelulares e intracelulares, arbúsculos, micélio extraradicular, e esporos, podendo ser observadas, em alguns gêneros, vesículas intraradiculares ou células auxiliares extraradiculares (PETERSON et al. 2004). As hifas dos FMA são cenocíticas e os esporos, denominados glomerosporos, são formados separadamente ou agrupados (GOTO; MAIA 2006).

Um esporo quiescente germina quando alguns fatores estão presentes (MAIA et al. 2010), e ocorrem interações entre os diferentes fatores de ativação como pH, umidade, temperatura, luminosidade, radiação, nutrientes, planta hospedeira, microrganismos e substâncias orgânicas (GIOVANNETTI et al. 2010; MAIA et al. 2010). No processo de germinação e no crescimento do micélio assimbiótico ocorre intensa atividade no citoplasma, incluindo mudanças bioquímicas (GIOVANNETTI et al. 2010), entre as quais a síntese de RNA, proteínas, aminoácidos, lipídios, carboidratos neutros (MOREIRA; SIQUEIRA 2002) e a replicação do DNA nuclear (BÉCARD; PFEFFER 1993), mas não foi observada a síntese de

ácidos graxos (TRÉPANIER et al. 2005). O estoque de lipídios do esporo é translocado e utilizado como fonte de carbono durante a germinação e o crescimento inicial das hifas (BAGO et al. 2002).

Um grande número de espécies de FMA é capaz de colonizar diversos vegetais (BRUNDRETT 2009), e um mesmo hospedeiro difere quanto à resposta à colonização em função do fungo associado (HART; READER 2002). As espécies vegetais diferem quanto à resposta à inoculação (SIQUEIRA; SAGGIN-JÚNIOR 2001) e mesmo sem especificidade, há certa compatibilidade entre o fungo e o hospedeiro (POUYU-ROJAS et al. 2006, SILVA et al. 2004).

O mecanismo da colonização é geralmente semelhante; os esporos germinam e dão origem a hifas que crescem por alguns dias na ausência da raiz do hospedeiro, após o reconhecimento do hospedeiro, essas hifas desenvolvem unidades de infecção, denominadas apressórios, para colonizar as células epidermais e posteriormente as células corticais da raiz (LAMBAIS 2006). A formação do apressório está ligada ao genoma da planta, visto que em plantas não-hospedeiras pode não haver formação de apressórios funcionais (GIOVANNETTI et al. 1994). Na medida em que as hifas do fungo atingem o córtex se diferenciam dentro das células em estruturas altamente ramificadas denominadas arbúsculos (LAMBAIS 2006), o que gera mudanças na reorganização celular vegetal: o núcleo migra do seu lugar original, os vacúolos são fragmentados, os plastídios reorganizam-se, e há criação de um novo espaço apoplástico (BONFANTE et al. 2009). A principal função do arbúsculo é a troca de nutrientes, visto que tais estruturas têm maior superfície de contato com a planta; por outro lado o micélio externo, além de importante para produção de esporos, participa na absorção de nutrientes (SMITH; READ 2008). Mesmo produzindo essas estruturas, as micorrizas arbusculares não produzem alterações macroscópicas nas raízes colonizadas (PETERSON et al. 2004).

O micélio externo dos FMA produz glicoproteínas hidrofóbicas denominadas glomalinas ou proteínas do solo relacionadas à glomalina (PSRG). As PSRG promovem a agregação de partículas do solo, formando poros que permitem a penetração de água, oxigênio e raízes. A contribuição das PSRG na agregação do solo torna-se maior do que a trama micelial, pois persiste no solo em tempo muito superior ao das hifas (RILLIG 2004). Apesar da importância, poucos estudos sobre esses glicoconjugados protéicos foram conduzidos no Brasil (MERGULHÃO et al. 2008) e a maioria focaliza a relação da glomalina com a qualidade do solo (PURIN; KLAUBERG FILHO 2010, FREITAS et al. 2011).

Os FMA são totalmente dependentes de plantas hospedeiras para completar seu ciclo de vida e por isso sua natureza simbiotrófica obrigatória tem dificultado os estudos (FORTIN et al. 2005). No entanto, na ausência de vegetais, só é possível estudar a fase assimbiótica, que compreende a formação do tubo germinativo e a produção limitada de micélio (MAIA et al. 2010).

Diversas pesquisas têm demonstrado que a aplicação de FMA na fase de muda favorece o crescimento vegetal, devido ao melhor estado nutricional da planta associada (SILVA et al. 2004), reduzindo o tempo das mudas em viveiro (CAVALCANTE et al. 2002, SILVA et al. 2008) e aumentando o acúmulo de nutrientes e fitoquímicos (CHAUDHARY et al. 2008). Essa associação proporciona benefício para a planta pela absorção de nutrientes do solo, principalmente do fósforo e melhor aproveitamento da adubação fosfatada, aumentando a eficiência da utilização do fósforo natural ou adicionado ao solo (MIRANDA; MIRANDA 1997).

Além dos benefícios nutricionais, as mudanças na fisiologia vegetal aumentam a tolerância aos patógenos (POZO et al. 2010). Plantas micorrizadas podem ser mais resistentes ou tolerantes a patógenos, por mecanismos diversos e complexos, resumidos em: barreira mecânica, produção de compostos antibióticos, competição por nutrientes e indução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (MAIA et al. 2006).

A aplicação dos FMA também é uma ferramenta biotecnológica na fitorremediação e fitoestabilização em solos contaminados (TURNAU et al. 2010). Plantas micorrizadas podem absorver mais elementos-traços contaminantes, impedindo a lixiviação destes no solo (REDON et al. 2008) ou restringir a absorção do metal (XU et al. 2008). No entanto, para cada caso deve-se considerar a espécie vegetal, o isolado fúngico, o metal envolvido e as condições ambientais (TURNAU et al. 2010).

## 2.2 PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FMA

A prática da inoculação com FMA é fundamental, pois condições adversas no solo tais como salinidade, inundações, distúrbios de natureza antrópica, climas extremos, entre outras, podem limitar o número de propágulos de FMA no solo (BAGYARAJ; REDDY 2005, TANU et al. 2006). Durante o processo de produção de mudas de espécies florestais e frutíferas tropicais usa-se com frequência solo esterilizado para eliminar ou reduzir patógenos, eliminando-se também os FMA nativos, e alguns substratos usados na fitotecnia, como a

vermiculita e diversos materiais orgânicos, são desprovidos de FMA (MIRANDA; MIRANDA 1997). Além disso, mesmo quando há diversidade nas comunidades nativas de FMA, essas não garantem maior eficiência micorrízica (CARRENHO et al. 2010), considerando que fungos introduzidos podem ser mais competitivos que os nativos (SOUZA et al. 2010).

A incapacidade de cultivo em meio axênico tem dificultado a produção de inóculo de FMA em escala industrial e o seu uso na agricultura (PETERSON et al. 2004). Visando transpor esse obstáculo, diversas metodologias têm sido desenvolvidas (Tabela 1); tais métodos podem ser divididos em livres de solo (aeroponia, hidroponia e cultivo *in vitro*) ou com solo (“potes de cultura” e produção em campo), e em ambas as formas são necessárias raízes metabolicamente ativas (IJDO et al. 2011, MEHROTRA 2005).

Tabela 1. Métodos usados para produção de FMA

| <b>Método</b>           | <b>Referências</b>           |
|-------------------------|------------------------------|
| Aeroponia               | Hung e Sylvia 1988           |
|                         | Mohammand <i>et al.</i> 2000 |
|                         | Paiva <i>et al.</i> 2003     |
| Hidroponia              | Hawkins e George 1997        |
|                         | Dugassa <i>et al.</i> 1995   |
| Cultivo <i>in vitro</i> | Fortin <i>et al.</i> 2005    |
|                         | Liu e Yang 2008              |
| Potes de cultura        | Zambolim <i>et al.</i> 1992  |
|                         | Gaur e Adholeya 2000         |
|                         | Bagyaraj e Reddy 2005        |
|                         | Silva 2006                   |
| Produção em campo       | Singh <i>et al.</i> 2011     |
|                         | Douds <i>et al.</i> 2006     |
|                         | Douds <i>et al.</i> 2010     |

Os sistemas livres de solo obtiveram sucesso para fins de estudo, mas não podem ser usados para produção em grande escala devido aos altos custos envolvidos (GENTILI; JUMPPONEN 2006). Além disso, o uso dos inoculantes produzidos nesses sistemas é, na maioria das vezes, restrito a aplicações em menor escala e em pesquisas científicas (IJDO et al. 2011).

O sistema mais usado e que pode ser de baixo custo é o “pote de cultura”, que consiste na multiplicação de FMA em raízes de uma planta hospedeira em solo ou outro substrato desinfestado (GAUR; VARMA 2007). Algumas companhias produtoras de inoculante micorrízico utilizam sistemas de produção em substratos (MEHROTRA 2005). As principais coleções de cultura de FMA (Banque Européene des Glomeromycota – BEG e International Culture Collection of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi – INVAM) realizam a propagação dos fungos utilizando tal metodologia (DALPÉ; MONREAL 2004).

O inóculo de FMA produzido nesse sistema é composto por esporos, hifas e fragmentos de raízes colonizadas presentes no substrato utilizado (TANU et al. 2006). Tanto as hifas como os esporos são capazes de colonizar raízes, mas os esporos, por serem estruturas de resistência, são mais utilizados para quantificar e assim avaliar a eficácia do método empregado (SILVA et al. 2005; 2007, ZAMBOLIM et al. 1992). No entanto, as hifas são mais rápidas para colonizar em relação aos esporos (VOETS et al. 2009), mas uma desvantagem das hifas como fonte de inóculo é a perda da viabilidade acentuada (STEINBERG; RILLIG 2003).

Alguns aspectos devem ser levados em consideração para a produção de inóculo micorrízico; o inoculante deve ter elevada densidade de esporos, ser infectivo, efetivo e estar livre de contaminantes microbianos (HABTE; OSORIO 2001). Adicionalmente, há necessidade do desenvolvimento de tecnologias para sistemas de produção que sejam economicamente praticáveis (GIANINAZZI; VOSÁTKA 2004). Alguns países, como Estados Unidos, Reino Unido, Suíça, Alemanha, República Checa, Espanha e França produzem comercialmente inoculante micorrízico (VOSÁTKA et al. 2008), porém em outros países, como no Brasil, o inoculante desses fungos ainda não está sendo comercializado por falta de tecnologia para produzi-lo (SAGGIN JÚNIOR; SILVA 2006).

O Brasil apresenta grande potencial para utilização de FMA, considerando que o seu uso promove ganhos em produção e consequentemente, retorno financeiro (SOUZA et al. 2006b), daí a importância da produção de inóculo micorrízico em larga escala no país.

### 2.3 SUBSTRATOS PARA PRODUÇÃO DE INÓCULO DE FMA

A escolha do substrato para produção de inóculo micorrízico vai depender da composição física e química, da disponibilidade, do custo e da densidade do material (SILVA 2006). Alguns materiais à base de materiais inorgânicos (SILVA et al. 2005, SINGH et al. 2011) e adubos orgânicos (DOUDS Jr. et al. 2010) ou misturas de ambos os materiais (ZAMBOLIM et al. 1992) têm sido estudados.

Tradicionalmente, para a multiplicação de FMA tem sido empregado solo, areia e suas misturas (SIEVERDING et al. 1991, SAGGIN-JÚNIOR; SILVA 2006). Tais materiais facilitam a drenagem e a aeração, no entanto, o peso do substrato tem limitado a produção e a comercialização do inóculo, restringindo a sua aplicação (SAGGIN-JÚNIOR; SILVA 2006). Materiais orgânicos têm sido usados com o objetivo de diminuir o custo da produção (JAYARATNE; SIRIWARDENE 2000). Entre esses estão compostos de folhas (GAUR; ADHOLEYA 2002), esterco de galinha (ZAMBOLIM et al. 1992), quitina (GRYNDLER et al. 2003), compostos a partir de frutas e verduras, terra vegetal e esterco bovino (SILVA 2006).

A adição de matéria orgânica estimulou a colonização de raízes de bambu e a esporulação de três isolados de FMA (VERMA; ARYA 1998). Resultados similares foram obtidos para riqueza, dominância e diversidade de FMA em cultivo orgânico de citros, em comparação ao sistema convencional (FRANÇA et al. 2007). Entretanto, compostos presentes em resíduos orgânicos podem afetar negativamente o desenvolvimento do fungo micorrízico (MARTÍN et al. 2002, SILVA 2006).

Tanto os benefícios da micorrização como o sucesso na multiplicação dos FMA são geralmente modulados pela composição e características físicas do substrato, que influenciam a produção de biomassa fúngica e a colonização radicular (CARRENHO et al. 2010). Os múltiplos efeitos ocasionados pelas características do substrato podem afetar desde a germinação do esporo ao estabelecimento da simbiose (GIOVANNETTI et al. 2010). Geralmente, os substratos utilizados para a multiplicação dos FMA possuem condições físicas e nutricionais mínimas para crescimento do vegetal, não comprometendo o ciclo de vida do fungo (SILVA et al. 2005).

A composição química e física do substrato orgânico pode ter efeito positivo (CAVENDER et al. 2003) ou negativo (MARTÍN et al. 2002) sobre a capacidade dos FMA em colonizar as raízes. Jayaratne; Siriwardene (2000) observaram que o inóculo de *Acaulospora spinosa* produzido em composto orgânico vegetal permaneceu infectivo durante

18 meses. Resultados semelhantes foram obtidos com isolados de *Glomus etunicatum*, *Acaulospora longula* e *Scutellospora heterogama* multiplicados em substratos com terra vegetal (Silva 2006).

Um sistema promissor para a produção de inóculo é o uso de areia e vermiculita (1:1 v/v) irrigados com solução nutritiva de Hoagland; Arnon, modificada por Jarstfer; Sylvia (1992) e suplementada com Tris-HCl (SILVA et al. 2005; 2007). No entanto, um dos entraves para seu uso em larga escala é o difícil acesso para pequenos produtores, visto que envolve a utilização, entre outros, de nitrato de potássio, cuja comercialização é controlada pelo Exército Brasileiro (DFPC 2000). Portanto, é necessário buscar materiais que estejam disponíveis e que possuam baixo custo para substituir a solução nutritiva nesse método.

### **2.3.1 Resíduo da casca do coco (pó de coco)**

A casca de coco é constituída por duas frações: as fibras e a fração denominada pó. O pó pode ser obtido como resíduo do processamento da casca de coco maduro para obtenção da fibra longa ou por uma sequência de operações, compreendendo as etapas de dilaceração, moagem, classificação, lavagem e secagem da casca, quando o coco está verde (ROSA et al. 2001). Atualmente, o resíduo ou pó da casca de coco tem sido indicado como substrato agrícola, principalmente por proporcionar alta porosidade, alto potencial de retenção de umidade e por ser biodegradável. É um meio de cultivo natural e indicado para germinação de sementes (SOUZA et al. 2007), propagação de plantas em viveiros (Correia et al. 2003), cultivo de flores (ASSIS et al. 2009) e de hortaliças (BEZERRA; ROSA 2002, OLIVEIRA et al. 2008).

Substratos à base de pó de coco apresentam maior capacidade de recipiente, de areação e porosidade, e menor densidade global e de partículas em comparação ao solo (LACERDA et al. 2006). Porém, têm capacidade de retenção de água inferior ao da turfa (NOGUERA et al. 2000).

A composição química do pó de coco favorece o uso como substrato agrícola (CORREIA et al. 2003) e os resíduos possuem mais lignina e celulose do que hemicelulose (NOGUERA et al. 2000). Quanto aos nutrientes disponíveis, foram observados altos teores de fósforo e potássio e baixos teores de nitrogênio, cálcio e magnésio, em comparação ao da turfa. O pH do pó de coco pode variar de 5,06 a 6,14 em função das diferentes fontes (ABAD et al. 2002),

mas, em geral, as características químicas não impedem que o pó de coco seja utilizado em formulações de substrato para formação de mudas (LACERDA et al. 2006).

Em relação aos fungos micorrízicos, quando aplicado ao solo, o pó de coco, favoreceu a colonização por *G. albida* em maracujazeiro-doce (Silva 2006) e FMA nativos em arroz (BABY; MANIBHUSHANRAO 1996), embora o mesmo não tenha ocorrido para *Glomus intraradices*, *Glomus etunicatum* e *Gigaspora margarita* em mudas de cafeeiro (TRISTÃO et al. 2006). Quanto ao papel desse substrato na produção de inóculo micorrízico, Jayaratne; Siriwardene (2000) o indicaram como meio para multiplicação de *Acaulospora spinosa* em larga escala.

### 2.3.2 Vermicomposto

O vermicomposto é resultado da transformação biológica de resíduos orgânicos, por ação de minhocas do gênero *Eisenia*, que atuam acelerando o processo de decomposição (Ricci 1996). Os estercos de animais são os materiais mais utilizados na vermicompostagem, mas podem ser utilizadas misturas com resíduos vegetais como restos de culturas, resíduos de agroindústrias e a fração orgânica dos lixos domiciliares e urbanos (RICCI 1996). A aplicação do vermicomposto é indicada em algumas situações para substituir total ou parcialmente os adubos químicos, pois favorece a associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio (VENTURINI et al. 2003), enraizamento de estacas (SINGH et al. 2011) e a produção de mudas (SILVA et al. 2008), entre outras aplicações.

As características físicas do vermicomposto favorecem sua aceitação e larga utilização na agricultura orgânica (KONZEN 1999), aumentando a disponibilidade de nutrientes em relação aos compostos comuns (SAMARANAYAKE; WIJEKOON 2010). O pH do vermicomposto varia entre 6 e 9,3, justificado pelos diferentes materiais utilizados para vermicompostagem e maiores teores de celulose do que de lignina (LAMIM et al. 1998, SOUZA et al. 2006). Além de servir como fonte de nutrientes para plantas, o vermicomposto pode ser utilizado na recuperação de áreas degradadas e/ou impactadas por metais pesados (LAMIM et al. 1998).

Em condições de agricultura orgânica, o vermicomposto pode ser um excelente meio para transferir propágulos de FMA e outros bioinoculantes (SINGH et al. 2011). O uso de vermicomposto estimulou a colonização micorrízica por *G. albida* em mudas de gravioleiras (SILVA et al. 2008), mas efeitos negativos sobre os FMA, possivelmente devido aos altos níveis de P ( $209 \text{ mg P dm}^{-3}$  solo), também foram observados (SILVA et al. 2006). Tais resultados variáveis podem estar relacionados com o isolado fúngico testado (SILVA et al.

2008), a concentração (SILVA 2006) e a fonte do vermicomposto utilizado (SOUZA et al. 2006a).

#### 2.4 INFECTIVIDADE DE INÓCULOS DE FMA

A infectividade de FMA refere-se à capacidade dos propágulos, esporos, hifas e fragmentos de raízes colonizadas, em colonizar a raiz de hospedeiro (PLENCHETTE et al. 1989). A capacidade infectiva do inóculo deve ser testada visto que a efetividade pode estar relacionada com a eficácia em colonizar as raízes; além disso, essa capacidade nem sempre está relacionada com a densidade de propágulos (CORKIDI et al. 2004). O entendimento do comportamento dos fungos em campo depende do conhecimento da biologia dos mesmos; espécies de *Acaulospora* e *Glomus*, por exemplo, colonizam raízes a partir de esporos, hifas e fragmentos de raízes colonizadas, enquanto os representantes de *Gigaspora* e *Scutellospora* colonizam apenas a partir de esporos (KLIRONOMOS; HART 2002). A perda da infectividade está relacionada com o ciclo de vida ou com fatores externos, tais como distúrbios no solo (JASPER et al. 1993).

A quantidade de propágulos infectivos de FMA no solo pode ser estimada pelo método do número mais provável (NMP), o qual consiste na utilização de várias diluições do inóculo em substrato esterilizado e plantas altamente micotróficas (FELDMANN; IDCZAK 1994). Este método pode ser aplicado em várias situações, como comparar a capacidade infectiva em áreas reflorestadas (CAPRONI et al. 2003), avaliar o potencial infectivo de FMA em determinadas áreas sob diferentes manejos (WANG et al. 2008), equalizar a inoculação em ensaios de eficiência (SILVA et al. 2006), quantificar os propágulos infectivos do inóculo produzido (DOUDS et al. 2006), entre outros. Outro método utilizado para o mesmo fim é o da percentagem média de infecção (MIP) o qual, além de usado para avaliar a infectividade é indicado para testar ou comparar inoculantes (INVAM 2010).

#### 2.5 EFETIVIDADE DE INÓCULOS DE FMA

Para que o inóculo micorrízico produzido seja considerado de qualidade alguns fatores devem ser considerados, e dentre estes, a efetividade (GIANINAZZI e VOSÁTKA 2004). O termo “efetividade” faz referencia à capacidade dos FMA promoverem o crescimento da planta (JANOS 2007). Além da fitomassa, outros parâmetros são usados para avaliar o crescimento vegetal promovido pela associação micorrízica, tais como teor de nutrientes, especialmente do P (HART; READER 2002), área foliar, altura da planta, número de folhas,

diâmetro do caule (SILVA et al. 2004), acúmulo de compostos secundários (CHAUDHARY et al. 2008), entre outros.

O método utilizado e o vegetal testado em ensaios de efetividade variam de acordo com o objetivo e necessidade local (Tabela 2), sendo considerado ainda que o substrato pode influenciar na eficiência do isolado (SILVA 2006). Tradicionalmente, a efetividade de um fungo é testada em solo desinfestado para eliminar os microrganismos existentes, principalmente os FMA nativos (SIEVERDING et al. 1991) e sob condições próximas às naturais e em campo (SANTOS et al. 2000).

Tabela 2. Ensaios que testaram a eficiência do inóculo de FMA

| FMA                                                                                                                  | Substrato utilizado para multiplicação do inóculo         | Plantas testadas                                       | Resposta à inoculação | Referências           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <i>Gigaspora albida</i><br><i>Glomus etunicatum</i><br><i>Acaulospora longula</i>                                    | Areia + vermiculita irrigados com solução nutritiva       | <i>Alpinia purpurata</i><br><i>Zingiber spectabile</i> | Negativa              | Silva et al. 2006     |
| <i>Glomus aggregatum</i> +<br><i>G. fasciculatum</i> +<br><i>G. intraradices</i> +<br><i>G. mosseae</i>              | Areia + solo                                              | <i>Pogostemon cablin</i>                               | Positiva              | Sing et al. 2011      |
| <i>Gigaspora albida</i><br><i>Acaulospora longula</i>                                                                | Solo<br>Solo + composto orgânico<br>Areia + terra vegetal | <i>Annona muricata</i>                                 | Positiva              | Silva et al. 2008     |
| <i>Glomus etunicatum</i> +<br><i>Glomus claroideum</i> +<br><i>Gigaspora gigantea</i>                                | Vermiculita + composto vegetal                            | <i>Solanum tuberosum</i>                               | Positiva              | Douds Jr. et al. 2007 |
| <i>Glomus etunicatum</i> +<br><i>Glomus mosseae</i> +<br><i>Glomus geosporum</i>                                     |                                                           |                                                        |                       |                       |
| <i>Glomus etunicatum</i> +<br><i>Glomus claroideum</i> +<br><i>Glomus geosporum</i> +<br><i>Gigaspora rosea</i>      | Vermiculita + composto vegetal                            | <i>Fragaria x ananassa</i>                             | Positiva              | Douds Jr. et al. 2008 |
| <i>Gigaspora albida</i><br><i>Acaulospora longula</i><br><i>Glomus etunicatum</i><br><i>Scutellospora heterogama</i> | Solo<br>Solo + composto orgânico                          | <i>Passiflora alata</i>                                | Positiva              | Silva 2006            |

Fungos isolados de um determinado ambiente podem ser mais eficientes do que os introduzidos por estarem mais adaptados às condições do meio (CALVENTE et al. 2004) visto que os níveis de fertilidade do solo podem limitar a predominância de determinadas estruturas micorrízicas ligadas à eficiência micorrízica (POSADA et al. 2008). Mas, dependendo das circunstâncias, como metais pesados (WEISSENHORN et al. 1994), nutrição fosfatada (BAGYARAJ; REDDY 2005), entre outros, fungos introduzidos também podem se mostrar mais competitivos que os nativos (SOUZA et al. 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Três experimentos foram conduzidos: no primeiro, selecionou-se o substrato orgânico para produção de inóculo de FMA; no segundo, determinou-se a infectividade dos inóculos que produziram mais esporos; e no terceiro avaliou-se a eficiência dos inóculos testados em aumentar o crescimento de plantas de milho. Todos os experimentos foram conduzidos em telado, na Universidade de Pernambuco, em Petrolina, PE. Os inóculos iniciais foram produzidos em substratos orgânicos (terra vegetal e composto orgânico), usando painço (*Panicum miliaceum* L) como planta hospedeira, e estocados a -4 °C em 28 meses (SILVA 2006).

#### 3.1 EXPERIMENTO 1 – SELEÇÃO DE SUBSTRATOS ORGÂNICOS PARA PRODUÇÃO DE INÓCULO MICORRÍZICO

Testaram-se quatro substratos para produção do inóculo de FMA tendo como base areia e vermiculita (1:1 v/v) adicionados de: (a) solução nutritiva = controle; (b) 10 % de vermicomposto (v/v); (c) 10 % de pó de coco (v/v); (d) 10 % de Tropstrato® (v/v), substrato de uso comercial à base de vermiculita, carvão vegetal e casca de pinus. A areia foi lavada e, assim como a vermiculita, desinfestada em autoclave (120 °C, 30min) por dois dias consecutivos. Após as misturas, amostras de cada substrato foram encaminhadas para análises químicas e físicas, na Embrapa Semi-Árido (Tabela 3). Posteriormente, os substratos foram acondicionados em vasos com capacidade para 400 mL. Os substratos orgânicos foram adquiridos comercialmente e são amplamente utilizados na agricultura.

Como hospedeiro, utilizou-se painço (*Panicum miliaceum* L). As sementes foram desinfestadas (hipoclorito de sódio 0,5 % por 3 min.) e lavadas com água destilada.

Foram testados quatro isolados de FMA: *Acaulospora longula* Spain e Schenck (UFPE 21), *Claroideoglossum etunicatum* (W.N. Becker e Gerd.) C. Walker e A. Schüßler (UFPE 06), *Dentiscutata heterogama* (T.H. Nicolson e Gerd.) Sieverd., F.A. Souza e Oehl (UFPE 19) e *Gigaspora albida* Schenck e Smith (UFPE 01).

Suspensões contendo 100 esporos de cada isolado de FMA foram depositadas abaixo de 50 sementes de painço e os vasos foram mantidos no telado, em temperatura média de 28 °C, por 60 dias. Todos os vasos foram irrigados a cada dois dias; o tratamento controle recebeu

solução nutritiva de Hoagland e Arnon, modificada por Jarstfer e Sylvia (1992) adaptada por Silva et al. (2007), enquanto os demais tratamentos foram irrigados com água destilada.

Para cada isolado de FMA, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos de substrato, em cinco repetições, totalizando 80 unidades experimentais.

Tabela 3. Caracterização física e química dos substratos usados para produção de inóculo de FMA

| Características                          | Substratos (base: areia + vermiculita) |                         |                      |                       |
|------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------|
|                                          | Base                                   | + 10 % de vermicomposto | + 10 % de pó de coco | + 10 % de Tropstrato® |
| MO (g/Kg)                                | 0,72                                   | 3,10                    | 5,59                 | 7,45                  |
| P (mg/dm <sup>3</sup> )                  | 17,85                                  | 61,50                   | 30,45                | 50,78                 |
| pH (H <sub>2</sub> O – 1:2,5)            | 6,30                                   | 6,80                    | 6,90                 | 6,20                  |
| CTC (cmol/dm <sup>3</sup> )              | 6,41                                   | 7,39                    | 6,37                 | 6,71                  |
| K (cmol/dm <sup>3</sup> )                | 0,17                                   | 0,36                    | 0,38                 | 0,23                  |
| Fe (cmol/dm <sup>3</sup> )               | 46,30                                  | 31,80                   | 44,30                | 49,60                 |
| Zn (cmol/dm <sup>3</sup> )               | 1,00                                   | 3,80                    | 1,30                 | 1,60                  |
| Na (cmol/dm <sup>3</sup> )               | 0,25                                   | 0,44                    | 0,23                 | 0,33                  |
| Areia total (g/Kg)                       | 957,82                                 | 942,76                  | 963,20               | 950,80                |
| Silte (g/Kg)                             | 22,27                                  | 54,84                   | 35,31                | 42,65                 |
| Argila (g/Kg)                            | 19,91                                  | 2,41                    | 1,49                 | 6,55                  |
| Porosidade (%)                           | 41,02                                  | 40,47                   | 41,94                | 39,92                 |
| Densidade aparente (Km/dm <sup>3</sup> ) | 1,51                                   | 1,53                    | 1,44                 | 1,49                  |
| Densidade real (Km/dm <sup>3</sup> )     | 2,56                                   | 2,57                    | 2,48                 | 2,48                  |

MO= matéria orgânica; CTC= capacidade de troca de cátions.

Os esporos de FMA foram extraídos dos substratos por peneiramento úmido (GERDEMANN; NICOLSON, 1963) e centrifugação em água e sacarose (JENKINS, 1964) e quantificados em estereomicroscópio (40 x).

Os dados de esporulação foram transformados em  $\log x + 1$ , submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5 %), utilizando o programa Statistica (STATSOFT, 1997).

### 3.2 EXPERIMENTO 2 - AVALIAÇÃO DA INFECTIVIDADE DE INÓCULO MICORRÍZICO PRODUZIDO EM SUBSTRATOS COM ADUBOS ORGÂNICOS

Utilizaram-se amostras do inóculo multiplicado com 10 % de vermicomposto, logo após a produção, selecionado por apresentar maior densidade de esporos que os demais testados no experimento 1. Para avaliação da infectividade utilizaram-se dois métodos:

A) NMP = O número mais provável de propágulos infectivos (NMP) foi determinado a partir das amostras do inóculo, constituído por esporos, hifas e raízes colonizadas, foram diluídas na proporção de 1:10; 1:100; 1:1000 (v/v) com areia autoclavada (121°C, 1 h), utilizando-se milho (*Zea mays* L. cv. Assum Preto) como planta hospedeira. Após 30 dias em telado, as raízes foram lavadas, clarificadas com KOH 10 % e coradas com azul de Trypan (0,05 %) (PHILLIPS; HAYMAN 1970). Foi avaliada a presença de estruturas micorrízicas e o valor estimado pela tabela de Cochran (FELDMANN; IDCZAK 1994), com os resultados expressos em número de propágulos por cm<sup>-3</sup> substrato.

B) MIP = O método da percentagem média de infecção (MIP) (INVAM, 2010) também foi utilizado. As raízes cultivadas na proporção 1:10 (inóculo: areia desinfestada) foram utilizadas para a avaliação da infectividade dos inóculos, com a colonização determinada pela técnica de interseção de quadrantes (GIOVANNETTI; MOSSE, 1980). Os resultados foram expressos em percentagem de colonização micorrízica.

### 3.3 EXPERIMENTO 3 - EFETIVIDADE DE FMA MULTIPLICADOS EM SUBSTRATOS COM ADUBOS ORGÂNICOS

O solo utilizado neste ensaio foi coletado em área de Caatinga nativa, próxima ao Km 152, no município de Petrolina-PE, e encaminhado para análise química na Embrapa Semi-Árido e apresentava as seguintes características: 3 mg dm<sup>-3</sup> de P; 2,48 g Kg<sup>-1</sup> de matéria orgânica; 9,62 cmol dm<sup>-3</sup> de capacidade de troca de cátions e pH 4,9. Para o experimento foram utilizados potes com capacidade para 2 L.

Sementes de milho (*Zea mays* L.) foram desinfestadas com hipoclorito de sódio 0,5 % por 3 min. e lavadas com água destilada. Amostras (10 mL) de inóculos de *G. albida*, *A. longula*, *C. etunicatum* e *D. heterogama*, multiplicados em areia e vermiculita + 10 % de vermicomposto, obtidas a partir do experimento 1, foram depositadas abaixo de quatro sementes de milho. Após a germinação procedeu-se ao desbaste, ficando apenas uma planta

por pote. As plantas foram mantidas em telado e irrigadas, em dias alternados, com água filtrada.

Após 70 dias da inoculação foram avaliados: matéria fresca e seca da parte aérea e matéria fresca e seca total. A matéria seca foi determinada após a secagem do material em estufa de circulação de ar (40 °C) até peso constante, por 72 h. Também foi calculado o incremento com base na biomassa seca total, usando a fórmula  $I \% = 100 [(X - Y) / Y]$ , onde X = valor médio do tratamento inoculado e Y = valor médio do controle (WEBER et al. 2004).

Os dados de biomassa foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5 %), utilizando o programa Statistica (Statsoft, 1997).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento houve efeito dos substratos orgânicos sobre a esporulação dos FMA ( $P < 0,05$ ). A adição desses substratos favoreceu a esporulação, mas os benefícios dependeram da fonte orgânica adicionada ao substrato de cultivo (Tabela 4).

Tabela 4. Produção de esporos de FMA (GA- *Gigaspora albida*; CE- *Claroideoglossum etunicatum*; AL- *Acaulospora longula*; DH- *Dentiscutata heterogama*) em substratos à base de areia e vermiculita adicionados de substratos orgânicos, utilizando painço como hospedeiro, 60 dias após a inoculação, em telado.

| Substratos           | FMA (Esporos/20 mL) |       |         |        |
|----------------------|---------------------|-------|---------|--------|
|                      | GA                  | CE    | AL      | DH     |
| <b>Controle</b>      | 9,4 ab              | 6,4 a | 7,8 bc  | 8,2 a  |
| <b>Tropstrato®</b>   | 4,2 b               | 4,2 a | 2,8 c   | 2,2 b  |
| <b>Pó de coco</b>    | 4,6 b               | 3,0 a | 9,4 b   | 5,2 ab |
| <b>Vermicomposto</b> | 45,4 a              | 8,8 a | 196,6 a | 6,8 a  |

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (5 %).

O vermicomposto adicionado à areia + vermiculita proporcionou maior esporulação do isolado de *A. longula*, em relação aos demais substratos. Por outro lado, o Tropstrato® inibiu a esporulação do isolado de *D. heterogama*, enquanto a reprodução de *C. etunicatum* não foi alterada pelas fontes orgânicas utilizadas. Esses resultados confirmam que algumas espécies são mais beneficiadas que outras pela adubação orgânica (SILVA 2006). Oehl *et al.* (2004) relataram, em áreas de adubação orgânica, maior abundância de espécies de Acaulosporaceae e baixa frequência de ocorrência de espécies de *Gigaspora* e *Scutellospora*. Provavelmente, a esporulação do isolado de *Claroideoglossum*, que não diferiu em função dos substratos, se deve à plasticidade funcional da espécie (WEISSENHORN *et al.* 1994).

Fontes orgânicas aplicadas ao solo podem aumentar a reprodução do FMA (FRANÇA *et al.* 2007; GAUR; ADHOLEYA 2005; DOUDS Jr. *et al.* 2006) e a adição desses resíduos ao meio utilizado para a produção de inóculo de FMA aumenta a esporulação (ZAMBOLIM *et al.*, 1992), como registrado neste trabalho (Tabela 4). Por outro lado, Baby e Manibhushanrao (1996), ao testarem 12 fontes orgânicas, de origem animal e vegetal, relataram que o tipo da fonte orgânica empregada influencia na produção de esporos, pois algumas substâncias

presentes no composto orgânico podem ter efeito fitotóxico ou/e inibir o desenvolvimento dos FMA (MARTÍN et al. 2002).

A solução nutritiva usada no substrato base pode ser substituída por fontes orgânicas, e dependendo do isolado e do tipo da fonte orgânica empregada, a produção de esporos pode aumentar em relação ao uso da solução. *Acaulospora. longula*, quando mantido em substrato com vermicomposto, apresentou aumento na esporulação de 2.420 % em relação ao obtido no controle. Este aumento deve-se possivelmente à capacidade de troca catiônica e aos teores de nutrientes presentes no substrato (Tabela 3). O emprego de vermicomposto beneficia as propriedades do solo (CAVENDER et al. 2003), favorecendo a disponibilidade de nutrientes em relação a outras fontes orgânicas (SAMARANAYAKE; WIJEKOON 2010). Esses dados estão de acordo com os obtidos por Silva (2006) quando utilizou fontes orgânicas para produção de inóculo micorrízico.

A maior produção de esporos foi observada no substrato com 10 % de vermicomposto. Possivelmente, o teor de P interferiu na resposta, pois o P tem um papel importante na regulação da produção de propágulos de FMA (POSADA et al. 2008; BRUCE et al. 1994). No entanto, Douds (1994) observou que a adição de P na solução usada para irrigar diminuiu a produção de esporos. É provável que os isolados multiplicados no presente trabalho estivessem mais adaptados a condições de alta fertilização, especialmente pelo fósforo, uma vez que foram produzidos em substrato orgânico com altos níveis de P (SILVA 2006).

O efeito negativo do Tropstrato sobre a esporulação do isolado de *D. heterogama* possivelmente foi devido à composição química do substrato, pois apresentou maior teor de Mn, Ca e Fe (Tabela 3). Determinadas concentrações de Mn e Fe no substrato de cultivo pode inibir a germinação dos esporos e o crescimento micelial (MOREIRA; SIQUEIRA 2002). Cardoso et al. (2002) observaram que um isolado de *D. heterogama* foi mais tolerante do que outros às doses de Mn empregadas. O Ca pode interferir na permeabilidade das membranas e consequentemente na colonização das raízes (MOREIRA; SIQUEIRA 2002).

Além da composição, a granulometria do meio de cultivo pode influenciar a produção de propágulos; no entanto, os substratos utilizados nesse trabalho não apresentaram diferença marcante na granulometria (Tabela 3). Gaur e Adholeya (2000) observaram que em solo com partículas de 0,78 - 0,50 mm houve mais esporulação e maior peso das raízes em relação a solos com outros tamanhos de partículas. No entanto, a mistura de materiais com partículas de tamanhos diferentes também proporcionou melhor esporulação em relação às demais misturas (VERMA et al. 2008). O uso de substratos orgânicos é vantajoso porque reduz a densidade aparente e aumenta a porosidade (CARAVACA et al. 2002). A diminuição na densidade do

material também é apontada como uma das metas para produzir inoculantes para fins comerciais com baixo custo (SILVA 2006, JAYARATNE; SIRIWARDENE 2000). No presente trabalho, a adição das fontes orgânicas não promoveu diferenças acentuadas na densidade e na porosidade, portanto, as características físicas dos substratos não foram determinantes na produção de esporos.

Considerando os isolados testados, a elevada percentagem de colonização e o baixo número de propágulos infectivos do isolado de *G. albida* podem ter sido decorrentes da biologia do fungo (Tabela 5). Esporos de espécies de *Gigaspora* emitem vários tubos germinativos, estabelecendo assim várias possibilidades para a colonização do hospedeiro (MAIA et al. 1993). Por outro lado, representantes da família Gigasporaceae produzem poucos esporos (SOUZA et al. 2005) e são incapazes de colonizar a partir de fragmentos de hifas (KLIRONOMOS; HART 2002), como acontece em *Acaulospora* (HART; READER 2002). No entanto, há registro de que *G. albida* pode apresentar maior capacidade infectiva do que *A. longula* (SILVA et al. 2007).

O inóculo de *A. longula* produziu elevado número de propágulos infectivos, embora esporos dessa espécie sejam conhecidos por atravessar um período de dormência (TOMMERUP 1983); é possível que as hifas tenham atuado mais do que os esporos no processo de colonização (SILVA et al. 2007). A colonização produzida pelos FMA não foi relacionada com o número de propágulos infectivos. Resultado semelhante foi registrado por Sreenivasa e Bagyaraj (1988).

Tabela 5. Número de propágulos infectivos nos inóculos produzidos em substratos à base de areia e vermiculita adicionados de 10 % de vermicomposto e colonização micorrízica em raízes de milho, 30 dias após a inoculação

| Isolados                              | Nº de propágulos<br>(cm <sup>-3</sup> substrato) | Colonização<br>micorrízica<br>(%) |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>Acaulospora longula</i>            | >1600                                            | 23,2                              |
| <i>Gigaspora albida</i>               | 180                                              | 56,9                              |
| <i>Claroideoglomus<br/>etunicatum</i> | 350                                              | 31,8                              |
| <i>Dentiscutata heterogama</i>        | 32                                               | 19,8                              |

Alguns inoculantes comercializados em países do exterior apresentam percentagem de colonização de 19 a 54 %, avaliada pelo MIP (INVAM 2011). Considerando a percentagem de colonização produzida pelos inóculos testados observa-se que estes se encontram dentro da faixa sugerida para inoculantes comerciais, podendo assim ser recomendados para uso como biofertilizante.

Todos os inóculos produzidos, com exceção de *G. albida* (Tabela 6), incrementaram a produção de biomassa das plantas de milho. A capacidade dos FMA introduzidos serem mais eficientes pode ser devido à baixa atividade dos FMA nativos e os inoculados serem mais competitivos do que os nativos (DOUDS et al. 2007, SOUZA et al. 2010), como observado no tratamento controle. Outro fator que pode ter contribuído para os resultados obtidos nesse trabalho foi a interação do isolado fúngico com a espécie vegetal utilizada (POUYU-ROJAS et al. 2006; HART; READER 2002). É possível que o isolado de *G. albida* nas condições experimentais, tenha consumido mais Carbono do hospedeiro do que o desejável (KLIRONOMOS et al. 2000).

Tabela 6. Matéria fresca e seca total de plantas de milho (*Zea mays*) cultivadas em solo nativo da Caatinga, inoculadas com 10 mL de solo-inóculo, e mantidas em casa de vegetação por 70 dias.

| Isolados                           | Matéria fresca (g) | Matéria seca (g) | Incremento (%) |
|------------------------------------|--------------------|------------------|----------------|
| <b>Controle</b>                    | 4,47b              | 0,70bc           | -              |
| <i>Acaulospora longula</i>         | 8,62a              | 2,44ab           | 92,8           |
| <i>Gigaspora albida</i>            | 3,52b              | 1,22c            | -21,2          |
| <i>Claroideoglossum etunicatum</i> | 8,90a              | 2,67a            | 99,1           |
| <i>Dentiscutata heterogama</i>     | 7,31ab             | 1,94abc          | 63,5           |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem pelo teste de Tukey (5 %).

O inóculo de *A. longula* apresentou eficiência em promover acúmulo de biomassa em plantas de milho (Tabela 6). Em outras situações, a inoculação com isolados de *A. longula* beneficiou mudas de graviroleiras (SILVA et al. 2008), de leucena (LINS et al. 2007) e de plantas nativas usadas para revegetação (SOUZA et al. 2010).

Inóculos produzidos em substratos adicionados de adubos orgânicos podem beneficiar de forma diferenciada o hospedeiro. Douds et al. (2007) também observaram que o inóculo

produzido com fontes orgânicas promoveu melhor crescimento de mudas de batatas em relação à plantas não inoculadas em solo nativo. Contrariamente, Silva et al. (2008) observaram que o inóculo de *A. longula* produzido em solo promoveu maior taxa de crescimento em gravioleiras do que o inóculo produzido em solo + 10 % de vermicomposto, porém para o isolado de *G. albida* não foi observado o mesmo comportamento.

Gianinazzi e Vosátka (2004) consideram que um sistema de produção de inóculo de FMA tem qualidade quando, além de promover esporulação satisfatória, propicia a multiplicação de fungos com elevadas infectividade e efetividade, portanto, dos isolados testados, apenas *A. longula* apresentou tais características quando multiplicado em substrato com vermicomposto. É importante ressaltar que os valores de esporulação deste fungo foram inferiores aos registrados em outros trabalhos (SILVA et al. 2005, 2007, ZAMBOLIN et al. 1992), porém, tal FMA foi infectivo e efetivo em beneficiar o crescimento do milho.

Os resultados sugerem que o sistema de produção de inóculo utilizando areia e vermiculita + 10 % vermicomposto favorece a reprodução de *A. longula* infectivo, com o fungo beneficiando o hospedeiro.

## 5 CONCLUSÕES

- No sistema de produção de inóculo utilizando areia e vermiculita, a substituição da solução nutritiva por adubos orgânicos pode favorecer a esporulação, mas os benefícios variam de acordo com a fonte orgânica.
- O substrato à base de areia e vermiculita + 10 % de vermicomposto favorece a produção de inóculo de *C. etunicatum* infectivo e efetivo em aumentar a biomassa de plantas de milho.
- *Acaualospora. longula* tem reprodução otimizada quando multiplicado em areia e vermiculita + 10 % de vermicomposto, mostrando-se satisfatoriamente infectivo e efetivo, podendo ser aplicado logo após a produção.

## REFERÊNCIAS

ABAD, MANUEL et al. Physico-chemical and chemical properties of some coconut coir dusts for use as a peat substitute for containerised ornamental plants. **Bioresource technology**, v. 82, n. 3, p. 241-245, 2002.

ASSIS, ADRIANE MARINHO de et al. Aclimatização de bastão-do-imperador (*Etlingera elatior*) em substratos à base de coco. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 31, n. 1, p. 43-47, 2009.

BABY, U. I.; MANIBHUSHANRAO, K. Influence of organic amendments on arbuscular mycorrhizal fungi in relation to rice sheath blight disease. **Mycorrhiza**, v. 6, n. 3, p. 201-206, 1996.

BAGYARAJ, D. J.; REDDY, BJD. Application of arbuscular mycorrhizal fungi in horticulture. **Mycorrhiza: role and applications**. New Dehli: Allied Publisher, p. 237-254, 2005.

BAGO, BERTA et al. Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Plant Physiology**, v. 128, n. 1, p. 108-124, 2002.

BÉCARD, G.; PFEFFER, P. E. Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. **Protoplasma**, v. 174, n. 1-2, p. 62-68, 1993.

BEZERRA, F. C.; ROSA, M. F. Utilização do pó da casca de coco-verde como substrato para produção de mudas de alface. **Embrapa Agroindústria Tropical; Comunicado Técnico**, 2002.

BONFANTE, PAOLA et al. Establishment and functioning of arbuscular mycorrhizas. In: **Plant Relationships**. Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 259-274.

BRUCE, A.; SMITH, S. E.; TESTER, M. The development of mycorrhizal infection in cucumber: effects of P supply on root growth, formation of entry points and growth of infection units. **New Phytologist**, v. 127, n. 3, p. 507-514, 1994.

BRUNDRETT, MARK C. Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis. **Plant and Soil**, v. 320, n. 1-2, p. 37-77, 2009.

CALVENTE, R. et al. Analysing natural diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in olive tree (*Olea europaea* L.) plantations and assessment of the effectiveness of native fungal isolates as inoculants for commercial cultivars of olive plantlets. **Applied Soil Ecology**, v. 26, n. 1, p. 11-19, 2004.

CAPRONI, ANA LUCY et al. Capacidade infectiva de fungos micorrízicos arbusculares em áreas reflorestadas após mineração de bauxita no Pará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 937-945, 2003.

CARAVACA, F. et al. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reafforestation with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. **Applied Soil Ecology**, v. 20, n. 2, p. 107-118, 2002.

CARDOSO, E. J. B. N.; NAVARRO, R. B.; NOGUEIRA, M. A. Manganês e germinação de esporos de fungos micorrízicos arbusculares *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, p. 795-799, 2002.

CARRENHO, R. et al. Fungos micorrízicos arbusculares em agrossistemas brasileiros. **Micorrizas, 30 anos de pesquisas no Brasil**, Lavras, UFLA, pp. 215-249, 2010.

CAVALCANTE, Uided Maaze Tiburcio et al. Influência da densidade de fungos micorrízicos arbusculares na produção de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 643-649, 2002.

CAVENDER, Nicole D.; ATIYEH, Rola M.; KNEE, Michael. Vermicompost stimulates mycorrhizal colonization of roots of *Sorghum bicolor* at the expense of plant growth. **Pedobiologia**, v. 47, n. 1, p. 85-89, 2003.

CHAUDHARY, Vidhi; KAPOOR, Rupam; BHATNAGAR, A. K. Effectiveness of two arbuscular mycorrhizal fungi on concentrations of essential oil and artemisinin in three accessions of *Artemisia annua* L. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 174-181, 2008.

CORKIDI, Lea et al. Assessing the infectivity of commercial mycorrhizal inoculants in plant nursery conditions. **Journal of Environmental Horticulture**, v. 22, n. 3, p. 149-154, 2004.

CORREIA, DIVA et al. Uso do pó da casca de coco na formulação de substratos para formação de mudas enxertadas de cajueiro anão precoce. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, n. 3, p. 557-558, 2003.

DALPE, Yolande; MONREAL, Marcia. Arbuscular mycorrhiza inoculum to support sustainable cropping systems. **Plant Management Network**. Disponível em: <<http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/amfungi/>>. Acesso em: 16 fev. 2012.

DFPC. 2000. Anexo I. **Relação de produtos controlados pelo Exército**. Disponível em: <<http://www.dfpc.eb.mil.br>> Acesso em: 13 out. 2011.

DOUDS, David D. Relationship between hyphal and arbuscular colonization and sporulation in a mycorrhiza of *Paspalum notatum* Flugge. **New Phytologist**, v. 126, n. 2, p. 233-237, 1994.

DOUDS, David D.; NAGAHASHI, Gerald; HEPPELRY, Paul Reed. On-farm production of inoculum of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and assessment of diluents of compost for inoculum production. **Bioresource technology**, v. 101, n. 7, p. 2326-2330, 2010.

DOUDS, D. D. et al. On-farm production of AM fungus inoculum in mixtures of compost and vermiculite. **Bioresource technology**, v. 97, n. 6, p. 809-818, 2006.

DOUDS JR, David D. et al. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. **Biological agriculture & horticulture**, v. 25, n. 1, p. 67-78, 2007.

DOUDS JR, David D. et al. Inoculation of strawberries with AM fungi produced on-farm increased yield. **Biological agriculture & horticulture**, v. 26, n. 3, p. 209-219, 2008.

DUGASSA, D. G.; GRUNEWALDT-STÖCKER, G.; SCHÖNBECK, F. Growth of *Glomus intraradices* and its effect on linseed (*Linum usitatissimum* L.) in hydroponic culture. **Mycorrhiza**, v. 5, n. 4, p. 279-282, 1995.

FELDMANN, Falko; IDCZAK, Elke. Inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for use in tropical nurseries. **Techniques for Mycorrhizal Research. Methods in Microbiology**. London, Academic Press, pp. 799-833. 1994.

FORTIN, J. André; DECLERCK, Stéphane; STRULLU, Désiré-Georges. In vitro culture of mycorrhizas. In: **In Vitro Culture of Mycorrhizas**. Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 3-14.

FRANCA, Soraya C.; GOMES-DA-COSTA, Sandra M.; SILVEIRA, Adriana PD. Microbial activity and arbuscular mycorrhizal fungal diversity in conventional and organic citrus orchards. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 25, n. 2, p. 91-102, 2007.

FREITAS, Nicácio de Oliveira et al. Soil biochemistry and microbial activity in vineyards under conventional and organic management at Northeast Brazil. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 2, p. 223-229, 2011.

GAUR, Atimanav; ADHOLEYA, Alok. Effects of the particle size of soil-less substrates upon AM fungus inoculum production. **Mycorrhiza**, v. 10, n. 1, p. 43-48, 2000.

GAUR, Atimanav; ADHOLEYA, Alok. Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, n. 3, p. 214-218, 2002.

GAUR, Atimanav; ADHOLEYA, Alok. Diverse response of five ornamental plant species to mixed indigenous and single isolate arbuscular-mycorrhizal inocula in marginal soil amended with organic matter. **Journal of plant Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 707-723, 2005.

GAUR, A.; VARMA, A. Research methods in arbuscular mycorrhizal fungi. In: **Advanced Techniques in Soil Microbiology**. Springer Berlin Heidelberg, 2007. p. 377-396.

GENTILI, Francesco; JUMPPONEN, Ari. Potential and possible uses of bacterial and fungal biofertilizers. **Handbook of microbial biofertilizers**, p. 1-28, 2006.

GERDEMANN, J. W.; NICOLSON, T. Hs. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological society**, v. 46, n. 2, p. 235-244, 1963.

GIANINAZZI, Silvio; VOSÁTKA, Miroslav. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. **Canadian Journal of Botany**, v. 82, n. 8, p. 1264-1271, 2004.

GIOVANNETTI, Manuela; AVIO, Luciano; SBRANA, Cristiana. Fungal spore germination and pre-symbiotic mycelial growth—physiological and genetic aspects. In: **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. Springer Netherlands, 2010. p. 3-32.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New phytologist**, v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GIOVANNETTI, Manuela; SBRANA, Cristiana; LOGI, Cable. Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p. 703-709, 1994.

GRYNDLER, Milan et al. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 22, n. 3, p. 283-287, 2003.

GOTO, Bruno Tomio; MAIA, Leonor Costa. Glomerospores: a new denomination for the spores of Glomeromycota, a group molecularly distinct from the Zygomycota. **Mycotaxon**, 2006.

HABTE, M.; OSORIO, N. W. **Arbuscular mycorrhizas**: producing and applying arbuscular mycorrhizal inoculum. University of Hawaii, 2001.

HART, Miranda M.; READER, Richard J. Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: variation due to differences in size of mycelium. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, n. 5, p. 357-366, 2002.

HAWKINS, H.-J.; GEORGE, E. Hydroponic culture of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* with *Linum usitatissimum* L., *Sorghum bicolor* L. and *Triticum aestivum* L. **Plant and soil**, v. 196, n. 1, p. 143-149, 1997.

HUNG, Ling-Ling L.; SYLVIA, David M. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 353-357, 1988.

IJDO, Marleen; CRANENBROUCK, Sylvie; DECLERCK, Stéphane. Methods for large-scale production of AM fungi: past, present, and future. **Mycorrhiza**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2011.

INVAM. **Mean infection percentage (MIP) method**. Disponível em: <<http://invam.caf.wvu.edu/Myc-Info/Methods/assays/MIP.htm>> Acesso em: 16 de maio 2010.

INVAM. **Results of infectivity (MIP) assays of commercial Inoculants**. Disponível em <[http://invam.caf.wvu.edu/otherinfo/commercial/commercial\\_MIPs.pdf](http://invam.caf.wvu.edu/otherinfo/commercial/commercial_MIPs.pdf)> Acesso em: 29 de dez. 2011.

JAYARATNE, A. H. R. et al. Arbuscular mycorrhizal inoculum production for commercial use. **Tropical Agricultural Research and Extension**, v. 3, n. 2, p. 137-140, 2000.

JASPER, D. A.; ABBOTT, L. K.; ROBSON, A. D. The survival of infective hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in dry soil: an interaction with sporulation. **New Phytologist**, v. 124, n. 3, p. 473-479, 1993.

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

JENKINS, WR. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant disease reporter**, v. 48, n. 9, p. 692, 1964..

KLIRONOMOS, John N.; HART, Miranda M. Colonization of roots by arbuscular mycorrhizal fungi using different sources of inoculum. **Mycorrhiza**, v. 12, n. 4, p. 181-184, 2002.

KLIRONOMOS, John N. et al. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. **Ecology letters**, v. 3, n. 2, p. 137-141, 2000.

KONZEN, E. A. Estabilização de resíduos orgânicos em processos de compostagem e vermicompostagem. **EMBRAPA-CNPMS. Comunicado técnico**, 1999.

LACERDA, Maria Regina Beltrão et al. Physical and chemical characteristics of coir dust and sisal residue for seedling production of sabiá (*Mimosa casalpinaefolia* Benth). **Revista Árvore**, v. 30, n. 2, p. 163-170, 2006.

LAMBAIS, Marcio Rodrigues. Unraveling the signaling and signal transduction mechanisms controlling arbuscular mycorrhiza development. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 4, p. 405-413, 2006.

LAMIM, Soraida Sozzi Miguel et al. Caracterização química e física de vermicomposto e avaliação de sua capacidade em adsorver cobre e zinco. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 278-283, 1998.

LINS, Cláudia Elizabete de Lima et al. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. em solos de Caatinga sob impacto de mineração de cobre. **Revista Árvore**, v. 31, pp. 355-363, 2007.

LIU, Wen-Ke; YANG, Qi-Chang. Integration of mycorrhization and photoautotrophic micropropagation in vitro: feasibility analysis for mass production of mycorrhizal transplants and inoculants of arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 95, n. 2, p. 131-139, 2008.

MAIA, Leonor C.; KIMBROUGH, James W.; BENNY, Gerald. Ultrastructural studies of the spore wall of *Gigaspora albida* (Glomales). **Mycologia**, p. 883-889, 1993.

MAIA, L. C.; SILVA, B. S.; GOTO, B. T. Estrutura, ultraestrutura e germinação de glomerosporos. **Micorrizas, 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras, UFLA, v. 30, p. 75-116, 2010.

MAIA, L.C.; SILVEIRA, N.S.S.; CAVALCANTE, U.M.T. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and root pathogens. **Handbook of microbial biofertilizers**, New York, Food Products Press, pp. 325-351. 2006.

MEHROTRA, V. S. **Mycorrhiza: Role and Applications**, New Dehli, Allied Publishers Pvt. Limited, pp. 1-65, 2005.

MARTIN, J. et al. Arbuscular mycorrhizal colonization and growth of soybean (*Glycine max*) and lettuce (*Lactuca sativa*) and phytotoxic effects of olive mill residues. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 11, p. 1769-1775, 2002.

MERGULHÃO, A. C. E. S. et al. Glomalina: a glicoproteína dos fungos micorrízicos arbusculares. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**, p. 333-347, 2008.

Miranda, J. C. C.; Miranda, L. N. Micorriza arbuscular. **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina, Embrapa, pp.69-123, 1997.

MOREIRA, Fátima M. de S.; SIQUEIRA, José O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora UFLA, Lavras, 2002.

MOHAMMAD, A.; KHAN, A. G.; KUEK, C. Improved aeroponic culture of inocula of arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 9, n. 6, p. 337-339, 2000.

MORTON, JOSEPH B. et al. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. **Mycotaxon**, v. 37, p. 471-491, 1990.

NOGUERA, P. et al. Coconut coir waste, a new and viable ecologically-friendly peat substitute. **Acta Horticulturae**, Bélgica, v. 517, p. 279-286, 2000.

OLIVEIRA, Alexandre Bosco de; HERNANDEZ, Fernando Felipe Ferreyra; DE ASSIS JÚNIOR, Raimundo Nonato. Pó de coco verde, uma alternativa de substrato na produção de mudas de berinjela. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 1, p. 39-44, 2008..

OEHL, Fritz et al. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. **Oecologia**, v. 138, n. 4, p. 574-583, 2004.

OEHL, Fritz et al. Advances in Glomeromycota taxonomy and classification. **IMA fungus**, v. 2, n. 2, p. 191-199, 2011.

PAIVA, Laura M. et al. *Glomus clarum* Nicol. & Schenck and *G. etunicatum* Becker & Gerd.: cultivated in soil and aeroponic culture. **Brazilian Journal of Botany**, v. 26, n. 2, p. 257-262, 2003.

PETERSON, R. Larry; MASSICOTTE, Hugues B.; MELVILLE, Lewis H. **Mycorrhizas: anatomy and cell biology**. NRC Research Press, 2004.

PLENCHETTE, C.; PERRIN, R.; DUVERT, P. The concept of soil infectivity and a method for its determination as applied to endomycorrhizas. **Canadian Journal of Botany**, v. 67, n. 1, p. 112-115, 1989.

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

POSADA, R. H. et al. Effect of physical, chemical and environmental characteristics on arbuscular mycorrhizal fungi in *Brachiaria decumbens* (Stapf) pastures. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 1, p. 132-140, 2008.

POUYU-ROJAS, Enrique; SIQUEIRA, José Oswaldo; SANTOS, José Geraldo Donizetti. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 413-424. 2006.

POZO, María J. et al. Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defence mechanisms. In: **Arbuscular mycorrhizas: physiology and function**. Springer Netherlands, 2010. p.193-207.

PURIN, S.; KLAUBERG FILHO, O. Glomalina: Nova abordagem para entendermos a biologia dos fungos micorrízicos arbusculares. **Micorrizas: 30 anos de pesquisas no Brasil**. Lavras, UFLA, 2010, p.503-524.

REDON, Paul-Olivier; BÉGUIRISTAIN, Thierry; LEYVAL, Corinne. Influence of *Glomus intraradices* on Cd partitioning in a pot experiment with *Medicago truncatula* in four contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 2710-2712, 2008.

RICCI, M. Manual de vermicompostagem. **EMBRAPA-CPAF Rondonia. Documentos**, 1996.

RILLIG, Matthias C. Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 84, n. 4, p. 355-363, 2004.

ROSA, M. de F. et al. Processo agroindustrial: obtenção de pó de casca de coco verde. **Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico**, 2001.

SAGGIN-JUNIOR, Orivaldo Jose; DE SILVA, E. M. R. Production of seedlings inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and their performance after outplanting. **Handbook of microbial biofertilizers**, p. 353-394, 2006.,

SAMARANAYAKE, J. W. K.; WIJEKOON, S. J. Effect of selected earthworms on soil fertility, plant growth and vermicomposting. **Tropical Agricultural Research and Extension**, v. 13, n. 2, 2011.

SANTOS, Anselmo Lúcio et al. Estabelecimento e capacidade infectiva de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum* em solo sob erosão!. **Acta bot. bras**, v. 14, n. 2, p. 127-139. 2000.

SCHUBSSLER, Arthur; SCHWARZOTT, Daniel; WALKER, Christopher. A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution\*\* Dedicated to Manfred Kluge (Technische Universität Darmstadt) on the occasion of his retirement. **Mycological research**, v. 105, n. 12, p. 1413-1421, 2001.

SCHUBSSLER, Arthur; WOLF, Elke. Geosiphon pyriformis—a glomeromycotan soil fungus forming endosymbiosis with cyanobacteria. In: **In vitro culture of mycorrhizas**. Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 271-289.

SIEVERDING, E.; FRIEDRICHSEN, J.; SUDEN, W. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. **Sonderpublikation der GTZ (Germany)**, 1991.

SILVA, Danielle Karla Alves et al. Uso de vermicomposto favorece o crescimento de mudas de gravioleira (*Annona muricata* L. 'Morada') associadas a fungos micorrízicos arbusculares. **Acta bot. bras.**, v. 22, n. 3, p. 863-869, 2008.

SILVA, Fábio Sérgio B. et al. Sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi using Tris-CHl buffer in addition to nutrient solutions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 327-332, 2005.

SILVA, Fábio Sérgio Barbosa da; YANO-MELO, Adriana Mayumi; MAIA, Leonor Costa. Production and infectivity of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi multiplied in a substrate supplemented with Tris-HCl buffer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 752-755, 2007.

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

SILVA, MA da et al. Crescimento de mudas de maracujazeiro-doce (*Passiflora alata* Curtis) associadas a fungos micorrízicos arbusculares (Glomeromycota). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 981-985, 2004.

SILVA, Maryluce Albuquerque da et al. Fungos micorrízicos arbusculares e vermicomposto na aclimação de *Alpinia purpurata* (Viell.) Schum e *Zingiber spectabile* Griff. (Zingiberaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, p. 249-256, 2006.

SINGH, Rakshapal et al. Technology for efficient and successful delivery of vermicompost colonized bioinoculants in *Pogostemon cablin* (patchouli) Benth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Online 28 June 2011

SIQUEIRA, José O.; SAGGIN-JÚNIOR, Orivaldo J. Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. **Mycorrhiza**, v. 11, n. 5, p. 245-255, 2001.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3<sup>rd</sup> edition. London: Academic Press, 803p. 2008.

SOUZA, Ednaldo Bezerra de et al. Germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. em função de diferentes temperaturas e substratos. **Revista Árvore**, v. 31, p. 437-443, 2007.

SOUZA, Francisco Adriano et al. Life history strategies in Gigasporaceae: insight from monoxenic culture. In: **In vitro culture of Mycorrhizas**. Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 73-91.

SOUZA, LM de et al. Influência da aplicação de diferentes vermicompostos na biomassa microbiana do solo após cultivo de alface. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 4, p. 429-434, 2006a.

SOUZA, Renata Gomes et al. The role of arbuscular mycorrhizal fungi and cattle manure in the establishment of *Tocoyena selloana* Schum. in mined dune areas. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 3, p. 237-242, 2010.

SOUZA, Vênia C. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 612-618, 2006b.

SREENIVASA, M. N.; BAGYARAJ, D. J. Selection of a suitable substrate for mass multiplication of *Glomus fasciculatum*. **Plant and Soil**, v. 109, n. 1, p. 125-127, 1988.

STATSOFT, Inc. **Statistica for Windows** (Computer Program Manual). Tulsa, USA. 1997

STEINBERG, Peter D.; RILLIG, Matthias C. Differential decomposition of arbuscular mycorrhizal fungal hyphae and glomalin. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 191-194, 2003.

TANU, P. A.; ADHOLEYA, A. Potential of Arbuscular mycorrhizae in organic farming system. **Handbook of microbial biofertilizers. Food Products Press, Binghamton**, p. 223-239, 2006.

TOMMERUP, I. C. Spore dormancy in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 81, n. 1, p. 37-45, 1983.

TRÉPANIER, Martin et al. Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 9, p. 5341-5347, 2005.

TRISTÃO, F.S.M.; ANDRADE, S.A.L.; SILVEIRA, A.P.D. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de cafeeiro, em substratos orgânicos comerciais. **Bragantia**, v. 65, p. 649-658, 2006.

TURNAU, Katarzyna; RYSZKA, Przemysław; WOJTCZAK, Grzegorz. Metal tolerant mycorrhizal plants: a review from the perspective on industrial waste in temperate region. In: **Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function**. Springer Netherlands, 2010. p. 257-276.

VENTURINI, Evandro et al. Uso de vermicomposto na cultura do feijoeiro. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2003.

VERMA, Nisha; CHATURVEDI, Shruti; SHARMA, A. K. Mass multiplication of AMF using soilless substrates. **Mycorrhiza News**, v. 20, p. 11-15, 2008.

VERMA, R. K.; ARYA, I. D. Effect of arbuscular mycorrhizal fungal isolates and organic manure on growth and mycorrhization of micropropagated *Dendrocalamus asper* plantlets and on spore production in their rhizosphere. **Mycorrhiza**, v. 8, n. 2, p. 113-116, 1998.

VOETS, Liesbeth et al. Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under in vitro conditions. **Mycorrhiza**, v. 19, n. 5, p. 347-356, 2009.

VOSÁTKA, Miroslav; ALBRECHTOVÁ, Jana; PATTEN, Robert. The international market development for mycorrhizal technology. **Mycorrhiza**. 3ed. Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 419-438.

WANG, Yuan Yuan et al. Diversity and infectivity of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soils of the Sichuan Province of mainland China. **Mycorrhiza**, v. 18, n. 2, p. 59-68, 2008.

WEBER, Olmar Baller et al. Inoculação de fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada em mudas de cajueiro-anão-precoce. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 477-483, 2004.

WEISSENHORN, I. et al. Differential tolerance to Cd and Zn of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal spores isolated from heavy metal-polluted and unpolluted soils. **Plant and Soil**, v. 167, n. 2, p. 189-196, 1994.

XU, Pengliang et al. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* can enhance arsenic tolerance in *Medicago truncatula* by increasing plant phosphorus status and restricting arsenate uptake. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 215-220, 2008.

ZAMBOLIM, L.; REIS, M. A.; COSTA, L. M. Substratos para a multiplicação de inóculo do fungo micorrízico vesículo-arbuscular *Glomus etunicatum*. **Fitopatologia Brasileira** v. 17, n. 1, p. 28-3, 1992.