QUANTIFICAÇÃO DO MICÉLIO EXTRAMATRICAL DE *Glomus etunicatum*
E DA SUA ATIVIDADE, EM SIMBIOSE COM MILHO

JULIO ALVES CARDOSO FILHO
engenheiro agrônomo

Orientadora: Profª Drª Elke J.B.N. Cardoso

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Microbiologia Agrí-
cola

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 1994

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

Cardoso Filho, Julio Alves
C268q Quantificação do micélio extramatricial de *Glomus*
etunicatum e da sua atividade, em simbiose com milho.
Piracicaba, 1994.
121p.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Micorriza 2. Milho - Micorriza 3. Simbiose I. Es-
cola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piraci-
caba

CDD 633.15
589.2

QUANTIFICAÇÃO DO MICÉLIO EXTRAMATRICAL DE *Glomus etunicatum*
E DA SUA ATIVIDADE, EM SIMBIOSE COM MILHO

JULIO ALVES CARDOSO FILHO

APROVADA EM: 03 DE MARÇO DE 1994

COMISSÃO JULGADORA:

Profª Drª ELKE J.B.N. CARDOSO

ESALQ/USP

Prof. Dr. MÁRCIO R. LAMBAIS

ESALQ/USP

Drª ADRIANA P. D. Da SILVEIRA

IAC

Profª Drª Elke J.B.N. Cardoso
ORIENTADORA

À Tânia, pelo amor, estímulo e
compreensão.

Ao nosso filho Yuri.

Ao meu irmão Edvaldo e à minha
cunhada Irene pelas oportuni-
dades criadas.

Ao meu pai Júlio Cardoso e à
minha mãe Eunice Cardoso
(in memoriam).

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

- À amiga Profª Drª Elke J.B.N. Cardoso, por sua orientação, valiosas sugestões, grande amizade e dedicação;
- À Universidade Federal de Alagoas - UFAL, Centro de Ciência Agrárias - CECA, Deptº de Agronomia, pela possibilidade de realizar o mestrado;
- Ao amigo Prof. Dr. Paulo Vanderlei Ferreira, pelo estímulo, apoio e orientação durante a graduação;
- Aos amigos Professores Jakes Halan, Fátima Chaves e Aloísio Martins, pelo estímulo e apoio;
- Ao amigo Pesquisador da EMBRAPA - CNPDA Dr. Itamar Soares Melo, pelo estímulo e cessão do "eye piece whipple disc";
- Ao Prof. Dr. Márcio Lambais, pelas sugestões;
- Ao Prof. Dr. Tasso L. Krugner, pelo apoio material;
- Ao Prof. Dr. David M. Sylvia, pela orientação no tocante a técnica de NEWMAN;
- Aos amigos de sempre Ivanildo e Sarah, Geraldo e Suzana e Rosana Faria pelo carinho, estímulo e grande amizade;
- Aos técnicos de laboratório Fernando Baldesin e Denise L. C. Mescolotti, pela grande colaboração e amizade durante todo o decorrer deste trabalho;
- Aos colegas do Curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pela amizade;
- As amigas e funcionárias da biblioteca central Kátia Ferraz e Eliane Sabino, pelo auxílio na revisão bibliográfica;
- Ao PICD/CAPES/UFAL, pela cessão da bolsa de estudos.

INDICE

	Página
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Aspéctos gerais das associações micorrízicas vesículo-arbusculares (MVA)	4
2.2. Anatomia e morfologia das MVA	13
2.2.1. A fase intramatrical	13
2.2.1.1. Os arbúsculos	14
2.2.1.2. As vesículas	16
2.2.2. A fase extramatrical	16
2.2.2.1. Distribuição da fase extramatrical ...	17
a) Morfologia e desenvolvimento	17
b) Produção de hifas externas no solo	19
c) Fatores que afetam a fase extramatrical ..	19

2.2.2.2. Funções da fase extramatrical	21
a) Absorção e translocação de nutrientes e água	21
b) Transferência de nutrientes entre plantas	23
c) Formação de agregados no solo	23
d) Utilização como fonte de inóculo	24
2.3. Métodos de quantificação	25
2.3.1. Métodos indiretos para a quantificação de hifas totais	25
a) Agregação do solo	25
c) Determinação da quitina	26
2.3.2. Métodos diretos para hifas totais	28
a) Método da membrana de filtração	28
b) Métodos de imunofluorescência	29
2.3.3. Métodos para a detecção de hifas ativas	31
2.3.4. Limitações dos métodos atuais de quantificação e estratégias para a sua incrementação	33

3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. Descrição dos experimentos 1 e 2	34
3.1.1 Delineamento experimental e análise estatística	34
3.1.2. Planta hospedeira	35
3.1.3. Preparo do substrato, calagem, adubação e irrigação	36
3.1.4. Endófito	39
3.1.5. Semeadura e inoculação	39
3.2. Experimento 1	40
Etapa 1 - Extração do micélio do solo	41
sub-etapa a)	41
a1 - Método descrito por SCHUBERT et al. (1987), modificado	41
a2 - Método descrito por SYLVIA (1988), modificado	42
a3 - Método idealizado no laboratório de Microbiologia do Depto. de Ciência do Solo - ESALQ/USP	43
sub-etapa b)	43
sub-etapa c)	43
sub-etapa d)	44
sub-etapa e)	44

Etapa 2 - Membrana utilizada e ajuste do dispositivo utilizado para a contagem das hifas	45
Etapa 3 - Quantificação do micélio externo	47
3.3. Experimento 2 - Quantificação da atividade do micélio externo de <i>Glomus etunicatum</i> no solo e avaliação de parâmetros de crescimento da planta	50
3.3.1. Coloração de hifas para a determinação da quantidade de micélio externo ativo (MA)	50
3.3.2. Determinação do comprimento e atividade das hifas	52
3.3.3. Porcentagem de colonização radicular interna	52
3.3.4. Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA)	52
3.1.7.3. Absorção de nutrientes na parte aérea da planta	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Experimento 1	54
Extração do micélio do solo	54
Quantificação do micélio externo	58
4.2. Experimento 2	59

4.2.1. Coloração de hifas para a determinação da quantidade de micélio externo ativo (MA)	59
4.2.2. Determinação do comprimento das hifas ...	61
4.2.3. Porcentagem de colonização radicular	66
4.2.4. Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA)	69
4.2.5. Absorção de nutrientes na parte da planta	71
5. CONCLUSÕES	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	83
7. APÊNDICE	120

LISTAS DE TABELAS

Tabela nº	página
TABELA 1 - Dados referentes à análise química do substrato utilizado nos experimentos 1 e 2	38
TABELA 2 - Composição granulométrica do substrato utilizado nos experimentos 1 e 2	38
TABELA 3 - Comprimento total de hifas (MT) e comprimento de hifas ativas (MA) em função de doses de P (mg/kg de solo), em rizosfera de milho inoculado (CMVA) e não (SMVA) inoculado com <i>Glomus etunicatum</i> e três épocas de colheita (DAP, dias) (médias de 4 repetições)	62
TABELA 4 - Valores calculados de comprimento de micélio externo total (MT) e ativo (MA) de <i>Glomus etunicatum</i> e percentagem de micélio ativo (HA) em relação ao micélio total em plantas de milho em diferentes épocas de colheita (DAP, dias) em quatro doses de P (mg de P/kg de solo).....	63

TABELA 5 - Coeficiente de correlação linear entre a percentagem de comprimento de raiz colonizada e o micélio externo total (MT) e ativo (MA) de *Glomus etunicatum* em três épocas de colheita (DAP, dias)..... 63

TABELA 6 - Percentagem de comprimento de raiz colonizada de *Zea mays* var. Piranão inoculado com *Glomus etunicatum*, com adição de P (mg/kg de solo) e em diferentes épocas de plantio (DAP, dias) 67

TABELA 7 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) de *Zea mays*, em diferentes doses de P (mg/kg de solo), inoculado (CMVA) e não inoculado (SMVA) com *Glomus etunicatum* em diferentes épocas de colheita (DAP, dias)..... 70

TABELA 8 - Variação percentual média (MS%) da produção de matéria seca da parte aérea em *Zea mays* var. Piranão, inoculado com *Glomus etunicatum* em relação ao controle não inoculado de cada tratamento em função de épocas de colheita (DAP,dias) e doses de P (mg/kg de solo)..... 70

TABELA 9 - Concentrações absorvidas
de nutrientes por *Zea mays* var. Piranão,
inoculado (CMVA) e não inoculado (SMVA)
por *Glomus etunicatum* , doses de P (mg/kg)
e em diferentes épocas de colheita
(DAP, dias) (os valores são médias
de quatro repetições) 73

TABELA 9 - Quantidades totais absorvidas
de nutrientes por *Zea mays* var. Piranão,
inoculado (CMVA) e não inoculado (SMVA)
por *Glomus etunicatum* , doses de P (mg/kg) e
em diferentes épocas de colheita (DAP, dias) (os
valores são médias de quatro repetições)..... 76

TABELA 10 - Índice de eficiência (EI) na
utilização de nutrientes pelo milho
micorrizado (CMVA) e não micorrizado
(SMVA) por *Glomus etunicatum* com quatro
níveis de P (DP, ppm) e três épocas de
colheita (DAP, dias)..... 79

TABELA 11 - Coeficientes de correlação entre os teores e quantidades totais de P absorvido pela parte aérea de milho micorrizado e o micélio externo total (MT) e ativo (MA) de <i>Glomus etunicatum</i> , em diferentes doses de P (mk/kg de solo) e em diferentes épocas de colheita (DAP, dias)	80
---	----

APÊNDICE 1 e 2 - Valores F obtidos na análise de variância da concentração e quantidades totais de nutrientes absorvidos por <i>Zea mays</i>	119
---	-----

QUANTIFICAÇÃO DO MICÉLIO EXTRAMATRICAL DE *Glomus*
etunicatum E DA SUA ATIVIDADE, EM SIMBIOSE COM
MILHO .

Candidado: JULIO ALVES CARDOSO FILHO

Orientadora: Elke J.B.N. Cardoso

RESUMO

Com o objetivo de desenvolver um método para a quantificação das hifas externas e da sua atividade aos 30, 60 e 90 dias após o plantio (DAP), foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação utilizando-se (*Zea mays* L.), inoculado e não inoculado com *Glomus etunicatum* e doses crescentes de fósforo (0, 25, 50 e 75 mg de P/kg de solo).

O micélio extramatricial foi extraído do solo através do método da membrana de filtração e quantificado pela técnica da grade de interseção.

A proporção de hifas ativas foi determinada pelo método de coloração enzimática por iodonitrotetrazólio (INT). Tanto a técnica de extração quanto o método de coloração por INT não apresentaram resultados promissores quando utilizados em solos argilosos.

As limitações da quantificação da atividade e do método de extração de hifas externas de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares através da técnica da membrana de filtração e do método de coloração enzimático por INT são discutidas.

Observou-se que aos 30 e 60 DAP houve um aumento do micélio externo total e uma diminuição na sua atividade com a elevação das doses de P aplicadas ao solo.

Avaliou-se, também, o crescimento e a absorção de nutrientes de plantas de milho na presença e ausência da micorriza e com doses crescentes de P, correlacionando tais resultados com aqueles de micélio extramatrical, em três estádios da cultura.

QUANTIFICATION OF THE EXTRARADICAL MYCELIUM OF
Glomus etunicatum AND ITS ACTIVITY ON MAIZE PLANTS

Candidate: Julio Alves Cardoso Filho

Adviser: Elke J.B.N. Cardoso

SUMMARY

Two experiments were conducted under greenhouse conditions with the objective of developing a method of quantification of the extraradical mycelium of *Glomus etunicatum* and its activity on maize, under different levels of P fertilization at 30, 60 and 90 days after sowing.

The external mycelium was extracted from the soil by the filter-membrane method and was quantified by the grid-line intersect technique. Active mycelium was quantified by the enzymatic INT staining method. Limitations and advantages of different extraction methods as well as of the staining technique are discussed.

The length of the total external mycelium increased with increasing P levels whereas its activity decreased. Although not absolutely conclusive, our results suggest that there may be a correlation between growth depression of mycorrhizal plants at high P levels and the extension of the extraradical mycelium. There was also growth response of maize plants to mycorrhizal inoculation and an increase in the concentration of the majority of nutrients in the shoots.

1 - INTRODUÇÃO

A colonização radicular por fungos micorrízicos vesículo-arbusculares (MVA) apresenta duas fases, uma interna (intramatrical) e uma externa (extramatrical).

A colonização interna tem sido estudada em detalhes, e é assunto de inúmeras revisões, dentre as quais SMITH & WALKER, 1981, SANDERS & SHEIKH, 1983, e BONFANTE-FASOLO, 1984, ao passo que a colonização externa, de acordo com SYLVIA (1990), não recebeu, até o presente momento, estudos que reflitam a sua importância. Entretanto, há evidências de que o efeito da colonização micorrízica vesículo-arbuscular no crescimento vegetal não pode ser apenas explicado pela quantificação da colonização interna (SANDERS et al., 1977; BETHLENFALVAY et al., 1982; GRAHAM et al., 1982).

Deste modo, as relações entre o desenvolvimento da fase interna e da fase externa (ABBOTT et al., 1985; BETHLENFALVAY et al., 1982; GRAHAM et al., 1982) e seus efeitos no crescimento da planta hospedeira (ABBOTT et

al., 1984; BETHLENFALVAY et al., 1982; SYLVIA, 1990) estão apenas no campo especulativo.

As hifas externas atuam como uma extensão do sistema radicular da planta hospedeira, aumentando a absorção e a translocação de nutrientes, principalmente P, e ou água (TINKER, 1975; BIELISKI, 1976; RHODES & GERDEMANN, 1980). Este processo requer um sistema de hifas ativo, (HARLEY & SMITH, 1983). Portanto, o conhecimento da proporção de hifas externas ativas poderá auxiliar o entendimento da translocação de nutrientes por fungos MVA.

Recentemente, dois métodos de coloração foram utilizados para se estimar a viabilidade das hifas externas de fungos MVA (SCHUBERT et al., 1987; SYLVIA, 1988). Estes métodos demonstraram que apenas uma fração da massa fúngica total está fisiologicamente ativa no solo e nas raízes da planta hospedeira.

Este trabalho teve como objetivo desenvolver uma técnica para quantificar o comprimento e a atividade das hifas externas de *Glomus etunicatum* (Becker & Gerdemann) em *Zea mays* L. var. Piranão no estudo da variação do comprimento do micélio viável e total, em função do tempo, após a colonização da raiz da planta hospedeira pelo endossimbionte.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais das associações micorrízicas vesículo-arbusculares (MVA)

Partiu de Frank, em 1886, a atribuição do termo "micorrizas" para descrever as associações simbióticas mutualísticas entre raízes de plantas e certos fungos do solo (POWELL & BAGYARAJ, 1984). Estas associações aumentam a capacidade das plantas absorverem fósforo (P), vários outros nutrientes e água. Por sua vez, a planta hospedeira supre o fungo com carboidratos essenciais ao seu crescimento (GERDEMANN, 1968; HAYMAN, 1982; HARLEY & SMITH, 1983). Dentre os diversos tipos de micorrizas, as micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) constituem a relação planta-fungo mais comumente encontrada na natureza. Deste modo, devemos considerar a grande maioria dos vegetais como organismos cujos órgãos de absorção de água e de nutrientes são constituídos pelas estruturas do fungo e pelas raízes (GERDEMANN, 1968).

Apesar da ocorrência generalizada das MVA nas espécies vegetais superiores, variações intraespecíficas na colonização micorrízica, sempre relacionadas às variações genotípicas da planta hospedeira, foram recentemente evidenciadas experimentalmente, com o descobrimento de mutantes definidos como *myc*⁻ em *Pisum sativum* L. e *Vicia faba* L., que conferem resistência genética à formação de MVA nestas espécies (DUC et al., 1989).

A dependência micorrízica pode ser definida como facultativa ou obrigatória, dependendo da vantagem que o endófito confere a este hospedeiro com relação ao suprimento mineral (JANOS, 1980). O custo da simbiose é ditado pela transferência de carboidratos da planta para o fungo (DOUDS et al., 1988). É provável que este fluxo de carboidratos seja regulado pela planta hospedeira e dependente da espécie fúngica MVA. Cerca de 17% dos carboidratos que a planta transloca para a raiz, são utilizados pelo fungo para o desenvolvimento, atividade funcional e produção da biomassa fúngica (SIEVERDING, 1991).

As famílias de plantas que não formam MVA incluem Pináceas, Betuláceas, Orquidáceas, Fumariáceas, Commelináceas, Urticáceas e Ericáceas. Famílias que raramente formam micorrizas MVA incluem Crucíferas, Quenopodiáceas, Poligonáceas e Ciperáceas. Famílias que formam associações com ectomicorrizas e MVA incluem Juglandáceas,

Tiliáceas, Mirtáceas, Salicáceas, Fagáceas e Caesalpináceas (ZAMBOLIN & SIQUEIRA, 1985; SIQUEIRA et al., 1991).

Atualmente, de acordo com MORTON & BENNY (1990a) e MORTON (1990b), os fungos MVA estão agrupados em cerca de 150 espécies, pertencentes às famílias *Glomaceae*, *Acaulosporaceae* e *Gigasporaceae* da ordem *Glomales* dos Zigomicetos.

Muitas das espécies desta família formam MVA com as raízes de quase todas as culturas de importância agrícola (LOPES et al., 1983). As MVA, devido aos efeitos benéficos no crescimento vegetal, nutrição e tolerância a estresses bióticos e abióticos apresentam grande potencial agrícola. Entretanto, a incapacidade de se cultivar fungos MVA em cultura axênica por longo tempo (MOSSE, 1959; HEPPER, 1987) o maior obstáculo para o desenvolvimento de tecnologia para a comercialização de inóculos destes fungos. Muito embora esporos da maioria dos fungos MVA possam germinar *in vitro*, o alongamento das hifas fica limitado a poucos milímetros independente dos vários meios de cultura (MOSSE, 1959; HEPPER & SMITH, 1976; HEPPER, 1979). Segundo HEPPER (1987) e BURGRAAF & BERINGER (1989) este fato se deve provavelmente ao esgotamento das reservas do esporo.

Basicamente, as micorrizas são formadas por três componentes: 1) as raízes do hospedeiro, 2) as estru-

turas do fungo no interior das raízes e 3) as hifas externas que se estendem através da rizosfera. Por intermédio de modificações nas hifas, originam-se os arbúsculos, vesículas e esporos (LOPES et al., 1983). Os arbúsculos, estruturas intracelulares ramificadas que ocupam grande parte do volume das células corticais (COX et al., 1975), são consideradas como sítios de troca entre o fungo e a planta hospedeira (HARLEY & SMITH, 1983). Tanto as hifas externas, como as internas podem dar origem às vesículas (LOPES et al., 1983). Estas, devido à sua organização citológica e ao seu elevado número em raízes senescentes ou mortas, são provavelmente de reserva (BONFANTE-FASOLO, 1984).

Os principais eventos no estabelecimento das MVA são: a germinação dos esporos, o crescimento das hifas, aderência, formação do apressório e penetração radicular (BÉCARD & FORTIN, 1988). Os esporos da maioria das espécies de fungos MVA não necessitam de fatores da planta hospedeira para a germinação e início do crescimento das hifas (SIQUEIRA et al., 1985), muito embora o crescimento contínuo das hifas, a diferenciação e a penetração no hospedeiro sejam provavelmente afetados por sinais enviados pela planta (BONFANTE-FASOLO, 1988; BÉCARD & PICHE, 1989).

Apesar dos esporos de fungos MVA conterem os fatores biológicos requeridos para a germinação (SIQUEIRA et al., 1985), o crescimento contínuo e esporulação não

ocorrem em micélio assimbiótico, refletindo o biotrofismo obrigatório destes fungos (SIQUEIRA, 1991).

A possibilidade de determinados fatores da planta hospedeira atuarem como sinais moleculares para fungos MVA, como ocorre com outros sistemas simbióticos (LYNN & CHANG, 1990), induzindo o crescimento, diferenciação do fungo e penetração nas células hospedeiras, deu origem a formação de novas hipóteses (SIQUEIRA, 1991), entre as quais a hipótese proposta por BÉCARD & PICHÉ (1989) da existência de dois mecanismos distintos para o estímulo das raízes ao crescimento micelial, um nutricional e outro indutivo.

As MVA e alguns sistemas fitopatogênicos apresentam certas similaridades como a formação de apresório (BÉCARD & FORTIN, 1988; GARRIOCK et al., 1989) e algumas reações da planta hospedeira à invasão do fungo, como o aumento do teor de quitinase, peroxidase, espessamento da parede celular das células hospedeiras (BONFANTE-FASOLO, 1988). A presença de proteínas específicas denominadas de "micorrizinas" (GIANINAZZI-PEARSON, 1991), (em analogia às nodulinas encontradas na simbiose rizóbio-leguminosas) denotam a possibilidade da existência de uma integração bioquímica entre a planta hospedeira e o fungo e podem confirmar a presença de mecanismos de reconhecimento (SIQUEIRA, 1991). Segundo DIXON & LAMB

(1990) e HALVERSON & STACEY (1986), a quitina ou N-acetil glicosamina e as fitoalexinas podem atuar como sinais moleculares durante o início da micorrização. Ainda mais, os flavonóides presentes nos exsudatos radiculares também podem atuar como indutores da expressão de genes que controlam a infectividade (agressividade ou virulência) que, mantidos sob o controle da planta hospedeira, atuariam como estratégia de sobrevivência da planta (SIQUEIRA, 1991).

Do ponto de vista da associação, esta se inicia a partir de propágulos do fungo no solo, que podem ser esporos, células auxiliares e hifas crescendo de raízes colonizadas. A partir dos propágulos, formam-se hifas infectivas que, estimuladas pelas condições físico-químicas da rizosfera e pelos componentes orgânicos dos exsudatos crescem abundantemente, aumentando as chances de contato entre o fungo e a superfície radicular. Essas hifas, ao encontrarem as raízes, aderem à sua superfície e formam um apressório através do qual ganham o interior da planta hospedeira, penetrando nas células da epiderme na zona de diferenciação e alongamento, formando uma "unidade de infecção". Deste modo, as hifas se espalham pelo córtex intercelularmente, através da lamela média, tornando-se posteriormente intracelulares, às vezes enoveladas, nas camadas mais externas do córtex, diferenciando-se em arbúsculos, nas camadas mais internas, e finalmente, em vesí-

culas e esporos (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

Um grande número de relatos mostra os efeitos benéficos das MVA no crescimento e nutrição de plantas, especialmente em condições de baixa disponibilidade de P no solo (GERDEMANN, 1968; HAYMAN, 1982; LOPES et al., 1983; MOSSE, 1973; ZAMBOLIN & PINTO, 1985; CARDOSO et al., 1986; SIQUEIRA & PAULA, 1986; SILVEIRA & CARDOSO, 1987; ANTUNES & CARDOSO, 1991). Este é o caso da maioria dos solos tropicais, que são caracterizados pela baixa fertilidade e alta acidez (BIELISKY, 1973).

Plantas colonizadas por fungos MVA podem apresentar diferenças nas concentrações dos nutrientes, quando comparadas com plantas não inoculadas, segundo MOSSE (1973), GRAY & GERDEMANN (1973), LOPES et al. (1983), CARDOSO (1984 e 1985), LAMBAIS (1987) e GRAHAM & SYVERTSEN (1989).

Estudos envolvendo a cinética da absorção de P demonstraram que as MVA afetam tanto os valores de Km (diminuindo) quanto de Vmax (aumentado), de acordo com FAQUIN et al. (1987) e SILVEIRA et al. (1987). Segundo estes autores, isto aumentaria a eficiência de utilização dos nutrientes pela planta, em condições de baixa disponibilidade de P.

Dentre os diversos fatores edáficos que afetam o estabelecimento, a formação e o desenvolvimento de

MVA, é sabido que o fósforo (P) disponível é o fator que mais exerce efeitos na colonização (SIQUEIRA et al., 1984). Deste modo, para RATNAYAKE et al. (1978) e GRAHAM et al. (1981) o P controla a colonização das raízes pela modificação na permeabilidade da membrana das células corticais. Uma das primeiras hipóteses para o controle de P da simbiose micorrízica vesículo-arbuscular, foi proposta por WOOLHOUSE (1975). Para esta hipótese as lectinas e fosfatases ácidas formariam dímeros inativos que atuariam impedindo a colonização, em elevadas taxas de P disponível no solo. Entretanto, para SIQUEIRA et al. (1984), a resposta da planta hospedeira à colonização parece depender do efeito estimulatório da absorção de P e do fluxo de carboidratos da planta para o endossimbionte, ou seja, estaria relacionada ao controle do metabolismo de carboidratos da planta hospedeira na formação da simbiose micorrízica, onde a diminuição ou o aumento (JASPER et al., 1979) deste fluxo poderia afetar o estabelecimento e desenvolvimento do fungo. Recentemente LAMBAIS & MEHDY (1993) propuseram que em altos níveis de P, o aumento da atividade da endoquitinase poderia causar a supressão dos mecanismos de defesa da planta hospedeira, restringindo a expansão da fase intrarradicular do endossimbionte, durante o desenvolvimento das MVA.

SILVA (1990) mencionou que diversos outros fatores bióticos e abióticos do solo atuam sobre o estabelecimento e funcionamento das MVA e contribuiriam de forma significativa para a variabilidade dos resultados obtidos com a inoculação e que, entre estes, se destacam a disponibilidade de nutrientes, e de água, aeração, temperatura, intensidade luminosa, pH, hormônios, exsudatos de plantas e de microrganismos, predação das hifas por nematóides micófagos e hiperparasitismo de esporos.

Apesar de a maioria dos trabalhos indicar o caráter benéfico das MVA, no tocante ao desenvolvimento da planta, não são raros os relatos de efeitos negativos da inoculação (SMITH & DAFT, 1977; STRIBLEY et al., 1980; BETHLENFALVAY et al., 1982b; BUWALDA & GOH, 1982; CARDOSO et al., 1986 e ANTUNES & CARDOSO, 1991). O efeito depressivo sobre o crescimento ocorre em condições específicas, particularmente quando a disponibilidade de P para a planta hospedeira é aumentada (POWELL, 1974; HAYMAN et al., 1975, SANDERS, 1975; MENGE et al., 1978c), ou quando o suprimento de P no solo não é limitante ao crescimento vegetal (CRUSH, 1973; 1976; COOPER, 1975; HALL, 1977), ou quando a taxa de fotossíntese é limitada por baixa intensidade luminosa (DIEDERICHS, 1983a,b) e, finalmente, de acordo com BETHLENFALVAY et al. (1982), quando ocorre uma baixa disponibilidade de P associada com fluxos de elevada luminosidade.

dade. Mais recentemente MANJUNATH & HABTE (1988) propuseram que o desvio de Cu da planta hospedeira para o endossimbionte também poderia ser a causa do crescimento depressivo em condições de baixa disponibilidade desse elemento no solo.

As mais variadas hipóteses procuram explicar este comportamento parasítico de fungos MVA e, segundo ABBOTT & ROBSON (1984), abrangem desde a possibilidade da introdução de fitopatógenos junto com inóculo micorrízico, a toxicidade de P e até uma competição por carbono entre o endossimbionte e a planta hospedeira. Muito embora nenhuma destas hipóteses explique isoladamente todos os relatos de crescimento depressivo em plantas inoculadas com fungos MVA, de acordo com BUWALDA & GOH (1982), a maioria dos casos envolvendo este assunto pode ser atribuída à competição por carbono entre a planta hospedeira e o fungo MVA. As interações entre microrganismos na interface solo-raiz são eventos cruciais nos processos concernentes ao estabelecimento e manutenção da simbiose (BAREA & AZCON-AGUILAR, 1982; LINDERMAN, 1988).

A sobrevivência de fungos MVA no solo e a sua efetividade em promover respostas positivas no crescimento da planta hospedeira pode ser fortemente influenciada por microrganismos da micorrizosfera (AZCON et al., 1976; AMES et al., 1984; MEYER & LINDERMAN, 1986; SECILIA

& BAGYARAJ, 1987; LINDERMAN, 1988; AZCON, 1989; AZCON et al., 1990).

2.2. Anatomia e morfologia das MVA

Segundo BONFANTE-FASOLO (1984), as MVA são caracterizadas por uma fase intramatricial, com hifas intracelulares, hifas intercelulares, arbúsculos e vesículas e uma fase extramatricial, composta de hifas e esporos.

2.2.1. A fase intramatricial

A fase intramatricial pode ser dividida em: hifas intracelulares, hifas intercelulares, arbúsculos e vesículas, em certas associações.

As hifas infectantes dos fungos MVA podem enovelar-se intracelularmente nas primeiras camadas de células formando os chamados pelotões. Alternativamente, o ramo infectante pode penetrar nas células sem enovelar-se.

Segundo ABBOTT (1982), não existe aumento significativo no tamanho do núcleo ou no volume citoplasmático das células invadidas por hifas intracelulares. No nível estrutural citoplasmático, a composição destas células infectadas é totalmente comparável às células corticais não infectadas (CARLING & BROWN, 1982).

As hifas intercelulares são produzidas por enovelamento ou diretamente através da penetração de hifas ramificadas e estão geralmente localizadas nas camadas intermediárias do parênquima cortical (BONFANTE-FASOLO, 1984).

As hifas intercelulares são septadas quando inativas e geralmente não septadas quando ativas (ABBOTT & ROBSON, 1979). De acordo com SCANNERINI & BONFANTE-FASOLO (1983) e MACDONALD & CHANDLER (1981), hifas intercelulares podem abrigar organelas que se assemelham a bactérias.

A natureza bacteriana e o papel dessas organelas na simbiose micorrízica são controvertidos e somente poderão ser esclarecidos quando estas puderem ser isoladas e cultivadas (MACDONALD et al., 1982).

2.2.1.1. Os arbúsculos

Mais internamente, nas camadas do parênquima cortical, as hifas intercelulares penetram na células corticais, dando origem a um complexo sistema de hifas ramificadas, semelhantes a pequenos arbustos, denominados de arbúsculos (BONFANTE-FASOLO, 1984).

Das estruturas que caracterizam as infecções MVA, os arbúsculos têm sido as estruturas mais estudadas e são considerados como sítios preferenciais de trocas meta-

bólicas entre o endossimbionte e a planta hospedeira (GIANINAZZI et al., 1983).

O desenvolvimento dos arbúsculos é iniciado pela penetração na célula hospedeira de uma hifa proveniente de ramificação lateral, produzida a partir de uma hifa intracelular ou intercelular. Após penetrar, a hifa torna-se o ramo principal do arbúsculo, crescendo no interior da célula hospedeira em um padrão dicotômico repetitivo, culminando em uma série de pequenas ramificações bifurcadas. As células corticais da planta hospedeira sofrem uma série de modificações, entre as quais temos: aumento no tamanho do plasmalema, hiperatividade no complexo de Golgi, alteração no desenvolvimento de plastídeos e diminuição no tamanho de vacúolos (CARLING & BROWN, 1982).

O período no qual os arbúsculos permanecem ativos é relativamente curto, variando de 4 a 15 dias (BEVEGE & BOWEN, 1975; COX & TINKER, 1976; CARLING & BROWN, 1982; ALEXANDER et al., 1988).

Segundo YAWNEY & SCHULTZ (1990), os arbúsculos e o plasmalema das células corticais hospedeiras estão separados por uma região interfacial e nunca estão em contato direto. Os resultados de GIANINAZZI-PEARSON & GIANINAZZI (1988) demonstram que o plasmalema ao redor da matriz interfacial é fisiologicamente modificado e torna-se

o sítio ativo das fosfatases e ATPases dependentes de magnésio (Mg).

2.2.1.2. As vesículas

As vesículas são corpos globosos ou elípticos originados a partir das hifas, em posição terminal ou intercalar. Nem todas as espécies de fungos MVA formam vesículas, estas estão ausentes em *Gigapora margarita* e presentes nos gêneros *Glomus* e *Acaulospora* (BONFANTE-FASOLO, 1984).

As vesículas são as estruturas menos estudadas das MVA, entretanto a sua organização citológica e o seu elevado número em raízes senescentes ou mortas sugerem que elas poderiam atuar como estruturas de repouso ou órgãos de reserva (BONFANTE-FASOLO, 1984).

2.2.2. A fase extramatrical

O desenvolvimento e a distribuição da fase extramatrical (fase externa) de fungos MVA, segundo SYLVIA (1992), não tem recebido estudo adequado, quando comparado com os estudos referentes ao desenvolvimento das estruturas internas em raízes colonizadas por fungos MVA, citados em

diversas revisões (SMITH & WALKER,, 1981; SANDERS & SHEIKH, 1983; BONFANTE-FASOLO, 1984).

2.2.2.1. Distribuição da fase extramatrical

a) Morfologia e desenvolvimento

O desenvolvimento e distribuição das hifas externas de fungos MVA variam de acordo com o tipo de solo, planta hospedeira e fungo micorrízico envolvidos (BONFANTE-FASOLO, 1984).

A natureza dimórfica das hifas externas de fungos MVA já era conhecida desde a década de 50, a partir dos trabalhos de MOSSE (1959) e NICOLSON (1959). As informações a respeito da organização ultraestrutural da fase extramatrical são ainda muito escassas. No entanto, tem sido observado, que hifas da fase externa possuem um citoplasma com vários núcleos e vacúolos bastante desenvolvidos, mitocôndria e retículo endoplasmático rico em ribossomos (BONFANTE-FASOLO & GRIPPIOLO, 1982).

As hifas podem ter paredes delgadas ou espessas, não são septadas, apresentando típicas projeções unilaterais (BONFANTE-FASOLO, 1984; NICOLSON, 1959; MOSSE, 1959). Quando em contato com a superfície radicular, a hifa externa ou um tubo germinativo de um esporo expande-

se no ápice e aumenta de tamanho formando uma estrutura protuberante, semelhante a um apressório (GIANINAZZI-PEARSON et al. 1980).

As hifas podem penetrar nas raízes por mais de uma maneira: (1) diretamente através da parede de um pêlo radicular ou da epiderme, ou ainda exoderme (em raízes senescentes) por intermédio de um mecanismo ainda não totalmente elucidado que, no entanto, deve envolver ação mecânica ou enzimática (BONFANTE-FASOLO, 1984); (2) através de um apressório que pode passar por entre os espaços vazios da camada da epiderme da raiz e invadir células intáctas da camada cortical, formando uma laçada intracelular (BONFANTE-FASOLO, 1984) e (3) pela penetração entre células epidérmicas, espalhando-se intercelularmente a partir de um ponto de entrada (COX & SANDERS, 1974; GIANINAZZI-PEARSON et al., 1981).

Esporos globosos estão regularmente associadas à fase extramatrical. Estas geralmente estão próximas aos ápices das hifas, ou em pequenas cadeias ramificadas (MOSSE, 1959; NICOLSON, 1959).

b) Produção de hifas externas no solo

De acordo com KJOLLER & STRUWE (1982), é bastante difícil estimar o micélio de fungos MVA no solo, devido à sua grande variabilidade.

Além das diferenças entre os sistemas experimentais utilizados na quantificação do micélio externo de fungos MVA, segundo SYLVIA (1992), o maior problema está na confrontação dos diferentes parâmetros obtidos através de sistemas experimentais tão diferentes, visto que alguns trabalhos mencionam o mensuramento das hifas aderidas às raízes (hifas do rizoplane), enquanto que outros medem as hifas extraídas do solo, e outros ainda relatam valores para ambos parâmetros, combinados ou separadamente.

c) Fatores que afetam a fase extramatricial

Pouco se conhece a respeito dos efeitos dos vários fatores bióticos e abióticos na distribuição do micélio externo de fungos MVA, entretanto, existem relatos que demonstram a influência destes fatores na resposta da planta hospedeira à colonização, devido à sua atuação direta (SYLVIA, 1992).

Estudos envolvendo a interação entre a fase interna e o teor de P no solo foram efetuados por diversos

autores (CARDOSO, 1984; CARDOSO, 1985; ZAMBOLIM & PINTO, 1985; CARDOSO et al., 1986; SILVEIRA & CARDOSO, 1987; ANTUNES & CARDOSO, 1991) e demonstraram que em níveis altos de P no solo, a fase interna da colonização radicular é reduzida e a presença do fungo, mesmo em pequena proporção, pode causar efeitos depressivos na colonização (SIQUEIRA et al., 1984) e na planta hospedeira (CARDOSO et al., 1986 e ANTUNES & CARDOSO, 1991).

O micélio extramatrical, parece ter resposta similar com relação ao P, sendo que pequenas doses de P (iguais ou menores que o nível crítico de P no solo e na planta) parecem estimular o crescimento das hifas externas, ao passo que em doses elevadas inibem este crescimento (MUNIZ et al., 1985; ABBOTT et al., 1984; SCHWAB et al., 1983).

Outras propriedades físicas e químicas do solo também podem afetar o desenvolvimento e a distribuição da fase externa de fungos MVA no solo, entre os quais, temos: pH (ABBOTT & ROBSON, 1985a), concentração de Cu na solução do solo (GRAHAM et al., 1986), teor de matéria orgânica (ST. JOHN et al., 1983) e teor de umidade (BETHLENFALVAY & AMES, 1987).

Alguns esparsos estudos relatam os efeitos da biota do solo no micélio externo (ST JOHN et al., 1983). Estes autores especularam sobre a possibilidade de certos

actinomicetos estarem envolvidos na inibição do crescimento das hifas externas. FITTER (1985, 1986) sugeriu que *Collembolas* se alimentariam das hifas externas limitando severamente a efetividade de fungos MVA em ecossistemas naturais.

Fatores ligados à planta hospedeira também afetam a produção das hifas externas (SYLVIA, 1992), entre os quais temos: o genótipo vegetal (HECKMAN & ANGLE, 1987), o sombreamento e desfolhamento (BETHLENFALVAY & PACOVSKY, 1983; SAME et al., 1983) podem reduzir a colonização radicular e a formação de vesículas e é provável que estes fatores também afetem as hifas externas, muito embora até o momento, nenhum trabalho tenha sido direcionado para o estudo destas interações SYLVIA (1992), o que seria de fundamental importância para maiores esclarecimentos sobre o funcionamento da simbiose.

2.2.2.2. Funções da fase extramatrical

a) Absorção e translocação de nutrientes e água

RHODES & GERDEMANN (1975) demonstraram que as hifas externas de fungos MVA podem absorver e translocar o P para as raízes da planta hospedeira a partir de distâncias além da zona de depleção da raiz. Entretanto, este

trabalho foi conduzido em solo autoclavado e, segundo FITTER (1985), sob condições naturais, a integridade das hifas pode ser comprometida devido à ação da microbiota e fauna do solo limitando este tipo de transporte de P. Esta hipótese foi confirmada por OWUSU-BENNOAH & WILDS (1979) que comprovaram a existência de zonas de depleções maiores, em raízes micorrizadas, em solos esterilizados que nos não esterilizados.

NELSEN (1987) estudando a absorção de água em plantas com raízes micorrizadas, concluiu que a maioria dos efeitos atribuídas aos fungos MVA ocorre como resposta secundária devido ao incremento na nutrição vegetal. De acordo com VIETS (1972), sob condições de estress hídrico, o movimento de nutrientes na rizosfera é bastante restrito, limitando a absorção de íons de baixa mobilidade. No entanto, HARDIE & LEYTON (1981) afirmaram que aumentos na condutividade hidráulica em raízes são devidos à translocação de água no solo através das hifas. Esta afirmação foi contestada por GRAHAM & SYVERTSEN (1984), que demonstraram que o fluxo de água através das hifas para raízes de plantas micorrizadas não é suficientemente elevado para proporcionar incrementos na condutividade hidráulica.

Segundo SYLVIA (1992), estas contradições poderão ser amenizadas a partir de futuras avaliações do

fenômeno da condutividade hidráulica em raízes de plantas micorrizadas através de estudos efetuados em campo.

b) Transferência de nutrientes entre plantas

A transferência de nutrientes intra e inter-específica por intermédio de hifas já é um fato conhecido em micorrizas de Ericáceas (READ 1984). Em sistemas micorrízicos tipo VA a transferência de C, N e P tem sido postulada através de diversos trabalhos científicos, entre os quais temos: transferência de carbono (HIRREL & GERDEMANN, 1979; FRANCIS & READ, 1984), nitrogênio (VAN KESSEL et al. 1985; FRANCIS et al., 1986) e fósforo (HEAP & NEWMAN, 1980; CHIARIELLO et al. 1982; WHITTINGHAM & READ, 1982; FRANCIS et al., 1986). Entretanto, para SYLVIA (1992), a extensão e as implicações destas translocações de nutrientes através de hifas de fungos MVA ainda não são conhecidas até o momento.

c) Formação de agregados no solo

SUTTON & SHEPPARD (1976) sugeriram que a extensa malha formada pelo micélio de fungos endogonáceos em solo rizosférico atuaria como precursora na formação de agregados no solo. O principal mecanismo responsável

pela formação de agregados seria a ação ligante e a persistência das hifas no solo. Em 1979 TISDALL & OADES relataram a existência de uma boa correlação entre a produção de hifas em solo rizosférico e a formação de agregados estáveis no solo.

LYNCH & BRAGG (1985) sugeriram que esta formação de agregados seria devido a uma ação indireta do micélio de fungos MVA, sendo que este atuaria como substrato para outros microrganismos produtores de polisacarídeos. As gomas produzidas por certas bactérias seriam o agente de ligação e responsáveis pela formação dos agregados no solo.

d) Utilização como fonte de inóculo

WARNER & MOSSE (1980, 1983) e WARNER (1984) conduziram uma série de experimentos utilizando um sistema de membranas que limitavam o crescimento de raízes infectadas, mas permitiam o crescimento e a distribuição do micélio externo no solo, e afirmaram que as hifas externas poderiam atuar como fonte de inóculo e dar início às infecções micorrízicas, a partir de distâncias de 20mm, em relação ao sistema radicular da planta hospedeira.

Em um trabalho recente, BIRCH (1986) afirmou que, em ecossistemas naturais, as hifas externas,

poderiam ser importantes fontes de inóculo na formação das MVA.

2.3. Métodos de quantificação

As técnicas utilizadas para quantificar o micélio externo de fungos MVA podem ser agrupadas como segue: 1) Métodos indiretos para a quantificação de hifas totais, 2) métodos diretos para a quantificação de hifas totais e 3) métodos para a detecção de hifas ativas (SYLVIA, 1992).

2.3.1. Métodos indiretos para a quantificação de hifas totais

a) Agregação do solo

A partir de modificações na técnica de SUTTON & SHEPPARD (1976), GRAHAM et al. (1982) estimaram o desenvolvimento relativo das hifas externas através da pesagem das hifas aderidas às raízes. Em resumo, este método consiste em se separar uma amostra de solo mais raízes, secá-la ao ar, e depois agitar as raízes para remover todo o solo não aderido firmemente. As raízes são depositadas em um béquer com água e após a decantação do

solo rizosférico remanescente, este será seco e pesado. Secam-se as raízes e determina-se a sua massa. Expressa-se a quantidade de solo aderido às raízes em termos de gramas de solo seco por miligrama de matéria fresca de raiz. Uma estimativa indireta da quantidade de micélio externo é obtida através da pesagem do solo aderido às raízes. Usando este método, os referidos autores, conseguiram obter correlação entre a estimativa do desenvolvimento de hifas e o crescimento da planta hospedeira. Entretanto, segundo KOUGH & LINDERMAN (1986), não é possível comparar o desenvolvimento do micélio externo entre solos diferentes e espécies fúngicas diferentes, utilizando esta técnica.

b) Determinação da quitina

A determinação da biomassa fúngica no solo pode se feita através da determinação da quantidade de quitina no solo (PACOVSKY & BETHLENFALVAY, 1982; AHMADASD, 1984; BETHLENFALVAY & AMES, 1987). Entretanto, este método é inadequado quando utilizado em condições não controladas, visto que, a quitina é bastante comum na natureza. Esta pode ser encontrada nas paredes celulares de muitos fungos e no exoesqueleto de insetos. Em determinados solos, certas propriedades físicas e químicas inviabilizam o emprego

desta técnica (JASPER & MILLER, 1985, citado em SYLVIA, 1992).

O método consiste em misturar-se uma quantidade conhecida de solo com hidróxido de potássio concentrado e depois autoclavar a mistura por 1 hora para degradar a quitina à quitosana, suspender a amostra em etanol (75%) e centrifugá-la a 5000g a 4°C por 10 minutos. O pellet será lavado com etanol (40%) e ácido clorídrico (0,01N pH 2.0) e água destilada. A biomassa fúngica, expressa em equivalentes de quitina ou acetilglucosamina, será determinada através do método colorimétrico descrito por HEPPER (1977) e adaptado por PACOVSKY & BETHLENFALVAY (1982), utilizando-se quitina P.A. para a construção de uma curva padrão. A partir daí, a biomassa fúngica será determinada subtraindo-se o conteúdo de quitina obtido das plantas não inoculadas das plantas inoculadas (PACOVSKY & BETHLENFALVAY, 1982; AHMADSAD, 1984; BETHLENFALVAY & AMES, 1987). BETHLENFALVAY et al. (1981) encontraram 85µg de quitina mg⁻¹ de massa fúngica seca, utilizando esta técnica, em condições controladas.

2.3.2 Métodos diretos para hifas totais

a) Método da membrana de filtração

Através de modificações no método de HANSSEN et al. (1974), diversos autores conseguiram extrair hifas externas de fungos MVA do solo e quantificar o seu comprimento (ABBOTT et al., 1984; SYLVIA, 1986; MILLER et al., 1987; SCHUBERT et al., 1987).

Pelo método, amostras de solos são coletadas aleatoriamente e misturadas. Daí, retiram-se subamostras, que são suspensas em água e passadas através de uma peneira com malha de 250µm de diâmetro. O filtrado é agitado em liquificador por alguns segundos e após uma breve decantação, uma porção significativa do sobrenadante é passada por uma membrana de celulose de 0,45µm de diâmetro de poros. A membrana é então recoberta com uma solução de azul de tripano (0,05%) e lavada com água desionizada. Posteriormente, a membrana é cortada, montada em uma lâmina de microscopia e observada em aumento de 300X através de uma ocular microscópica com reticulado, aonde se contabilizam os pontos de interseções formados entre este reticulado e os segmentos de hifas. O comprimento total de hifas é estimado através de uma equação desenvolvida por NEWMAN (1966) . Conhecendo-se a massa original da amostra de solo,

a massa de solo suspensa na água, o volume de água da suspensão passado pela membrana de celulose e a proporção do total da membrana observada microscopicamente, é possível estimar-se o comprimento de hifas por grama de solo da amostra original. É conveniente avaliar cerca de 20 a 60 campos por membrana para uma melhor precisão na estimativa final (ABBOTT et al., 1984; SCHUBERT et al., 1987; SYLVIA, 1988).

Muitos pesquisadores utilizam o diâmetro das hifas para distinguir as hifas de fungos MVA daquelas oriundas de fungos não micorrízicos (GRAHAM et al., 1986; BETHLENFALVAY & AMES, 1987). Entretanto, ABBOTT & ROBSON (1985b) afirmaram que é impossível se distinguir hifas de fungos MVA das hifas de outros fungos do solo, apenas baseando-se em critérios morfológicos e de coloração. Segundo estes autores, um bom critério seria subtrair-se o comprimento do micélio externo oriundo de vasos de plantas não inoculadas do micélio externo dos vasos das plantas inoculadas com fungos MVA e assumir que não houve interações entre o endófito e os outros fungos no solo.

b) Métodos de imunofluorescência

As técnicas serológicas têm potencial muito relevante para a detecção de hifas de espécies micorrízicas

no solo. Um dos primeiros trabalhos a utilizar técnicas de imunofluorescência na detecção de hifas de fungos MVA no solo foi desenvolvido por KOUCH & LINDERMAN (1986).

Em resumo, a técnica empregada por KOUCH & LINDERMAN (1986) poderia ser descrita da seguinte forma: os antígenos foram preparados a partir de esporos, lavados e esterilizados por duas semanas em uma solução de antibióticos (200µg de estreptomicina ml⁻¹ e 100µg de gentamicina por ml de tampão salino). Deste modo, os esporos limpos foram macerados após uma secagem de três dias, a fração sólida e a fração líquida foram separadas por centrifugação (13000g por 3 minutos). A fase sólida foi lavada e ressuspensa em um tampão salino e armazenada a -20°C. Então, 0,5ml da fração particulada foi injetada por via intravenosa e intramuscular em coelhos, várias vezes por um período de 96 dias. Posteriormente, amostras de sangue foram retiradas e a produção anticorpo foi avaliada. As hifas examinadas foram passadas por uma membrana de filtração e enxaguadas com o tampão salino. Um antissoro de coelho marcado com fluoresceína foi incubado com as hifas a 40°C por 1 hora e logo após, as amostras contendo as hifas e o antissoro foram enxaguadas com o tampão salino. Finalmente as amostras foram observadas em um microscópio epifluorescente (450-490nm de comprimento de onda). Segundo os autores o antissoro reagiu especificamente com as hifas de

Glomus versiforme em solos minerais, entretanto não foi satisfatório quando utilizado em solos orgânicos devido a autofluorescência da matéria orgânica. O aperfeiçoamento da especificidade do antissoro poderá permitir a identificação de um isolado específico em solos naturais.

2.3.3. Métodos para a detecção de hifas ativas

Todos os métodos descritos acima apenas quantificam a massa total do micélio externo, sem diferenciar a porção ativa da porção inativa. De acordo com SANDERS et al. (1977), BEEVER & BURNS (1980), SMITH & SMITH (1986) a absorção e a translocação de P do solo para as hifas fúngicas e do fungo para o hospedeiro são efetuadas por intermédio de transporte ativo; deste modo, a quantificação e o conhecimento da proporção do micélio que está metabolicamente ativo deverá dar um indicativo da capacidade de transporte de nutrientes por fungos micorrízicos.

MACDONALDS & LEWIS (1978), KOUCH & GIANINAZZI-PEARSON (1986), SCHUBERT et al. (1987) e SYLVIA (1988) utilizaram técnicas enzimáticas para quantificar a atividade do micélio de fungos MVA.

A técnica da redução de sais de tetrazólio por desidrogenases é um método histoquímico bastante comum (PEARSE, 1972) e bastante utilizado na área de tecnologia

de sementes, para quantificar a viabilidade das mesmas. Esta técnica foi utilizada por KOUCH & GIANINAZZI-PEARSON (1986) e SYLVIA (1988) para a quantificação da atividade metabólica de hifas de fungos MVA, visto que os sais de tetrazólio, são utilizados como receptores de elétrons em oxidações catalizadas por enzimas. Succinato desidrogenase reduz o tetrazólio nitro-azul (nitro-BT) (KOUCH & GIANINAZZI-PEARSON, 1986) e NADH desidrogenase reduz o iodonitrotetrazólio (INT) (SYLVIA, 1988).

SCHUBERT et al. (1987) usaram fluoresceína diacetato (FDA) para quantificar também a atividade de hifas de fungos MVA, visto que a FDA é absorvida pelas células através de transporte ativo, aonde é hidrolisada por esterases (ROTMAN & PAPERMASTER, 1966). A fluoresceína, produto da FDA hidrolisada, acumula-se e, através de microscopia epifluorescente, é possível identificar hifas metabolicamente ativas (SCHUBERT et al., 1987).

Todos estes métodos utilizam-se de modificações da técnica da grade de filtração para extrair as hifas do solo e da metodologia adaptada por NEWMAN (1966) para a quantificação do micélio externo ativo e total, normalmente expresso em metros ou centímetros de hifas por grama de solo ou metros ou centímetros de hifas por metros ou centímetros de raiz colonizada.

2.3.4. Limitações dos métodos atuais de quantificação e estratégias para a sua incrementação.

Segundo SYLVIA (1992), não existe um método totalmente satisfatório para a quantificação das hifas externas de fungos MVA no solo. Segundo o mesmo autor, três problemas ainda não foram suplantados: (1) não existe um método que realmente consiga distinguir as hifas de fungos MVA das hifas de outros fungos no solo, (2) os métodos atuais utilizados para quantificar a viabilidade e atividade das hifas externas são extremamente problemáticos, (3) os métodos atuais de quantificação são demorados e entediantes.

O desenvolvimento de técnicas como o do seccionamento de amostras intáctas de solos (SKINNER & BOWEN, 1974) e da autoradiografia (OWUSU-BENNOAH & WILD, 1979) poderão contribuir para o aumento do entendimento da função das hifas em ecossistemas naturais. O uso de anticorpos policlonais (ALDWELL & HALL, 1986, KOUCH & LIDERMAN, 1986) e de anticorpos monoclonais (MORTON et al., 1987) poderão ajudar na monitorização de fungos específicos em condições naturais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido na ESALQ, no Departamento de Ciência do Solo, e constou de dois experimentos conduzidos em casa-de-vegetação, sendo ambos com a cultura do milho.

3.1. Descrição dos experimentos 1 e 2

3.1.1. Delineamento experimental e análise estatística

Para ambos os experimentos, o delineamento foi inteiramente casualizado no esquema fatorial, com dois fatores: A) com e sem a presença do fungo MVA e B) com 4 níveis de P:0, 25, 50, 75 mg de P/kg de solo, e com 4 repetições por tratamento. As plantas do primeiro experimento foram colhidas aos 90 dias e as do segundo foram colhidas em três épocas distintas, aos 30, 60 e 90 dias após o plantio (DAP).

Os dados expressos em porcentagem foram transformados adotando-se a relação:

$$\arcsen \sqrt{\frac{x}{100}}$$

Para o experimento - 2 efetuou-se a análise de variância e aplicou-se o teste F. A comparação de médias entre tratamentos dos fatores FUNGO e ÉPOCAS foi efetuada, duas a duas, através do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Foi efetuada também a análise de correlação entre os teores e quantidades totais de P absorvido pela parte aérea das plantas e o micélio externo total (MT), micélio externo ativo (MA) e entre MT, MA e porcentagem do comprimento de raiz colonizada (C%), pelo método dos quadrados mínimos; e a comparação dos coeficientes de correlação foi feita pelo teste t.

Utilizou-se o programa SANEST do Centro de Informática na Agricultura (CIAGRI/ESALQ/USP) para a análise de variância e comparação de médias.

3.1.2. Planta hospedeira

Para ambos experimentos, empregou-se como planta hospedeira o milho (*Zea mays* L.) var. Piranão, obtida a partir de sementes, as quais foram fornecidas pelo Departamento de Genética da ESALQ/USP, Piracicaba.

3.1.3. Preparo do substrato, calagem, adubação e irrigação

O substrato utilizado nos experimentos consistiu de uma mistura de solo e areia de rio na proporção de 1:1 (v/v). O solo empregada como substrato em ambos experimentos foi classificado Areia Quartzosa da Série Paredão Vermelho, coletada na região de Piracicaba, São Paulo, a uma profundidade de 0-20cm.

Antes do preparo da mistura, o solo foi seco ao ar e posteriormente peneirado em malha de 4mm para uniformização. Logo após a homogeneização da mistura, tomou-se uma amostra de 1kg para análises físicas e químicas que foram realizadas pelo Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP (Tabelas 1 e 2).

O substrato foi autoclavado à 121°C por um período de duas horas e colocado nos vasos.

No primeiro experimento utilizaram-se vasos de plástico e no segundo experimento, optou-se pelo uso de vasos de barro, ambos com capacidade de 3kg de solo. Todos os vasos foram previamente desinfestados com uma solução de lisofórmio em água (300 ml/20 l).

Tabela 1. Dados referentes à análise química do substrato utilizado nos experimentos 1 e 2

Parâmetros analisados	Valores
pH (CaCl ₂)	3,50
M.O. (%)	1,40
PO ₄ - ³ (meq/100ml)	0,02
K ⁺ (meq/100ml)	0,05
Ca ⁺² (meq/100ml)	0,10
S-SO ₄ (meq/100ml)	0,14
Mg ⁺² (meq/100ml)	0,10
Al ⁺³ (meq/100ml)	0,10
H+Al ⁺³ (meq/100ml)	4,70
S(%)	0,30
T(%)	5,00
V(%)	6,00
m(%)	80,00
B(ppm)	0,00
Zn (ppm)	2,00
Fe(ppm)	133,00
Mn(ppm)	23,40

Tabela 2. Composição granulométrica do substrato utilizado nos experimentos 1 e 2

Fração	%
Areia grossa	29,00
Areia fina	61,80
Areia total	94,00
Silte	7,00
Argila	2,8

A calagem foi realizada com base na análise química e física do substrato (Tabelas 1 e 2) para elevar a saturação de bases para 70% (RAIJ, 1992). Aplicou-se 3,4g de calcário dolomítico por vaso (44% de CaO, 25% de MgO e PRNT de 140%).

O substrato foi colocado em sacos plásticos, juntamente com a dose de calcáreo calculada. Após uma homogeneização, o conteúdo dos sacos foi distribuído nos vasos e incubado por 15 dias, mantendo-se o teor de umidade em 70 % da capacidade de retenção de água.

A adubação foi efetuada após a secagem do substrato, por ocasião da semeadura, baseando-se em dados de adubação para milho e sorgo (MALAVOLTA, 1975, 1980; FREIRE et al., 1980; MIRANDA et al., 1984). Colocaram-se para cada 1kg de substrato as seguintes quantias de macro e micronutrientes: 80mg de N (NH_4NO_3), 150mg de K (K_2SO_4), 2mg de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,5mg de B (H_3BO_3) e 0,1mg de Mo (H_2MoO_4). A adubação nitrogenada foi aplicada parceladamente em quatro vezes (20mg de N, kg^{-1} de substrato). A primeira foi feita com a adubação básica e as demais aos 26, 46 e 66 dias após o plantio. Todos os nutrientes, com exceção do fósforo (P), foram aplicados na forma de solução aquosa.

O fósforo foi adicionado ao solo nas doses: 0, 25, 50 e 75 mg de P por kg de substrato. Utilizou-se

para isso uma fonte solúvel, super fosfato simples (SS), com 18,5% de P_2O_5 em citrato neutro de amônio e água (CNA)¹, e cerca de 26% de CaO e 11,6% de S (MALAVOLTA, 1975, 1980).

A umidade no solo foi mantida em 70 % da capacidade de retenção de água através de pesagens diárias dos vasos.

3.1.4. Endófito

A espécie fúngica MVA utilizada em ambos experimentos foi *Glomus etunicatum* (Becker & Gerdemann), previamente multiplicado em vasos de cultivo com *Brachiaria decumbens* Stapf.

3.1.5. Semeadura e inoculação

Para ambos experimentos, foram plantadas 5 sementes de milho; posteriormente, apenas duas plantas foram deixadas por vaso, em função de desbastes realizados aos 5 e 10 dias após a semeadura. A fim de se eliminar possíveis patógenos externos das sementes, uma desinfestação foi efetuada, utilizando-se uma solução de hipoclo-

¹Análises realizadas nos laboratórios do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP

rito de sódio em água (2,5 % v:v) por cerca de 15 minutos; logo após, estas foram lavadas em água corrente e postas para secar em papel absorvente à sombra.

Na inoculação, utilizaram-se 50g de inóculo por vaso (constituído de solo, hifas do fungo MVA, segmentos de raízes colonizadas de *Brachiaria decumbens* e cerca de 1250 esporos). Nos vasos não inoculados, adicionou-se a mesma quantidade de "inóculo", livre de estruturas fúngicas.

3.2. Experimento 1: Desenvolvimento de uma técnica para a extração do micélio externo de fungos MVA do solo.

Neste primeiro experimento, desenvolveu-se a técnica para a extração do micélio, estudou-se a variância de amostras do mesmo tratamento, da mesma repetição e de repetições diferentes. Determinou-se o número de campos microscópicos a serem analisados para se obter um erro máximo de 20% a uma probabilidade de 95%. Determinou-se o comprimento total de hifas externas (MT), expresso em metro de hifas por grama de solo (m/g), para todas as repetições dentro das quatro doses de P, tanto nas plantas inoculadas, como nas não inoculadas.

Este experimento foi dividido em três etapas, descritas a seguir:

Etapa 1 Extração do micélio do solo.

Esta etapa teve como objetivos: a) desenvolver a metodologia de extração do micélio, b) determinar a quantidade ideal de amostra de solo para a extração, c) avaliar a utilidade da fragmentação das hifas, d) testar as técnicas de extração utilizadas em relação à textura do solo e e) obter micélio extraído livre de impurezas.

As amostras de cada vaso foram colhidas com auxílio de um trado de PVC de 20cm de comprimento e 2,5cm de diâmetro até o fundo do vaso. Logo após, estas foram colocadas em sacos plásticos devidamente etiquetados, homogeneizadas e levadas imediatamente para a extração do micélio.

Durante esta etapa diversos estudos paralelos foram realizados, descritos a seguir:

Sub-etapa a)

Testaram-se três métodos de extração, que são descritos a seguir:

a1 - Método descrito por SCHUBERT et. al. (1987), modificado.

Utilizando-se diversas subamostras de solo, adotou-se o procedimento descrito a seguir: cada subamostra foi passada isoladamente por peneiras de 0,71mm , 0,250mm e 0,044mm de malha com água em jato dirigido até obter o volume de 1500 ml. O material que ficou retido na peneira de 0,044mm de malha foi colocado em tubos de 75 ml e adicionaram-se 25 ml de uma solução de sacarose a 50%, deixando em repouso por 2 minutos. O sobrenadante foi separado e recolhido na peneira de 0,044mm de malha. Adicionaram-se mais 20 ml de sacarose 50%, repetindo o processo. A suspensão foi lavada com água corrente e ressuspendida em 25 ml de sacarose 50% e centrifugada por 30s a 415g. O sobrenadante foi coletado, lavado com água e guardado em vidros com tampas (10 ml de capacidade);

a2 - Método descrito por SYLVIA (1988), modificado.

Em cada subamostra foram adicionados 500ml de água com jato dirigido. Deste modo, todo o conteúdo foi passado através de uma peneira de 0,71mm e 0,250mm de malha. O filtrado foi homogeneizado em liquidificador por 25s e uma alíquota de 25 ml foi retirada e passada através da peneira de 0,044mm e o material retido foi colocado também nos vidros mencionados anteriormente;

a3 - Método idealizado no laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ, baseado nos dois métodos anteriores.

Para cada subamostra foram adicionados 1500 ml de água com jato dirigido e todo o conteúdo foi passado através de peneiras de 0,71mm e 0,250mm de diâmetro de poro. O filtrado foi homogeneizado em liquidificador durante 30 segundos, na rotação mais baixa e passado por uma peneira de 0,044mm de malha. O retido foi colocado em béquer de 100ml e então adicionaram-se 50 ml de sacarose (70%). Após 1 minuto de decantação, o sobrenadante foi repassado novamente pela peneira de 0,044mm e lavado com água corrente. Logo após, o retido também foi colocado nos recipientes citados anteriormente;

Sub-etapa b)

Determinou-se a quantidade de solo da subamostra mais representativa em relação aos 3kg do vaso. Sendo assim, testaram-se as seguintes quantidades de solo para a extração de micélio: 10, 20, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100g, para cada método testado;

Sub-etapa c)

Determinou-se o tempo de fragmentação de hifas e a velocidade de rotação do liquidificador (marca

ARNO) mais efetivos na distribuição das hifas na membrana utilizada para a contagem. Empregaram-se tempos diferenciados (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 segundos) associados às velocidades baixa, média e alta para uma repetição de cada tratamento.

Sub-etapa d)

Testou-se a eficiência das técnicas de extração utilizadas em relação à textura de solo. Para tanto, subamostras de 10g de quatro tipos diferentes de solos foram coletadas (areia de rio 0% de argila; solo da Série Paredão Vermelho, 3% de argila; solo da Série Sertãozinho, 17% de argila; solo da Série Iracema, 46% de argila) e testadas;

Sub-etapa e)

Testaram-se métodos para a limpeza do micélio extraído. Utilizaram-se os procedimentos descritos a seguir: o material retido na peneira de 0,044mm foi suspenso em sacarose (25, 50 e 75%) por um, dois, três e quatro minutos, recolheu-se o sobrenadante e este foi ressuspenso em sacarose (25, 50 e 75%) e centrifugado (1, 2, 3 e 4 minutos), em 184, 415, 738 e 1150g.

Etapa 2 Membrana utilizada e ajuste do dispositivo utilizado para a contagem das hifas.

Esta etapa teve como finalidade ajustar o dispositivo utilizado para a contagem das hifas.

As membranas utilizadas para a deposição e contagem das hifas eram de triacetato de celulose (0,45 µm de porosidade e 47mm de diâmetro) e tinham marcações reticuladas nas quais as linhas verticais e horizontais eram espaçadas de 5mm.

O dispositivo (descrito na literatura estrangeira como "eye piece whipple disc", ocular reticulada), consistia de um disco de vidro (25mm de diâmetro), com um reticulado interno, com subdivisões de 1mm², distribuídas em 20 linhas verticais e 20 horizontais. Este dispositivo foi acoplado a uma ocular de um microscópio ótico comum (JENEVAL, Carl Zeiss).

A calibração do dispositivo foi efetuada em função da técnica descrita por NEWMAN (1966) através da equação 1.

$$R = \frac{\pi \cdot A \cdot n}{2 \cdot H}, \text{ onde:}$$

R - é o comprimento das hifas dentro da área do reticulado do dispositivo utilizado para a contagem (eye piece Whipple disc);

A - é a área interna do reticulado do dispositivo;

H - é o comprimento total das linhas verticais e horizontais do dispositivo;

n - é o número de interseções formados entre as linhas verticais e horizontais do reticulado interno do dispositivo e os segmentos de hifas;

π - 3,14.

Para se determinarem as incógnitas da equação de NEWMAN (1966) seguiram-se as informações do professor DAVID M. SYLVIA², da Universidade da Flórida e ajustou-se o dispositivo no aumento desejado (12,5X e 25X, objetiva e ocular respectivamente) para a quantificação do comprimento das hifas. O valor de H foi calculado obedecendo os seguintes passos: utilizando-se uma ocular micrométrica, de 2mm de comprimento e subdividida em 0,01mm, no aumento desejado, mediu-se o comprimento de um dos lados do reticulado interno do dispositivo. Posteriormente, multiplicou-se o número total de linhas verticais e horizontais (20 verticais e 20 horizontais) pelo valor medido anteriormente. O produto resultante é o valor de

²Comunicação pessoal

"H". Calculou-se o valor de "A", elevando o comprimento lateral do reticulado interno do dispositivo ao quadrado.

Etapa 3 Quantificação do micélio externo

Esta teve como objetivos estudar a variabilidade da distribuição das hifas na membrana utilizada para a contagem, a determinação do número de campos microscópicos ideal para a contagem das hifas na membrana e a quantificação do micélio externo total.

Para o estudo da variabilidade da distribuição das hifas na membrana de triacetato, empregou-se a técnica descrita por SNEDECOR & COCHRAN (1972) e HAJEK (1981).

Para a determinação do número de campos microscópicos a serem contados por membrana, as marcações da membrana foram utilizadas como referência. Contou-se o número total de campos microscópicos existentes na membrana e através da técnica de NEWMAN (1966) e do método de amostragem aleatória simples, descrito por COCHRAN (1965), determinou-se o número de campos microscópicos para a quantificação do micélio externo.

Nesta etapa, para a determinação do número de campos, foram utilizadas a equação 1 (etapa-2) e as equações 2 e 3 representadas a seguir:

Equação 2

$$n = \frac{t^2 \cdot s^2}{d^2}, \text{ onde:}$$

- n = tamanho da amostra em populações infinitas;
 t = abscissa da curva de frequência bilateral de t de Student;
 s^2 = variância amostral;
 d^2 = semi-amplitude do intervalo de confiança, obtida a partir da fixação de $1 - \alpha$, onde $1 - \alpha$ é o coeficiente de confiança do intervalo, para o nosso caso, 95% de probabilidade.

Equação 3

$$n' = \frac{n}{1 + \frac{n}{N}}, \text{ onde:}$$

- n' = tamanho da amostra em populações finitas;
 N = tamanho da população;
 n = obtido através da equação 2.

Para cálculo do comprimento total de hifas utilizou-se a equação 4:³

Equação 4

$$\frac{R}{1} \times \frac{A}{B} \times \alpha \times \beta \times \frac{1}{MSS}, \text{ onde:}$$

R = Valor médio de R (relação de NEWMAN, 1966) por membrana, expresso em milímetros de hifas, obtido pela equação 1

A = 989,0 mm²; área útil da membrana calculada após a filtração;

α = 1500 / 1200; relação entre o volume total de água adicionado à amostra de 10g e o volume retirado para a extração do micélio;

β = 1m / 1000mm, 1000 mm em cada 1 m; Fator de conversão de mm para m;

B = 0,0998 mm²; área do reticulado interno do dispositivo no aumento utilizado para a contagem das hifas;

MSS = Massa da amostra de solo seco utilizada para extrair o micélio, obtida por gravimetria e expressa em gramas.

3.3. Experimento 2 Quantificação da atividade do micélio externo de *Glomus etunicatum* no solo e avaliação de parâmetros de crescimento da planta.

Este experimento teve dois objetivos:

(1) quantificar o comprimento do micélio externo total (MT)

³DAVID M. SYLVIA, comunicação pessoal.

e ativo (MA) e a porcentagem de colonização radicular interna (CI%);

(2) avaliar a resposta de crescimento da planta hospedeira à inoculação (produção de matéria seca na parte aérea, MSPA, expressa em gramas por vaso) e a absorção de nutrientes na parte aérea (expressa em termos de teores e quantidades totais).

3.3.1. Coloração de hifas para determinação da quantidade de micélio externo ativo (MA)

As hifas foram coradas a partir de modificações no método de SYLVIA (1988). A solução utilizada para a coloração das hifas foi preparada a partir de volumes iguais de p-iodonitrotetrazólio (INT, 1mg ml^{-1}), β -NADH (3mg ml^{-1}) e uma solução tampão TRIS 0,2M em pH 7,4. Com a finalidade de se dissolver melhor o INT, adicionaram-se algumas gotas de etanol 98% (SYLVIA, comunicação pessoal). A coloração das hifas foi efetuada, adicionando-se um volume conhecido da solução de INT ao micélio retido nos frascos de vidro (item 3.2., etapa 1, sub etapa a)

Com o objetivo de determinar o volume ideal de solução de INT a ser adicionado aos frascos receptores

do micélio, volumes diferenciados da solução de INT (0,5, 1 e 1,5 ml) foram testados;

Com a finalidade de determinar o tempo mais adequado para incubação do micélio na solução de INT, utilizaram-se os trabalhos de HAMEL et al. (1990) e SYLVIA (1988) como referência e incubou-se o material retido nos recipientes em 4, 6, 8, 10 e 12 horas à temperatura ambiente;

Após o período de incubação, visando distinguir as hifas mortas (coloridas de azul) das ativas (coloridas de vermelho), efetuou-se uma coloração diferencial, com azul de tripano a 0,025 e 0,05 % (SYLVIA, 1988, com modificações), adicionando-se volumes diferenciados do corante (0,5, 1,0, 1,5 ml) ao conteúdo retido nos recipientes e incubando-se por tempos diferentes (5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos).

Para a deposição das hifas na membrana de triacetato de celulose, após a coloração, utilizou-se de um compressor para a produção de vácuo e um dispositivo de filtragem. A membrana foi depositada sobre uma lâmina para microscopia (2209mm².) contendo uma gota de óleo de amêndoa. A seguir, cobriu-se a membrana com outra lâmina idêntica à mencionada anteriormente.

3.3.2. Determinação do comprimento e atividade das hifas

Quantificou-se o comprimento total e ativo do micélio externo (MT e MA respectivamente) através da equação 4 descrita no item 3.2. (etapa 3).

3.3.3. Percentagem de colonização radicular interna

O sistema radicular foi lavado com água corrente. A porcentagem de colonização radicular foi estimada pelo método da placa quadriculada de GIOVANETTI & MOSSE (1980), após coloração com azul de tripano em lacto-glicerol, segundo a metodologia modificada de PHILLIPS & HAYMAN (1970).

3.3.4. Massa da matéria seca da parte aérea (MSPA)

Após a retirada das amostras de solo e a extração do micélio em laboratório, o sistema radicular foi separado da parte aérea na altura do coleto.

As partes aéreas cortadas foram colocadas em sacos de papel e secas em estufa com ventilação forçada, à 70°C até peso constante. Em seguida, determinou-se matéria seca (MSPA) em balança semi-analítica.

3.3.5. Absorção de nutrientes na parte aérea da planta

Logo após a determinação da MSPA, a parte aérea foi moída em moinho Willey com peneira nº 20. Proce-
deu-se o preparo dos extratos para a análise química, ado-
tando-se a metodologia descrita por SARRUGE & HAAG (1974).
O N, após a digestão sulfúrica, foi determinado pelo método
de Kjeldahl; os demais nutrientes, após a digestão nitro-
perclórica, foram assim determinados: o P-colorimetria,
utilizando molibdato de amônio; Ca, Mg, Cu, Zn, Mn e Fe por
espectrofotometria de absorção atômica; K por fotometria de
chama e S por turbidimetria.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento 1.

Extração do micélio do solo

O método desenvolvido no laboratório de Microbiologia do Depto. de Ciência do Solo foi o mais eficiente, dentre os testados na extração, tendo em vista a maior quantidade de micélio extraído.

A técnica exposta por SYLVIA (1988) trazia uma grande quantidade de partículas de solo, que sujavam excessivamente a membrana, à medida que se utilizavam amostras maiores que 10g, quando aplicada em solos com teores de argila elevados (para os solos testados, este teor está acima de 17% de argila). A utilização apenas da peneira de 0,250mm de malha, como descrito originalmente, permitia a passagem de uma grande quantidade de fragmentos radiculares que, quando fragmentados no liquificador, inviabilizavam a coleta do micélio. Deste modo, passou-se a

usar a associação da peneira de 0,71mm à de 0,250mm de malha.

Constatou-se que o tempo de 15 segundos, como descrito originalmente, não permitia uma fragmentação homogênea das hifas, sendo assim optou-se pelo aumento do tempo de fragmentação de 15 para 30 segundos.

No tocante à técnica descrita por SCHUBERT et al. (1987), observou-se que a suspensão do micélio em sacarose e a centrifugação acarretaram perdas de micélio, quando se empregavam amostras menores que 70 gramas de solo para a extração. Durante a centrifugação uma quantidade considerável de hifas fragmentadas decantava junto com as partículas mais finas, quando se utilizavam solos com teores de argila elevados (para os solos testados, teores de argila > 17%), mesmo variando a velocidade e o tempo de centrifugação (velocidade e tempo de centrifugação citados no item 3.2.; etapa 1; sub-etapa e).

Ficou constatado que 10g era o tamanho de amostra de solo rizosférico adequado para a extração, para a área da membrana utilizada para a deposição e contagem das hifas. À medida em que se empregaram amostras maiores que 10g, o número elevado de hifas inviabilizava a contagem. Entretanto constatou-se que a utilização de amostras pequenas, pode acarretar erros na quantificação do micélio

externo, função da sua grande variabilidade , mesmo quando compararam-se subamostras diferentes do mesmo tratamento (por exemplo: Amostra Nº 44, nível P0, leituras de 3 repetições: 27,7; 23,5; 20,4 metros de hifas por grama de solo).

Ocorreu também frequentemente uma má distribuição das hifas na superfície da membrana. Uma forma encontrada para amenizar esta má distribuição, foi a utilização do reticulado da membrana como áreas de referência para a contagem. Deste modo, a partir da contagem sistemática das áreas dentro do reticulado da membrana, foi possível obter-se uma contagem mais adequada da quantidade real de micélio.

Talvez uma amostra mais representativa seria obtida a partir da utilização de amostras de solo maiores, se possível o volume total do vaso. Com o emprego de diluições (INGHAM & KLEIN, 1984) poder-se-ia obter o tamanho de amostra de solo rizosférico ideal para qualquer sistema de filtração e qualquer diâmetro de membrana. Entretanto, constatou-se que o emprego de técnicas de diluições associadas às alíquotas de suspensões de solo, mostrou-se ineficiente quando empregado em solos com teores de argila elevados (para os solos testados > 17%), devido à grande quantidade de micropartículas que impregnavam a membrana, inviabilizando a contagem.

Constatou-se que, com o liquidificador aqui utilizado, (marca ARNO), de alta potência, era necessária a utilização da velocidade mais baixa de rotação, porque quando se utilizavam as velocidades média e alta havia uma fragmentação excessiva das hifas, que inviabilizava a contagem.

Todos os métodos de extração testados mostraram eficiência, quando aplicados em solos com teores de argila baixos (para os solos testados com teor de argila < 17%) e ineficiência em solos com teores de argila elevados (para os solos testados com teor de argila > 17%).

Para os solos testados (com teores de argila > 17%) uma grande quantidade de micropartículas ficava aderida às hifas fragmentadas e, devido à cor vermelha da argila predominante na maioria dos nossos solos argilosos tropicais, a membrana ficava suja, e a visualização e a contagem ficavam muito limitadas, mesmo aplicando-se as técnicas de limpeza já descritas (item 3.2; etapa 1; sub-etapa e).

É possível que os métodos de extração aqui testados sejam eficientes se utilizados em solos argilosos de regiões temperadas, por serem menos intemperizados e possuírem outros tipos de minerais de argila.

Nos solos testados (com teores de argila > 17%) apenas a suspensão do micélio em sacarose 50% por um minuto, já se mostrou eficiente, devido à grande quantidade de micélio limpo extraída. A etapa de se ressuspender o sobrenadante em sacarose mostrou-se desnecessária quando utilizada nos solos arenosos e ineficaz em solos muito argilosos.

Quantificação do micélio externo

Em função do estudo estatístico analítico descritivo e do emprego da técnica de amostragem determinou-se que 64 campos microscópicos (que corresponde a quatro marcações com 16 campos⁴ contabilizados por membrana) eram suficientes para manter o erro de contagem em 20%, com uma precisão de 95 % de probabilidade. Este número é bem próximo àquele utilizado por ABBOTT & ROBSON (1984), que foi de 60 campos por membrana e é bem mais preciso do que 20 campos empregados por SYLVIA (1988) e HAMEL et al. (1990).

A quantificação do micélio externo total (MT), neste experimento, aumentou pelo menos nos tratamentos que receberam até 50mg de P/kg de solo (tomando-se

⁴Cada campo corresponde a um grid interno do dispositivo utilizado para a contagem das hifas.

como exemplo as leituras de 3 repetições dos níveis de P utilizados temos: P0 - $36,2 \pm 12,0$; P25 - $53 \pm 9,5$; P50 - $80,4 \pm 8,5$; P75 - $62,2 \pm 8,2$ metros de hifas por grama de solo).

4.2. Experimento 2

4.2.1. Coloração de hifas para a determinação do micélio externo ativo (MA)

O emprego crescente de tempos maiores para a fragmentação associados à média e alta rotação na velocidade do liquidificador, acarretaram queda na viabilidade das hifas. Uma possível explicação seria um maior atrito das estruturas com as paredes do copo do liquidificador e / ou com partículas de solo, além da perda do conteúdo celular, em virtude do seu extravasamento para o meio externo.

O volume de solução de INT indicado para a coloração das hifas, para as condições experimentais aqui empregadas, foi de 1,5ml por frasco de 10 ml.

O período de incubação mais indicado, dentre os testados, foi de 10 horas. Constatou-se que a partir de 5 horas a solução de INT começou a atuar sobre o micélio ativo. Os resultados demonstram que um mesmo período de

incubação utilizado em um ensaio não pode ser aplicado generalizadamente em outro. Em tempos maiores que 10 horas, entretanto, a solução de INT começa a atuar em hifas em estado de senescência, prejudicando a identificação das hifas realmente ativas.

A coloração diferencial não se mostrou eficiente, mesmo variando-se o tempo de incubação e a concentração da solução de azul de tripano. Era muito difícil distinguir as hifas ativas das inativas, visto que a cor azul predominava em detrimento da cor vermelha. Entretanto, a adição do óleo de amêndoa, além de permitir a passagem da luz através da membrana, realçava a cor natural das hifas (amarela). Deste modo, foi possível efetuar-se a contagem das hifas ativas e distinguí-las das inativas, sem a coloração de contraste. Entretanto, a distinção das hifas ativas (coradas de vermelho) das inativas (coradas de amarelo) é muito cansativa para o observador, deste modo, sugere-se que sejam testados outras concentrações e outros tempos de incubação para a utilização da coloração diferencial com o azul de tripano.

Constatou-se também que a distinção de hifas ativas não pôde ser efetuada adequadamente em solos extremamente argilosos (para os solos testados com teor de argila $> 40\%$), pois a cor vermelha da argila interfere na visualização das hifas ativas.

4.2.2. Determinação do comprimento das hifas

Ao contrário do que foi constatado por SYLVIA (1988), observou-se uma quantidade relativamente pequena de hifas septadas marrons, durante a contagem, tanto em solos provenientes de plantas não inoculadas (SMVA), quanto nos solos obtidos de plantas inoculados (CMVA). Assim sendo, estas foram quantificadas como inativas e incluídas como parte do micélio externo total (MT).

As médias do comprimento do micélio externo total e ativo referentes a todos os tratamentos encontram-se na tabela 3.

Na tabela 4 podem ser observadas as médias do micélio externo total, ativo e percentagem de hifas ativas de *Glomus etunicatum* em relação ao micélio total. Os valores de micélio total e ativo foram obtidos subtraindo-se os valores de SMVA dos valores de CMVA, partindo-se da premissa que não ocorrem interações entre as hifas de outros fungos e as hifas externas de *Glomus etunicatum*, como sugerido por ABBOTT & ROBSON (1984). Entretanto, constatou-se que esta premissa inicial não pode ser aplicada generalizadamente, visto que os números obtidos para o micélio externo total (tabela 4) no caso de P0 aos 30, 60 e 90 dias após a inoculação (DAP), apresen-

Tabela 3 - Comprimento total de hifas (MT) e o comprimento de de hifas ativas (MA) em função de doses de P (mg/kg de solo), em rizosfera de milho inoculado (CMVA) e não inculado (SMVA) com *Glomus etunicatum* e três épocas de colheita (DAP, dias) (médias de 4 repetições).

DAP	DOSES	MA (m/g)		MT (m/g)	
		SMVA	CMVA	SMVA	CMVA
30	0	0,45 B*	3,09 C	5,61 B	6,76 B
	25	0,14 C	2,60 C	4,19 B	7,78 B
	50	0,26 C	2,99 B	3,16 B	7,99 B
	75	0,17 C	3,10 C	2,03 B	10,00 B
60	0	1,63 A	8,39 A	6,56 A	10,72 A
	25	1,77 A	8,25 B	5,46 A	12,80 A
	50	1,64 A	8,51 A	4,25 A	12,96 A
	75	1,56 A	11,14 A	3,80 A	17,53 A
90	0	0,30 B	5,19 B	1,87 C	6,39 B
	25	0,87 B	11,63 A	1,94 B	14,25 A
	50	1,47 B	7,66 A	2,28 C	10,56 A
	75	0,74 B	8,85 B	0,84 B	11,25 B

* As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. As comparações foram efetuadas entre níveis iguais de P, nas diferentes épocas.

Tabela 4 - Valores calculados de comprimento de micélio externo total (MT) e ativo (MA) de *Glomus etunicatum* e percentagem de micélio ativo (HA) em relação ao micélio total em plantas de milho em diferentes épocas de colheita (DAP, dias) em quatro doses de P (mg de P/kg de solo).

DOSES	DAP (dias)								
	30			60			90		
	MT	MA	HA	MT	MA	HA	MT	MA	HA
	----- m/g	----- %		----- m/g	----- %		----- m/g	----- %	
0	*1,1Ac	2,8Aa	100,0	4,2Ac	6,3Aa	100,0	4,5Ac	4,4Aa	100,0
25	3,6Ab	2,5Aa	69,9	7,3Ab	5,6Aa	75,9	12,3Aa	6,4Ba	52,1
50	4,8Ab	2,7Aa	56,7	8,7Ab	5,2Ba	60,0	8,3Ab	2,8Bb	34,4
75	7,9Aa	2,8Ba	35,6	13,7Aa	6,6Ba	47,8	10,7Aa	1,1Bc	10,2

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Letra maiúscula refere-se à comparação na linha, enquanto minúscula, na coluna.

* Cada valor corresponde a média de 04 repetições.

Tabela 5. Coeficientes de correlação linear entre a percentagem de comprimento de raiz colonizada e o micélio externo total (MT) e ativo de *Glomus etunicatum* em três épocas de colheita (DAP, dias).

	DAP (dias)					
	30		60		90	
	MA	MT	MA	MT	MA	MT
(r)	0,40 ns	- 0,96 **	- 0,34 ns	0,48 ns	0,65 *	- 0,55 ns

* - Significativo com $p= 0,10$

** - Significativo com $p= 0,05$

ns - Não significativo

r - Coeficiente de correlação linear

taram valores inferiores aos do micélio ativo, demonstrando que todo o micélio externo quantificado estava 100% ativo, visto que, não foram detectadas diferenças significativas entre as médias destes tratamentos (tabela 4).

Foram feitas análises de correlação entre a percentagem de comprimento de raiz colonizada (CI%) e o micélio externo total (MT) e ativo (MA) de *Glomus etunicatum*, nas três épocas de colheita (DAP), considerando-se as médias nas quatro doses de P utilizadas (tabela 5). Os resultados não permitem qualquer tipo de generalização, entretanto pode-se inferir que provavelmente existem diferenças entre o ciclo vital da fase externa e a fase interna, de acordo com as observações de HAMEL et al. (1990).

Observou-se que aos 30, 60 e 90 DAP houve uma nítida tendência de decréscimo da percentagem de hifas ativas com o aumento da dose de P.

Constatou-se uma tendência de aumento do micélio externo total com o aumento da dose de P, aos 30 e 60 e 90 DAP, enquanto a proporção de hifas ativas mostrou tendência oposta (tabela 4). Na última época, aos 90 DAP, a diminuição da proporção de hifas ativas foi mais acentuada, talvez em virtude das plantas se encontrarem em fase de senescência.

Esta constatação é muito relevante com relação aos trabalhos que mostram que plantas micorrizadas em altas doses de P podem apresentar uma depressão de crescimento (CRUSH, 1976; BUWALDA & GOH, 1982; HALL et al., 1984; CARDOSO et al., 1986 e ANTUNES & CARDOSO, 1991).

A maioria dos autores sugere que esta depressão de crescimento possa ser devida a um dreno excessivo de carbono do endossimbionte sobre a planta hospedeira. Tal hipótese, entretanto, poderia ser contestada pela verificação de que normalmente as plantas com altos níveis de P apresentavam acentuada diminuição na colonização interna das raízes (ANTUNES & CARDOSO, 1991), o que foi interpretado como diminuição da biomassa. Isto, por sua vez tornaria muito improvável a hipótese do dreno de C. Para estes autores o crescimento depressivo verificado em plantas cítricas inoculadas com *Glomus etunicatum*, pode ter sido decorrente da concentração excessiva de P e K na parte aérea das plantas que, atuando conjuntamente, poderiam ter diminuído o metabolismo de carboidratos na planta hospedeira.

Em analogia a este raciocínio, podemos inferir que nos experimentos de outros autores (CRUSH, 1976; BUWALDA & GOH, 1982; HALL et al., 1984; CARDOSO et al., 1986 e ANTUNES & CARDOSO, 1991) que revelaram depressão de crescimento, apesar de não ter sido verificada a

atividade de hifas externas, a diminuição na colonização interna era acompanhada pelo aumento do micélio externo total e a diminuição de sua atividade em consonância com o aumento dos teores de P no solo. Um acentuado dreno de C pode ser perfeitamente justificado por um grande desenvolvimento do micélio extrarradical, mesmo se a colonização interna da raiz for pequena. O fato desse micélio ser menos ativo com o aumento do teor de P, vem ainda reforçar a hipótese de que o fungo MVA esteja vivendo parasiticamente em seu hospedeiro, sem lhe proporcionar o retorno em nutrientes que normalmente ocorre, quando os teores de P no solo são baixos.

PENG et al. (1993) efetuaram um estudo de partição de C em citros com vários níveis de P e constataram haver de fato um excessivo dreno de C (respiração) pela parte subterrânea, efetuado para a manutenção do tecido fúngico nas raízes e crescimento e manutenção do micélio extrarradical, o que indiretamente é corroborado pelos dados sobre o micélio extramatrical do presente trabalho.

4.2.3. Porcentagem de colonização radicular

As médias das percentagens de colonização micorrízica das raízes (CI%) de *Zea mays* var. Piranão em 3 épocas de colheita e com 4 doses de P (0, 25, 50 e 75 mg de

P/kg de solo) podem ser visualizadas na tabela 6.

Ficou evidente o efeito negativo do aumento da concentração de P na colonização micorrízica no início da formação da simbiose, aos 30 DAP.

Este efeito inibitório da alta concentração de P na formação da micorriza, já foi evidenciado por diversos autores (LAMBAIS & CARDOSO, 1988; LAMBAIS, 1987; LAMBERT et al., 1979 e MENGE et al., 1978).

Esta sensibilidade de *Glomus etunicatum* a elevação do P disponível já foi observada em citros por CARDOSO et al. (1986) e ANTUNES & CARDOSO (1991) em feijão por SILVEIRA & CARDOSO (1987).

Fica difícil definir níveis críticos de P para as diversas combinações fungo MVA - planta hospedeira, em virtude da imensa variabilidade genética que existe entre estas diferentes combinações, e de acordo com as observações de LAMBAIS & CARDOSO (1988), devem existir níveis ótimos para os fatores edáficos, em função dos quais, pode-se obter a máxima expressão das características genotípicas do fungo MVA, evidenciando as suas adaptações em relação a estes fatores.

Tabela 6 - Percentagem do comprimento de raiz colonizada de *Zea mays* var. Piranão inoculado com *Glomus etunicatum*, com adição de doses de P (mg de P/kg de solo) e em diferentes épocas de plantio (DAP, dias).

		DAP (dias)		
		30	60 %	90
DOSES				
<i>Glomus etunicatum</i>	0	28,17Ba	55,39Ab	47,34Aa
	25	26,48Ba	54,38Ab	45,88Aa
	50	20,14Cb	62,26Aa	46,63Ba
	75	12,89Bc	58,81Aa	41,49Ab

4.2.4. Massa seca da parte aérea (MSPA)

As médias de produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) por *Zea mays* L. var. Piranão podem ser vistas na tabela 7.

De acordo com a tabela 8, nota-se que ocorreu um incremento acima de 200% na MSPA, na 2ª e 3ª épocas de colheita, de plantas inoculadas, em relação às plantas não inoculadas, no tratamento P0. Resultados semelhantes foram obtidos por SILVEIRA & CARDOSO (1987) com *Phaseolus vulgaris*.

A inoculação nos solos com adição de P não foi tão benéfica quanto nos solos sem adição de P, havendo normalmente incrementos de produção menores do que para P0. Na 1ª época houve até decremento na produção, mostrando que o fungo estava competindo com a planta por nutrientes e metabólitos, comprovando a hipótese, exposta no item anterior, de que o fungo estava realmente atuando como parasita; esta tendência, entretanto foi superada com o passar do tempo neste presente experimento.

Tabela 7 - Matéria seca da parte aérea (MSPA) de *Zea mays*, em diferentes doses de P (mg de P/kg de solo), inoculado (CMVA) e não inoculado (SMVA) com *Glomus etunicatum* em diferentes épocas de colheita (DAP, dias).

TRATAM.	DOSES	DAP (dias)		
		30	60	90
SMVA	0	0,82Aa*	1,70Aa	3,48Aa
	25	1,40Ac	5,42Ab	9,04Aa
	50	1,55Ac	8,95Ab	13,82Aa
	75	1,80Ac	9,77Ab	12,30Aa
CMVA	0	0,85Ac	5,20Bb	10,82Ba
	25	1,07Ac	9,65Bb	17,44Ba
	50	1,75Ac	9,60Ab	13,88Aa
	75	1,80Ac	11,05Ab	15,84Aa

* As letras minúsculas são usadas para comparar as médias nas linhas e as maiúscula na coluna (entre níveis iguais de P).

Letras iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5%.

Os valores representam a média de quatro repetições.

Tabela 8 - Variação percentual média (MS%) da produção de matéria seca da parte aérea em *Zea mays* var. Piranão, inoculado com *Glomus etunicatum* em relação ao controle não inoculado de cada tratamento em função de épocas de colheitas (DAP, dias) e doses de P (mg de P/kg de solo).

DOSES	DAP (dias)		
	30	60	90
	----- % -----		
0	3,66	205,88	210,92
25	-23,57	78,04	59,92
50	12,90	7,26	0,43
75	0,00	13,33	30,16

$$MS\% = \frac{MSPA_{com fungo} - MSPA_{controle}}{MSPA_{controle}}$$

4.2.5. Absorção de nutrientes na parte aérea da planta

Os resultados obtidos permitem afirmar que a absorção dos vários nutrientes foi afetada diferenciadamente pela presença de *Glomus etunicatum*, de acordo com a aplicação ou não de P no solo em função das épocas de colheita (tabela 9).

Como existem evidências de efeito de diluição para a maioria dos nutrientes estudados, determinou-se o índice de eficiência na utilização dos nutrientes (SIDDIQI & GLASS, 1981), como ferramenta mais adequada, para auxiliar na interpretação e discussão dos resultados (tabela 10).

Observando-se a tabela 10, constata-se que a micorrização geralmente foi eficiente para todos os nutrientes absorvidos, apenas nos níveis P0 e P25, em todas as épocas de colheitas avaliadas. Os teores de K e Cu quando comparados a literatura (MALAVOLTA et al., 1989) foram considerados altos, ao passo que os teores de P, Ca e Zn foram considerados baixos e os demais adequados.

Foram efetuadas análises de correlação entre os teores e quantidades totais de P absorvidos pela parte aérea da planta e o micélio externo total (MT) e ativo (MA) de *Glomus etunicatum*. Os resultados estão na tabela 11.

Em função dos resultados obtidos na tabela 11, podemos inferir que o micélio externo total é prova-

velmente o parâmetro mais adequado para a avaliação da absorção e translocação de P através das hifas externas de fungos MVA. Mesmo considerando que a absorção de P requer hifas metabolicamente ativas (BEVEER & BURNS, 1980), a sua translocação através de zonas inativas do micélio extramatrical ainda não foi avaliada.

Tabela 9 - Concentração absorvidas de nutrientes por *Zea mays* var. Piranão, inoculado (CMVA) não inoculado (SMVA) por *Glomus etunicatum* em doses de P (mg/kg) e em diferentes épocas de colheita (dias após o plantio, DAP), (os valores são médias de quatro repetições).

Fungo	Doses	Épocas	Concentração		
			N%	P%	K%
smva	0	30	1,9A*	0,07A	5,85A
	25		1,61A	0,08A	6,32A
	50		1,28A	0,11A	6,11A
	75		0,81A	0,13A	6,38A
cmva	0	30	3,23B	0,09A	6,29A
	25		1,72B	0,14A	7,60A
	50		2,15B	0,15A	7,00A
	75		1,84A	0,14A	6,69A
smva	0	60	1,39A	0,05B	6,07A
	25		1,01A	0,06B	5,90A
	50		0,5A	0,07B	3,78B
	75		1,3A	0,08B	3,56B
cmva	0	60	1,6AB	0,08A	5,35A
	25		1,3AB	0,12A	3,61B
	50		0,70B	0,12B	3,17B
	75		1,2AB	0,13A	3,52B
smva	0	90	2,65A	0,06B	5,91A
	25		1,10A	0,05B	3,48B
	50		1,0A	0,07B	2,33C
	75		1,2A	0,08B	2,02C
cmva	0	90	2,17A	0,08A	3,99B
	25		0,53A	0,08B	2,19C
	50		0,78A	0,07C	2,21C
	75		0,58B	0,09B	2,31C

* As letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade, comparações efetuadas nas colunas, entre níveis iguais de P, nas diferentes épocas.

Tabela 9 - Continuação

Fungo	Doses	Épocas	Concentração		
			Ca%	Mg%	S%
smva	0	30	0,47A*	0,40B	0,15A
	25		0,49AB	0,33AB	0,15A
	50		0,53A	0,34A	0,13A
	75		0,59A	0,37A	0,13A
cmva	0	30	0,53A	0,47A	0,15A
	25		0,54A	0,40A	0,13A
	50		0,62A	0,40A	0,12A
	75		0,69A	0,53A	0,14A
smva	0	60	0,58A	0,63A	0,16A
	25		0,59A	0,55A	0,11AB
	50		0,46AB	0,32A	0,05B
	75		0,42B	0,27A	0,04B
cmva	0	60	0,47AB	0,50A	0,17A
	25		0,35B	0,32A	0,07A
	50		0,42B	0,34A	0,09AB
	75		0,44B	0,39AB	0,07B
smva	0	90	0,57A	0,59AB	0,20A
	25		0,38B	0,31B	0,06B
	50		0,35B	0,26A	0,12B
	75		0,27C	0,22A	0,04B
cmva	0	90	0,33B	0,36A	0,11A
	25		0,27B	0,31A	0,06A
	50		0,28B	0,28A	0,06B
	75		0,35B	0,32B	5,03A

* As letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade, comparações efetuadas nas colunas, entre níveis iguais de P, nas diferentes épocas.

Tabela 9 - Continuação

Fungo	Doses	Épocas	Concentração			
			Cu (ppm)	Zn (ppm)	Fe (ppm)	Mn (ppm)
smva	0	30	43,0AB *	0,08B	0,08B	116,2B
	25		50,7A	0,09AB	0,09AB	110,1B
	50		39,5A	0,01A	0,10A	122,0A
	75		43,7A	0,13A	0,13A	131,0A
cmva	0	30	55,0A	0,10A	0,10A	131,7A
	25		58,0A	0,14A	0,14A	114,2A
	50		51,5A	0,15A	0,15A	131,2A
	75		50,5A	0,13A	0,13A	128,5A
smva	0	60	22,0B	0,05AB	0,05AB	171,7A
	25		15,5B	0,06A	0,06A	168,2A
	50		6,2B	0,08AB	0,08AB	125,7A
	75		10,5B	0,08AB	0,08AB	121,5A
cmva	0	60	15,7B	0,08A	0,08A	132,0A
	25		11,2B	0,12A	0,12A	119,2A
	50		11,7B	0,12A	0,12A	120,7A
	75		13,7B	0,12A	0,12A	142,0A
smva	0	90	70,5A	0,06A	0,06A	140,5AB
	25		27,0AB	0,05B	0,05B	104,8B
	50		16,5AB	0,07B	0,07B	110,5A
	75		17,0AB	0,08B	0,08B	102,0A
cmva	0	90	29,2AB	0,08A	0,08A	106,5A
	25		41,2AB	0,08A	0,08A	104,4A
	50		22,5AB	0,08A	0,08A	111,2A
	75		29,5AB	0,08A	0,09A	120,0A

* As letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade, comparações efetuadas nas colunas, entre níveis iguais, nas diferentes épocas.

Tabela 9 - Quantidades totais absorvidas de nutrientes por *Zea mays* var. Piranão, inoculado (CMVA) e não inoculado (SMVA) por *Glomus etunicatum*, doses de P (mg/kg) e em diferentes épocas de colheita (dias após o plantio, DAP), (os valores são médias de quatro repetições).

Fungo	Doses	Épocas	Quantidades totais		
			N (mg)	P (mg)	K (mg)
smva	0	30	1,50A*	0,17A	4,81B
	25		2,20A	0,12B	8,85B
	50		1,90A	0,15B	9,47B
	75		1,40A	0,64A	11,50B
cmva	0	30	2,70B	0,08B	5,34C
	25		1,80B	0,14B	8,14B
	50		3,80A	0,26B	12,3B
	75		3,30A	0,26B	12,0B
smva	0	60	2,30A	0,09A	10,30AB
	25		5,50A	0,34B	31,90A
	50		4,40A	0,61AB	33,80A
	75		13,10A	0,79A	34,70A
cmva	0	60	8,10B	0,40AB	27,80B
	25		12,4AB	1,10AB	34,80A
	50		6,70A	1,10A	30,40A
	75		13,10A	1,30A	38,90A
smva	0	90	9,21A	0,19A	20,57A
	25		9,98A	1,40A	31,49A
	50		3,82A	1,00A	32,20A
	75		15,30A	1,27A	24,86A
cmva	0	90	23,50A	0,92A	43,25A
	25		7,70A	1,48A	31,62A
	50		10,8A	1,12A	30,67A
	75		9,20A	1,39A	36,98A

* As letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey 5% de probabilidade, comparações efetuadas nas colunas, entre níveis iguais de P, nas diferentes épocas.

Tabela 9 - Continuação

Fungo	Doses	Épocas	Quantidades totais		
			Ca (mg)	Mg (mg)	S (mg)
smva	0	30	0,38A*	0,37B	0,12A
	25		0,69A	0,47B	0,21A
	50		0,82A	0,53B	0,21A
	75		1,06B	0,67B	0,23A
cmva	0	30	0,45A	0,40B	0,13B
	25		0,58A	0,44C	0,14B
	50		1,08A	0,69B	0,21A
	75		1,24A	0,95B	0,25B
smva	0	60	0,99A	1,07AB	0,28A
	25		3,20A	2,97A	0,57A
	50		4,12A	2,84A	0,47A
	75		4,09B	2,64A	0,44A
cmva	0	60	2,44A	2,63A	0,92A
	25		3,38A	3,09B	0,65A
	50		4,03A	3,31A	0,85A
	75		4,86A	4,36A	0,76A
smva	0	90	1,98A	2,04A	0,69A
	25		3,44A	2,85A	0,57A
	50		4,84A	3,60A	0,52A
	75		3,32A	2,67A	0,49A
cmva	0	90	3,57A	3,86A	1,19A
	25		4,60A	5,48A	1,02A
	50		3,89A	3,99A	0,88A
	75		5,60A	5,30A	1,07A

* As letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade, comparações efetuadas nas colunas, entre níveis iguais de P, nas diferentes épocas.

Tabela 9 - Continuação

Fungo	Doses	Épocas	Quantidades totais			
			Cu (mg)	Zn (mg)	Fe (mg)	Mn (mg)
smva	0	30	3,53A*	0,01A	32,90A	116,20B
	25		7,00A	0,01A	41,60B	110,10B
	50		6,12A	0,02A	47,30B	122,00A
	75		7,87A	0,02A	45,90B	131,00A
cmva	0	30	4,67A	0,01B	35,70B	131,70A
	25		6,20B	0,01B	21,20C	114,20A
	50		9,01A	0,03A	51,60B	131,20A
	75		9,10B	0,02B	37,90B	128,50A
smva	0	60	3,74A	0,01A	27,50A	171,70A
	25		8,20A	0,03A	80,20AB	168,20A
	50		5,60A	0,07A	81,20AB	125,70A
	75		10,20A	0,08A	51,90B	121,50A
cmva	0	60	8,20AB	0,04AB	47,40AB	132,00A
	25		10,90B	0,15B	85,20B	119,20A
	50		11,30A	0,11A	73,10AB	120,70A
	75		15,20B	0,14A	83,40AB	142,00A
smva	0	90	24,50A	0,02A	71,10A	140,50AB
	25		24,40A	0,04A	115,20A	104,80B
	50		22,80A	0,10A	134,00A	110,50A
	75		20,90A	0,10A	99,63A	102,00A
cmva	0	90	31,65A	0,09A	94,60A	106,50A
	25		59,60A	0,12A	149,80A	104,20A
	50		31,20A	0,11A	116,60A	111,20A
	75		47,20A	0,14A	148,10A	120,00A

* As letras maiúsculas iguais não diferem estatisticamente segundo o teste de Tukey a 5% probabilidade, comparações efetuadas nas colunas, entre níveis iguais de P, nas diferentes épocas.

Tabela 10 - Índice de eficiência (IE) na utilização de nutrientes pelo milho não micorrizado (SMVA) e micorrizado (CMVA) com *Glomus etunicatum*, com quatro níveis de P (DP, ppm) e três épocas de colheita (DAP, dias)¹.

DAP	DP	IE _N	IE _P	IE _K	IE _{Ca}	IE _{Mg}	IE _S	IE _{Zn}	IE _{Cu}	IE _{Fe}	IE _{Mn}
----- g ² MS/mg -----											
SMVA 30	0	0,4	3,9	0,1	1,8	1,8	5,6	67,2	0,2	0,0	0,1
	25	0,9	16,3	0,2	2,8	4,2	9,3	196,0	0,3	0,1	0,1
	50	1,3	16,0	0,2	2,7	4,5	11,4	120,1	0,4	0,1	0,1
	75	2,3	5,1	0,3	3,1	4,8	14,1	162,0	0,4	0,1	0,1
CMVA 30	0	0,3	9,0	0,1	1,6	1,8	0,6	72,2	0,2	0,0	0,1
	25	0,6	8,2	0,1	2,0	2,6	1,1	114,5	0,2	0,0	0,1
	50	0,8	11,8	0,2	2,8	4,4	3,5	102,1	0,3	0,0	0,1
	75	1,0	12,5	0,3	2,6	3,4	3,0	162,0	0,4	0,1	0,1
SMVA 60	0	1,3	32,1	0,3	2,9	2,7	10,3	289,0	0,8	0,1	0,1
	25	5,3	86,4	0,9	9,2	9,9	51,5	979,2	3,5	0,4	0,3
	50	18,2	25,6	2,4	19,4	28,2	170,4	1144,3	14,4	1,0	0,7
	75	7,3	120,8	2,7	23,3	36,2	216,9	1193,2	9,0	1,8	0,7
CMVA 60	0	3,3	67,6	1,0	11,1	10,3	30,0	676,0	3,3	0,6	0,4
	25	7,5	84,7	2,7	27,5	30,1	143,3	620,8	8,5	1,1	0,8
	50	13,7	83,8	3,0	22,9	27,8	108,4	837,8	8,1	1,3	0,8
	75	1,0	93,9	3,1	25,1	28,0	160,7	872,2	8,0	1,5	0,8
SMVA 90	0	1,3	63,7	0,6	6,1	5,9	17,5	605,5	0,5	0,2	0,2
	25	8,2	58,4	2,6	33,8	28,7	143,4	2043,0	3,3	0,7	0,9
	50	48,7	200,0	6,0	40,0	53,2	376,3	1909,9	8,4	1,4	1,2
	75	9,9	120,0	6,0	29,0	57,0	309,0	1513,0	7,2	1,5	1,2
CMVA 90	0	5,0	127,2	3,0	33,0	30,0	170,0	1300,8	3,7	1,2	1,0
	25	40,0	205,5	9,6	66,1	55,5	534,0	2534,0	5,1	2,0	2,0
	50	19,0	172,0	6,2	49,5	48,5	533,6	1751,4	6,2	1,6	1,2
	75	27,0	180,5	7,0	45,0	47,0	512,0	1792,0	5,3	1,7	1,3

¹/IE calculado de acordo com SIDDIQI & GLASS (1981).

Tabela 11 - Coeficientes de correlação entre os teores e quantidades totais de P absorvido pela parte aérea de milho micorrizado e o micélio externo total (MT) e ativo (MA) de *Glomus etunicatum*, em diferentes doses de P (mg/kg de solo) e em diferentes épocas de colheita (DAP, dias).

DAP (dias)							
30			60		90		
MA		MT	MA		MT	MA	MT
(r)							
P%	- 0,43ns	0,73ns	- 0,20ns	0,85*	- 0,31ns	0,23ns	
P(mg)	0,16ns	0,88*	- 0,24ns	0,86*	0,03ns	0,99**	

** Significativo p= 0,05

* Significativo p= 0,10

ns Não significativo

5. CONCLUSÕES

1- A modificação dos métodos de extração descritos por SCHUBERT et al. (1987) e SYLVIA (1988) permitiu adequada quantificação do micélio externo total de *Glomus etunicatum* e de sua atividade.

2- Os métodos de extração testados não foram promissores quando aplicados em solos com teores elevados de argila.

3- A distinção de hifas ativas e inativas não foi satisfatória quando se utilizou o azul de tripano para coloração de contraste.

4- As doses de P relativamente baixas utilizadas no experimento não permitiram comprovar a ligação entre o crescimento depressivo de plantas micorrizadas em altas doses de P e o desenvolvimento do micélio externo do fungo MVA.

5- Ocorre aumento do micélio extramatrical total e comitantemente diminuição de sua atividade, à medida em que se aumentam as doses de P.

6- A presença de *G. etunicatum* acarretou o maior crescimento de plantas e maior absorção da maioria dos nutrientes vegetais, especialmente do fósforo, em milho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT,L.K. Comparative anatomy of vesicular-arbuscular mycorrhizas formed on subterranean clover. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, 30:485-99,1982.

ABBOTT,L.K. & ROBSON,A.D. A quantitative study of the spores and anatomy of mycorrhizas formed by the species of *Glomus*, with reference to its taxonommy. **Australian Journal of Botany**, Melborne, 27:362-7,1979.

ABBOTT,L.K. & ROBSON,A.D. The effect of soil pH on the formation of VA mycorrhizas by two species of *Glomus*. **Autralian Journal of Soil Research**, Melborne, 23:253-261, 1985a.

ABBOTT,L.K. & ROBSON,A.D. Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist** 99: 245-55. 1985b.

- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D.; G. De BOER, The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **New Phytologist**, London, 97:437-46, 1984.
- AHMADSAD, I. A method for the quantitative determination of the extraradical mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Angewandte Botanik**, Goettingen, 58:359-64, 1984.
- ALDWELL, F.E.B. & HALL, I.R. Monitoring spread of *Glomus mossae* through soil infested with *Acaulospora laevis* using serological and morphological techniques. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 87:131-34, 1986.
- ALEXANDER, T.; MEIR, R.; TOTH, R.; WEBER, H.C. Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. **New Phytologist**, London, 110:363-70, 1988.

- AMES, R.N.; REID, C.P.P.; INGHAN, E.R. Rhizosphere bacterial population to root colonization by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, London, 96:555-63, 1984.
- ANTUNES, V. & CARDOSO, E.J.B.N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. **Plant and Soil**, The Hague, 131:11-9, 1991.
- AZCON, R. Seletive interaction between free-living rhizosphere bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 21:639-44, 1989.
- AZCON, R.; BAREA, J.M.; HAYMAN, D.S. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 8:135-8, 1976.
- AZCON, R.; RUBIO, R.; BAREA, J.M. Seletive interaction between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* and their effects on growth, N₂-fixation (¹⁵N) and nutrition of *Medicago sativa* L. **New Phytologist**, Cambridge, 117:399-404, 1990.

- BAREA, J.M. & AZCON-AGUILAR, C. Interaction between mycorrhizal fungi and soil microorganism. In: GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; TROUVELOT, A., ed. **Les mycorrhizes: biologie et utilization.** New York, Academic Press, 1982a. p.1-54.
- BAREA, J.M. & AZCON-AGUILAR, C. Production of plant growth-regulation substances by the mycorrhizal fungus *Glomus mossae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 43:810-3, 1982b.
- BÉCARD, G. & FORTIN, J.A. Early events of vesicular mycorrhizae formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, London, 108:211-8, 1988.
- BÉCARD, G. & PICHE, Y. Fungal growth stimulation by CO₂ and roots exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal simbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 55:2320-5, 1989a.
- BÉCARD, G. & PICHE, Y. News aspects on the acquisition of biotrophic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **New Phytologist**, London, 112:77-83, 1989b.

BEEVER, R.E. & BURNS, D.J.W. Phosphorus uptake storage and utilization by fungi. **Advances in Botanical Research**, London, 8:127-219, 1980.

BETHLENFALVAY, G.J. & AMES, R.N. Comparison of two methods for quantifying extraradical mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, 51:834-37, 1987.

BETHLENFALVAY, G.J. & PACOVSY, R.S. Lights effects in mycorrhizal soybeans. **Plant Physiology**, Lancaster, 73:969-72, 1983b.

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**, St. Paul, 72:889-93, 1983a

BETHLENFALVAY, G.J.; BROWN, M.S.; PACOVSKY, R.S.

Relationships between host and endophyte development in mycorrhizal soybean. **New Phytologist**, London, 90:537-43, 1982b

BEVEGE, D.T. & BOWEN, G.D. Endogone strain and host plant differences in development of vesicular-arbuscular mycorrhizas. In: SANDERS, F.A.; MOSSE, B.; TINKER, P.B., ed. **Endomycorrhizas**. London, Academic Press, 1975. p.297-312.

BIELESKI, R.L. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, 24:225-52, 1973.

BIRCH, C.P.D. Development of VA mycorrhizal infection in seedlings in semi-natural grassland turf. In: **Physiological and genetical aspects of mycorrhizae**, 1., Paris, 1986. proceedings, edited by V. GIANINAZZI-PEARSON & GIANINAZZI, S. Paris, INRA, 1986. p.233-7.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA. In: POWEEL, C.L. & BAGYARAJ, D.J., ed. **VA mycorrhiza**. Boca Raton, CRC Press, 1984. p.5-33.

BONFANTE-FASOLO, P. & GRIPPIOLO, R. Ultrastructural and cytochemical changes in the wall of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus during symbiosis. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 60:2303-13, 1982.

BURGRAAF, A.P.J. & BERINGER, J.E. Absence of nuclear DNA synthesis in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi during in vitro development. **New Phytologist**, Cambridge, 111:25-33, 1989.

BUWALDA, J.G. & GOH, K.M. Host-fungus competition for carbon as cause of growth depressions in vesicular-arbuscular mycorrhizal regrass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 14:103-6, 1982.

CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e de fosfato de rocha nas culturas de soja e feijão. Piracicaba, 1984. 220p. (Livre-Docência Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de micorriza vesículo-arbuscular e fosfato de rocha na simbiose soja-*Rhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 9:125-30, 1985.

CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.B.da;

OLIVEIRA, M.H.A. de. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbuscular em porta-enxertos de citros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 10:25-30, 1986.

CARLING,D.E. & BROWN,M.F. Anatomy and physiology of vesicular-arbuscular and nonmycorrhizal roots. *Phytopatology*, St. Paul, 72:1108-14, 1982.

CHIARIELLO,N.; HICKMAN,J.C.; MOONEY,H.A. Endomycorrhizal role for interspecific transfer of phosphorus in a community of annual plants. *Science*, Washington, 217:941-43, 1982.

COCHRAN,W.G. *Técnicas de amostragem*. 2. ed. São Paulo, Fundação e Cultura, 1966. Cap.4, p.105-126.

COOPER,K.M. Growth responses to the formation of endotrophic mycorrhizas in *Solanum leptospermum* and New Zealand ferns. In: SANDERS,F.E.; MOSSE,B.; TINKER,P.B., ed., *Endomycorrhizas*. London, Academic Press, 1975. p.392-407.

COX,G. & SANDERS,F.E. Ultrastructure of host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist*, London, 73:910-2, 1974.

COX,G.; SANDERS,F.E.; TINKER,P.B.; WILD,J.A.

Ultrastructural evidence relating to host-endophyte transfer in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: SANDERS,F.E.; MOSSE,B.; TINKER,P.B. ed.

Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p.297-312.

COX,G. & TINKER,P.B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. I. The arbuscule and phosphorus transfer: a quantitative ultrastructural study. **New Phytologist**, London, 77:371-78, 1976.

COX,G.; MORAN,K.J.; SANDERS,F.E.; NOCKOLDS,C.; TINKER,P.B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas. III. polyphosphate granules and phosphorus translocation. **New Phytologist**, London, 84:649-59, 1980.

CRUSH,J.R. The effect of *Rhizophagus tenuis* mycorrhizas on regrass, cockfoot and sweet vernal. **New Phytologist**, London, 72:965-73, 1973.

CRUSH, J.R. Endomycorrhizas and legume growth in some soils of the Mackenzie Basin, Canterbury, New Zealand. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, 19:473-6, 1976.

DIEDERICHS, C. Influence of light on efficacy of vesicular-arbuscular mycorrhiza in tropical and subtropical plants. II. Effect of light intensity under growth chamber conditions. **Angewandte Botanik**, Goettingen, 57:43-53, 1983a.

DIEDERICHS, C. Influence of light on efficacy of vesicular-arbuscular mycorrhiza in tropical and subtropical plants. III. influence of daylength. **Angewandte Botanik**, Goettingen, 57:55-67, 1983b.

DIXON, R.A. & LAMB, C.J. Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, 41:339-67, 1990.

DOUDS, D.D.; JOHNSON, C.R.; KOCH, K.E. Carbon cost of the fungal symbiont relative to net leaf P accumulation in a split-root VA mycorrhizal symbiosis. **Plant Physiology**, Rockville, 86:491-6, 1988.

DUC,G.; TROVELOT,A.; GIANINAZZI-PEARSON,V.; GIANINAZZI,S.

First report of non-mycorrhizal plant mutant (myc⁻)
obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and (*Vicia faba* L.).
Plant Science, Limerick, 60:215-22, 1989.

FAQUIN,V.; MALAVOLTA,E.; MURAOKA,T. Efeito da micorriza
vesículo-arbuscular na cinética de absorção do fósforo
pela soja. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS 2.,
São Paulo, 1987. *Programas e Resumos*. São Paulo - SP,
1987. p.23.

FERREIRA,P.V. *Estatística experimental aplicada a
agronomia*. Maceió, EDUFAL, 1991. 437p.

FERNANDES,A.B.; SIQUEIRA,J.O.; MENEZES.M.A.L.;

GUEDES,G.A.A. Efeito diferenciado do fósforo sobre o
estabelecimento e efetividade da simbiose
endomycorrízica em milho e soja. *Revista Brasileira da
Ciência do Solo*, Campinas, 11:101-08, 1987.

FITTER,A.H. Functioning of vesicular-arbuscular
mycorrhizae. *New Phytologist*, London, 92:519-26, 1985.

- FITTER, A.H. Effect of benomyl on leaf phosphorus concentration in alpine grasslands: A test of mycorrhizal benefit. *New Phytologist*, London, 103:767-76, 1986.
- FRANCIS, R. & READ, D.J. Direct transfer of carbon between plants connected by vesicular-arbuscular mycelium. *Nature*, London, 307:53-6, 1984.
- FRANCIS, R.; FINLAY, R.D.; READ, D.J. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in natural vegetation systems. IV. Transfer of nutrients in inter- and intra-specific combinations of host plants. *New Phytologist*, London, 102:103-111, 1986.
- FREIRE, J.C.; RIBEIRO, M.A.V.; BAHIA, V.G.; LOPES, A.S.; AGUINO, L.H. de. Resposta do milho cultivado em casa de vegetação a níveis de água em solos da região de Lavras (MG). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 4:5-8, 1980.
- GARRIOCK, M.L.; PETERSON, R.L.; ACKERLEY, C.A. Early stages in colonization of *Allium porrum* (leek) roots by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus vesiforme*. *New Phytologist*, London, 112:85-92, 1989.

GERDEMAN, J.W. The effect of mycorrhiza on the growth of maize. *Micologia*, New York, 56:342-349, 1964.

GERDEMANN, J.W. Vesicular-arbuscular mycorrhiza and plant growth. *Annual review of Phytopathology*, Palo Alto, 6:397-418, 1968.

GIANINAZZI, S.; DEXHEIMER, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; MARX, C. Role of the host-arbuscule interface in the VA mycorrhizal: Ultrascytological studies of process involved in phosphate and carbohydrate exchange. *Plant and Soil*, The Hague, 71:211-5, 1983.

GIANINAZZI-PEARSON, V. Protein expression in vesicular-arbuscular endomycorrhizas. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MYCORRIZAS, 4., Mendes, 1991. *Programas e Resumos*. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1991. p.33-46.

- GIANINAZZI-PEARSON,V. & GIANINAZZI,S. Morphological integration and functional compatibility between symbionts in vesicular-arbuscular endomycorrhizal associations. In: SCANNERINI,S.; SMITH,D.D.; BONFANTE-FASOLO,P.; GIANINAZZI-PEARSON,V. ed., **Cell to cell in plant, animal and microbial symbiosis**. Berlin, Springer-Verlag, 1988. p.219-35.
- GIANINAZZI-PEARSON,V.; FARDEAU,J.; ASIMI,S.; GIANINAZZI,S. Source of additional phosphorus absorbed from soil by vesicular-arbuscular soybeans. **Physiologie Vegetale**, Paris, 19:33-43, 1981.
- GIANINAZZI-PEARSON,V.; TROUVELOT;A.; MORANDI,D.; MAROCKE,R. Ecological variations in endomycorrhizas associated with wild raspberry populations in the Vosges region. **Acta Oecologia**, Paris, 1:111-19, 1980.
- GIOVANETTE,M. & MOSSE,B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, London, 84:489-500, 1980.

- GRAHAM, J.H.; LEORNAD, R.T. & MENGE, J.A. A membrane mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. **Plant Physiology**, Maryland, 68:548-552, 1981.
- GRAHAM, J.H.; LINDERMAN, R.G.; MENGE, J.A. Development external hyphae by different isolates of mycorrhizal *Glomus spp* in realtion to root colonization and graowth of troyer citrange. **New Phytologist**, London, 91:183-9, 1982.
- GRAHAM, J.M. & SYVERTSEN, J.P. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the hydraulic condutivity of roots of two citrus rootstocks. **New Phytologist**, London, 97:277-284, 1984.
- GRAHAM, J.H. & SYVERTSEN, J.P. Vesicular-arbuscular mycorrhizas increase chrloride concentration in citrus seedlings. **New Phytologist**, Cambridge, 113:29-36, 1989.
- GRAHAM, J.H.; TIMMER, L.W.; FARDELMANN, D. Toxicity of fungicidal copper in soil to citrus seedlings and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Phytopathology**, St. Paul, 76:66-70, 1986.

- GRAY, L.E. & GERDEMANN, J.W. Uptake of sulphur³⁵ by vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Plant and Soil*, The Hague, 39:687-9, 1973.
- HAJEK, J. *Sampling from a finite population*. New York, Marcel Dekker. 1981. 257p.
- HALL, I.R. Species and mycorrhizal infection of New Zealand Endogonaceae. *Transactions British Mycology Society*, London, 68:341-56, 1977.
- HALL, I.R.; JOHNSTONE, P.D.; DOLBY, R. Interactions between endomycorrhizas and soil nitrogen and phosphorus on the growth of ryegrass. *New Phytologist*, London, 97:447-53, 1984.
- HALVERSON, L.J. & STACEY, G. Signal exchange in plant-microorganism interactions. *Microbiological Reviews*, Washington, 50:193-225, 1986.
- HARLEY, J.L. & SMITH, S.E. *Mycorrhizal symbiosis*. London, Academic Press, 1983. 483p.

- HARDIE, K. & LEYTON, L. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on growth and water relations of red clover. I. In phosphate deficient soil. **New Phytologist**, Cambridge, **89**:599-608, 1981.
- HAYMAN, D.S. Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Phytopathology**, St. Paul, **72**:1119-25, 1982.
- HAYMAN, D.S.; JOHNSON, A.M.; RUDDLESSDIN, I. The influence of phosphate and crop species on *Endogone* spores and vesicular-arbuscular under field conditions. **Plant and Soil**, The Hague, **43**:489-95, 1975.
- HEAP, A.J. & NEWMAN, E.I. The influence of vesicular-arbuscular mycorrhizas on phosphorus transfer between plants. **New Phytologist**, London, **85**:173-9, 1980.
- HECKMAN, J.R. & ANGLE, J.S. Variation between soybean cultivars in vesicular-arbuscular mycorrhiza fungi colonization. **Agronomy Journal**, Madison, **79**:428-30, 1987.

HEPPER,C.M. Germination and growth of *Glomus caledonius* spores: the effects of inhibitors and nutrients. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 11:269-77, 1979.

HEPPER,C.M. Vam spore germination and hyphal growth in vitro - prospects for axenic culture. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 7., Gainesville, 1987. **Mycorrhizae decade: pratical applications and research priorities**; proceedings edited by D.M. SYLVIA, and others. Gainesville, University of Florida, 1987. p.172-74.

HEPPER,C.M. & SMITH,G.A. Observations on the germination of Endogone spores. **Transactions of British Mycological Society**, New York, 66:189-94, 1976.

HIRREL,M.C. & GERDEMANN,J.W. Enhanced carbon trasfer between onoins infected with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, London, 83:731-38, 1979.

JANOS,D.P. Mycorrhizae influence tropical sucession. **Biotrophica**, St. Louis, 12:56-64, 1980. (Suppl.)

JONHSON, L.F. & CURL, E.A. **Methods for research on the ecology of soil-born plant pathogens.** Minneapolis, ed. Burgess, 1972. p.247.

KJOLLER, A. & STRUWE, S. Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil. **Oikos**, Copenhagen, 39:391-422, 1982.

KOUGH, J.L. & GIANINAZZI-Pearson, V. Physiological aspects of VA mycorrhizal hyphae in root tissue and soil. In: GIANINAZZI-Pearson, V & GIANINAZZI, S. ed., **Physiological and genetical aspects of mycorrhizae.** Paris, INRA, 1986. p.223-6.

KOUGH, J.L. & LINDERMAN, R.G. Monitoring extramatrical hyphae of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus with an immunofluorescence assay and the soil aggregation technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 18:307-313, 1986.

INGHAM, E.R. & KLEIN, D.A. Soil fungi relationships between hyphal activity and staining with fluorescein diacetate. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 16:273-8, 1984.

LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Supression of endochitinase, β -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. **Molecular Plant-Microbe interactions**. 6:75-83, 1993.

LAMBAIS, M.R. Condições edáficas que afetam o microtofismo de *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) SW. Piracicaba, 1987. 102p. (Tese de Nestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ/USP).

LAMBAIS, M.R. & CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e da colonização micorrízica de *Stylosanthes guianensis* em solo ácido e distrófico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 12:249-55, 1988.

LAMBERT, D.H.; D.E. BAKER & H. COLE, Jr. The role of mycorrhizae in the interactions of phosphorus with zinc, copper and others elements. **Soil Science Society American Journal**, Madison, 43: 976-80, 1979.

LINDERMAN, R.G. Managing rhizosphere microorganisms in the production of horticultural crops. **HortScience**, Alexandria, 21:1299-1302, 1986.

- LINDERMAN, R.G. Mycorrhizal interaction with the rhizosphere microflora. The mycorrhizosphere effect. **Phytopathology**, St. Paul, 78:366-71, 1988.
- LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 7(1):1-18, 1983.
- LYNCH, J.M. & BRAGG, E. Microorganisms and soil aggregate stability. **Advances in Soil Science**, New York, 2: 133-71, 1985.
- LYNN, D.G. & CHANG, M. Phenolic signals in cohabitation: Implications for plant development. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, 41:497-526, 1990.
- MACDONALD, R.M. & LEWIS, M. The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mossae*. **New Phytologist**, London, 80:135-141, 1978.

MACDONALD,R.M. & CHANDLER,M.R. Bacterium-like organelles in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus caledonius*. **New Phytologist**, London, 89:241-46, 1981.

MACDONALD,R.M.; CHANDLER,M.R.; MOSSE,B. The occurrence of bacterium-like organelles in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, London, 90:659-63, 1983.

MALAVOLTA,E. **Manual de química agrícola - Adubos e Adubação**. São Paulo, agronômica CERES, 1975, 487p.

MALAVOLTA,E.; VITTI,G.C.; OLIVEIRA,S.A. de **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p. il.

MALAVOLTA,E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo, agronômica Ceres, 1980, 251p.

MANJUNATH,A. & HABTE,M. Development of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and uptake of immobile nutrients in *Leucaena leucocephala*. **Plant and Soil**, The Hague. 106:97-103, 1988.

MENGE, J.A.; STENLE, D.; BAGYARAJ, D.J.; JOHNSON, E.L.V.;

LEONARD, R.T. Phosphorus concentration in plants responsible for inhibition for mycorrhizal infection. *New Phytologist*, London, **80**:575-8, 1978c.

MILLER, D.D.; BODMER, M.; SCHUEPP, H. Spread of endomycorrhizal colonization and effects on growth apple seedlings. *New Phytologist*, Cambridge, **111**:51-9, 1989.

MILLER, R.M.; JASTFER, A.G.; PILLAI, J.K. Biomass allocation in *Agropyron Smithii*-*Glomus* symbiosis. *American Journal of Botany*, Baltimore, **74**:114-122, 1987.

MORTON, J.B. & BENNY, G.L. Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, Glomales, two new suborders, Glomineae and Gigasporineae, and two new families, *Acaulosporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon*, New York, **37**:471-91, 1990.

MORTON, J.B.; WRIGHT, S.F.; SWOROBUK, J.E. Sensitivity of monoclonal of *Glomus occultum*. In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 7., Gainesville, 1987.

Mycorrhizae decade: practical applications and research, proceedings, edited by D.M. SYLVIA and others. Gainesville, University of Florida, 1987. p.317.

MOSSE, B. The regular germination of resting spores and some observations on the growth requirements of an *Endogone* sp. causing vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Transactions of the British Mycological Society**, New York, 42:273-86, 1959.

MOSSE, B. Advances in study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, 11:171-96, 1973.

MYER, J.R. & LINDERMAN, R.G. Selective influence on population of rhizosphere bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 18:191-6, 1986.

- MUNIZ,A.S.; NOVAIS,R.F.; BARRROS,N.F.; NEVES,J.C.L. Nível crítico de fósforo na parte aérea da soja como variável do fator capacidade de fósforo do solo. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, Campinas, 9:237-243, 1985
- NELSON,C.E. The water relations of vesicular-arbuscular mycorrhizal systems. In: SAFIR,G.R., ed. **Ecophysiology of VA mycorrhizal Plants**,. Boca Raton, CRC Press, 1987. p. 71-91.
- NEWMAN,E.I. A method for estimating the total lenght of root in a sample. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, 3: 139-45, 1966.
- NEWMAN,E.I. & REDDELL,P. The distribution of mycorrhizas among familes of vascular plants. **New Phytologist**, London, 106:745-51, 1987.
- NICOLSON,T.H. Mycorrhizae in the Gramineae. I. Vesicular-arbuscular endophytes with special reference to the external phase. **Transactions of the British Mycological Society** 42:421-38, 1959.
- NYE,P.H. & TINKER,P.B. **Solute movement in the soil-root system**. Oxford. Blackwell Scientific, 1977. 342p.

- OWUSU-BENNOAH, E. & WILD, A. Autoradiography of the depletion zone of phosphate around onion roots in the presence of vesicular-arbuscular mycorrhiza. **New Phytologist**, London, 82:133-40, 1979.
- PACOVSKY, R.S. & BETHLENFALVAY, G.J. Measurement of the extraradical mycelium of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in soil by chitin determination. **Plant and Soil** 68:143-47, 1982.
- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry:** Theoretical and Applied. 4. ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1972. v.2., p.1310.
- PENG, S.; EISSENSTAT, D.; GRAHAM, J.H.; KIMBERLYN, W.; HOHGE, N.C. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply: analysis of carbon cost. **Plant Physiology**, Rockville, 101:1063-71, 1993.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, A.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for assessment of infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 55(1):158-61, 1970.

- POWELL, C.L. Effect of P fertiliser on root morphology and P uptake of *Carex coriacea*. *Plant and Soil*, The Hague, 41:661-67, 1974.
- POWELL, C.L. & BAGYARAJ, D.J. ed. *VA mycorrhiza*. Boca Raton, CRC Press, 1984. 234p.
- RAIJ, B. van. *Fertilidade do solo e adubação*. Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1991. 340p.
- RATNAYAKE, M.; LEONARD, R.T.; MENGE, J.A. Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance mycorrhizal formation. *New Phytologist*, London, 81: 543-52, 1978.
- READ, D.J. The structure and function of vegetative mycelium of mycorrhizal roots. In: JENNINGS, D.H. & RAYNER, A.D.M. ed., *Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium*. Cambridge, Cambridge University Press, 1984. p.215-40.
- RHODES, L.H. & GERDEMANN, J.W. Phosphate uptake zones of mycorrhizal onions. *New Phytologist*, London, 75:555-61, 1975.

- SAME, B.I.; ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K. Phosphorus soluble carbohydrates and endomycorrhizal infection. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, 15:593-7, 1983.
- SANDERS, F.E. The effect of foliar-applied phosphate on the mycorrhizal infections of onion roots. In:
SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B., ed.,
Endomycorrhizas. London, Academic Press, 1975. p.261-76.
- SANDERS, F.E. & SHEIK, N.A. Development of mycorrhizal infection in plant roots systems. **Plant and Soil**, The Hague, 71:233-46, 1983.
- SANDERS, F.E.; TINKER, P.B.; BLACK, R.L.; PALMERLEY, S.M. The development of endomycorrhizal roots systems. I. Spread of infection and growth promoting effects with four species of vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, London, 78:257-68, 1977.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba, ESALQ, 1974. 56p.

- SCANNERINI, S. & BONFANTE-FASOLO, P. Comparative ultrastructural analysis of mycorrhizal associations. *Canadian Journal of Botany*, Ottawa, 61:917-43, 1983.
- SCHUBERT, A.; MARZACHI, M.; MAZZITELLI, M.C.C.; BONFANTE-FASOLO, P. Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular fungus *Glomus clarum* Nicol. & Schenk. *New Phytologist*, London, 107:183-190, 1987.
- SCHUEPP, H.; MILLER, D.D.; BODMER, M.A. A new technique hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi through soil. *Transactions of the British Mycological Society*, Cambridge, 89:429-435, 1987.
- SCHWAB, S.M.; MENGE, J.A.; LEONARD, R.T. Quantitative and qualitative effects of phosphorus on extracts and exudates of sudangrass in relation to vesicular-arbuscular mycorrhizal formation. *Plant Physiology*, Lancaster, 73:761-6, 1983a.
- SCHWAB, S.M.; MENGE, J.A.; LEONARD, R.T. Comparison of stages of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation in sudangrass grown at two levels of phosphorus nutrition. *American Journal of Botany*, 70:1225-32, 1983.

- SECILIA, J. & BAGYARAJ, D.J. Bacteria and actinomycetes associated with pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizas. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, 33:1067-73, 1987.
- SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. *Journal of Plant Nutrition*, New York, 4: 289-312, 1981.
- SIEVERDING, E. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. Eschborn, Technical Cooperation- Federal Republic of Germany. 1991. 375p.
- SILVA, L.R. Efeitos de compostos orgânicos sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea* in vitro. Lavras, 1990. 77p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura de Lavras).
- SILVEIRA, A.P.D. & CARDOSO, E.B.J.N. Efeito do fósforo e da micorriza vesículo-arbuscular na simbiose *Rhizobium*-feijoeiro. *Revista Brasileira da Ciência do Solo*, Campinas, 11:31-6, 1987.

SILVEIRA, A.P.D.; CARDOSO, E.J.B.N; FAQUIN, V. Influência da micorriza VA no desenvolvimento do feijoeiro e nos parâmetros cinéticos de absorção radicular de fósforo. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 2., São Paulo, 1987, **Programas e Resumos**. São Paulo - SP, 1987. p.26.

SIQUEIRA, J.O. Fisiologia e bioquímica de micorrizas vesículo-arbusculares: alguns aspectos a relação fungo-planta e absorção de fósforo. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 4., Mendes, 1991. **Programas e resumos**. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1991. p.105-31.

SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Lavras, MEC/ABEAS/ESAL, 1988. 235p.

SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; VALE, R.R. Effects of phosphorus on formation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 19(12):1465-74, 1984b.

SIQUEIRA, J.O. & PAULA, M.A. Efeito de micorrizas vesículo-arbusculares na nutrição e aproveitamento em solos sob cerrado. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, Campinas, 10:97-102, 1986.

SIQUEIRA, J.O. & RIBEIRO, M.A.V. Efeito da micorriza vesículo-arbuscular (MVA) na produção da matéria seca e absorção de potássio do Sieneto Nefelítico de Poços de Caldas pelo milho e pela soja. **Ciência e Prática**, Lavras, 7:197-204, 1983.

SIQUEIRA, J.O.; SAFIR, G.R.; NAIR, M. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhizal formation and plant growth by flavonoid compounds. **New Phytologist**, London, 118(1):87-93, 1991b.

SIQUEIRA, J.O.; SYLVIA, D.M.; GIBSON, J.; HUBBELL, D.H. Spores germination and germ tubes of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 31:965-71, 1985.

SKINNER, M.F. & BOWEN, G.D. The penetration of soil by mycelial strands of ectomycorrhizal fungi. **Soil Biology and Biochemistry**. Oxford, 6:57-61, 1974.

SMITH, S.E. Inflow of phosphate into mycorrhizal and non-mycorrhizal plants of *Trifolium subterraneum* at different levels of soil phosphate. **New Phytologist**, Oxford, **90**:293-303, 1982.

SMITH, S.E. & DAFT, M.J. Interactions between growth, phosphate content and nitrogen fixation in mycorrhizal and non mycorrhizal *Medicago sativa*. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, **4**:404-13, 1977.

SMITH, F.A. & SMITH, S.E. Movement across membrane: physiology and biochemistry. In: GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S., ed. **Physiological and genetics aspects of mycorrhizae**. Paris, INRA, 1986. p.75-84.

SMITH, S.E. & WALKER, N.A. A quantitative study of mycorrhizal infection in *Trifolium*: separate determination of the rates of infection and mycelial growth. **New Phytologist**, London, **89**:225-40, 1981.

SNEDECOR, G.W.E. & COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. Iowa, Iowa State University Press. 6. ed. 5ª reimpressão. 325p.

- STRIBLEY,D.P.; TINKER,P.B.; RAYNER,J.H. Internal phosphorus concentration and carbon loss in plants infected with vesicular-arbuscular mycorrhiza. **Journal of Soil Science**, Oxford, 31:655-72, 1980.
- ST.JONH,T.V.; COLEMAN,D.C.; REID,C.P.P. Association of vesicular-arbuscular mycorrhizal hyphae with soil organic particles. **Ecology**,64:957-9, 1983.
- SUTTON,J.C. & SHEPPARD,R. Aggregation of sand-dune soil by endomycorrhizal fungi. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, 54:326-333, 1976.
- SYLVIA,D.M. Spatial and temporal distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Unicola paniculata* in Florida foredunes. **Mycologia**, New York, 78: 728-34, 1986.
- SYLVIA,D.M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, 20:39-43, 1988.

- SYLVIA, D.M. Distribution, structure, and function of external hyphae of vesicular-arbuscular fungi. In: BOX, J.E.Jr. & HAMMOND, L.C., ed. **Rhizosphere dynamics**. Gainesville, American Association for the Advancement of Science, 1992. cap.6, p.144-167.
- TISDALL, J.M. & OADES, J.M. Stabilization of soil aggregates by the root segments of ryegrass. **Australian Journal of Soil Research**. 17:429-41, 1979.
- VAN KESSEL, C.; SINGLETON, P.W.; HOBEN, H.J. Enhanced nitrogen-transfer from a soybean to maize by vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi. **Plant Physiology**, Rockville, 79:562-63, 1985.
- VIETS, F.G. Water deficits and nutrient availability. In: **Water deficits and plant growth**, vol.3. ed. KOZLOWSKI, T.T. New York: Academic Press. 217-39, 1972.
- WARNER, A. Colonization of organic matter by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, New York, 82:352-54, 1984.

- WARNER,A & MOSSE,B. Spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi between separate root systems. **Transactions of the British Mycological Society**, London, 80:353-54, 1983.
- WARNER,A. & MOSSE,B. Independent spread of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. **Transaction of the British Mycological Society**, New York, 74:407-10, 1980.
- WHITTINGHAN,J. & READ,J. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in natural vegetation systems III. Nutrient transfer between plants with mycorrhizal interconnections . **New Phytologist**, London, 90:277-84, 1982.
- WOOLHOUSE,H.W. Membrane structure and transport problems considered in relation to phosphorus and carbohydrate movement and regulation of endotrophic mycorrhizal associations. In: SANDERS,F.E.; MOSSE,B; TINKER,P.B., ed. **Endomycorrhiza**. London, Academic Press, 1975. p.209-37.
- YAWNEY,W.J. & SCHULTZ,R.C. Anatomy of vesicular-arbuscular endomycorrhizal symbiosis between sugar maple (*Acer saccharum* Mars) and *Glomus etunicatum* Becker & Gerdemann. **New Phytologist**, Cambridge, 114:47-57, 1980.

ZAMBOLIN, L. & PINTO, L.R.M. Resposta de porta-enxerto de citros a fungos micorrízicos. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZA, 1., Lavras, 1985. Resumos, s.n.t. p.83.

ZAMBOLIN, L. & SIQUEIRA, J.O. Importância e potencial das associações micorrízicas para a agricultura. Belo Horizonte, EPAMIG, 1985. 36p. (EPAMIG, Documentos, 26).

APÊNDICE

APÊNDICE-1 Valores F obtidos na análise de variância da concentração e quantidade total de nutrientes absorvidos por *Zea mays*.

CAUSAS DA VARIACÃO	GL	N%	N-T	P%	P-T	K%	K-T	Ca%	Ca-T	Mg%	Mg-T
FUNGO(F)	1	ns	ns	**	ns	**	ns	ns	ns	ns	**
DOSES(D)	3	**	ns	**	**	**	ns	ns	ns	ns	**
ÉPOCA(E)	2	ns	**	**	**	**	**	**	**	ns	**
F X D	3	*	*	**	ns	**	*	ns	ns	*	ns
F X E	2	**	ns	*	ns	**	ns	**	ns	ns	*
E X D	6	ns	ns	ns	ns	**	ns	*	ns	ns	ns
F X D X E	6	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
C.V. (%)	-	24,7	70,7	7,1	69,6	6,4	31,0	10,7	124,2	14,8	31,6

APÊNDICE-2 Valores F obtidos na análise de variância da concentração e quantidade total de nutrientes absorvidos por *Zea mays*.

CAUSAS DA VARIACÃO	GL	S%	S-T	Cu (ppm)	Cu-T	Mn (ppm)	Mn-T	Zn (ppm)	Zn-T	Fe (ppm)	Fe-T
FUNGO(F)	1	ns	**	ns	*	ns	**	ns	*	ns	ns
DOSES(D)	3	**	ns	*	ns	ns	**	**	ns	ns	*
ÉPOCA(E)	2	**	**	**	**	*	**	*	**	**	**
F X D	3	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	**	**
F X E	2	ns	**	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	ns
E X D	6	*	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
F X D X E	6	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
C.V. (%)	-	17,7	40,6	46,1	82,5	24,1	31,9	34,8	67,1	91,6	54,1

ns = não significativo

* = significativo a 0,01% de probabilidade pelo teste F

** = significativo a 0,05% de probabilidade pelo teste F