

**INFLUÊNCIA DO FUNGO MICORRÍZICO
ARBUSCULAR (*Glomus clarum*) SOBRE
CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS, NUTRICIONAIS,
METABÓLICAS E ANATÔMICAS EM PLANTAS
JOVENS DE SERINGUEIRA**

PATRÍCIA FABIAN DE ARAÚJO DINIZ

2007

PATRÍCIA FABIAN DE ARAÚJO DINIZ

INFLUÊNCIA DO FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR (*Glomus clarum*) SOBRE CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS, NUTRICIONAIS, METABÓLICAS E ANATÔMICAS EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

Orientador

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Diniz, Patrícia Fabian de Araújo.

Influência do fungo micorrízico arbuscular (*Glomus clarum*) sobre características biofísicas, nutricionais, metabólicas e anatômicas em plantas jovens de seringueira / Patrícia Fabian de Araújo Diniz. -- Lavras : UFLA, 2007. 112 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.
Orientador: Luiz Edson Mota de Oliveira.

Bibliografia.

1. *Hevea brasiliensis*. 2. Micorrização. 3. Porta-enxertos. 4. Resistência estomática. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.950413

PATRÍCIA FABIAN DE ARAÚJO DINIZ

INFLUÊNCIA DO FUNGO MICORRÍZICO ARBUSCULAR (*Glomus clarum*) SOBRE CARACTERÍSTICAS BIOFÍSICAS, NUTRICIONAIS, METABÓLICAS E ANATÔMICAS EM PLANTAS JOVENS DE SERINGUEIRA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 14 de dezembro de 2007.

Dr. Alessandro Carlos Mesquita Pesquisador FAPEMIG/UFLA

Dr. Lisandro Tomas da Silva Bonome Pesquisador CNPq/UFLA

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

À minha filhinha Antonina, amor maior da minha vida.

Aos meus pais, irmãos e amigos.

DEDICO

*"Só Deus pode dar a alegria, mas você pode sorrir a todos;
só Deus pode dar a força, mas você pode apoiar quem
desanimou; só Deus é o caminho, mas você pode indicá-lo aos
outros; só Deus é a luz, mas você pode fazê-la brilhar aos olhos
dos seus irmãos; só Deus é a vida, mas você pode restituir aos
outros o desejo de viver; só Deus pode fazer milagres, mas você
pode ser aquele que trouxe os cinco pães e os dois peixes; só
Deus pode fazer o que parece impossível, mas você pode fazer o
possível; só Deus se basta a si mesmo, mas Ele preferiu contar
com você."*

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS que me deu a vida e a graça de gerar outra vida, o meu mais lindo e rico presente, meu eterno bebezinho, Antonina.

Antonina, meu bebê, tudo por você que cobre de bênçãos as nossas vidas.

Agradeço imensamente à minha mãe, Maria, por sempre ter sido uma presença constante em minha vida, me apoiando e me fazendo crer que o Sol sempre brilha após as tempestades. Mãe, talvez sem sua presença, eu nada conseguiria. Obrigada por existir e por ser minha mãe.

Ao meu pai, Diniz, agradeço por todo apoio, pela sua compreensão, pela tolerância e pelo exemplo a ser seguido. Que Deus o abençoe. Muito obrigada por vocês serem meus pais.

Aos meus irmãos, Hércules e Vladimir, agradeço por fazerem parte de minha vida. Vladimir, que Deus sempre ilumine seus caminhos, sua vida, e lhe dê muitas bênçãos.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira, que confiou em mim e em minha capacidade. Obrigada por sua atenção e disponibilidade. Que Deus o abençoe sempre.

Ao professor Evaristo, pela amizade, orientação, pela sinceridade.

Aos doutores e amigos Alessandro e Lizandro, agradeço pela competência, paciência e por toda ajuda que me propiciaram.

A todos os demais professores do Departamento de Fisiologia Vegetal, obrigada pelo convívio.

Ao professor José Osvaldo Siqueira pela orientação, ao doutor Cláudio e doutorando José Geraldo e ao técnico Manoel, todos do Departamento de Ciências dos Solos, pelo apoio.

Agradeço aos funcionários Joel, Odorêncio, Lena, Tanham que me apoiaram, que sempre me auxiliaram com carinho. Que Deus ilumine a todos.

Agradeço aos meus colegas de trabalho, em especial ao professor Jader e professora Maria José, da Escola Estadual Dr. João Batista Hermeto, que tanto me incentivaram. Aos meus alunos, meninos e meninas, que tanto amo e respeito. Recebam todos as bênçãos de Deus.

Aos amigos de curso, agradeço pelo apoio e companheirismo. Em especial, agradeço e divido esta vitória com meu amigo Marcelinho, que me ajudou a chegar aqui (horas de MSN em troca de bolo e esfihas, rsrs). Tiaguinho e Luciana, vocês me deram muita força, coragem e apoio moral. Obrigada.

Agradeço aos alunos da iniciação científica pelo apoio, pela amizade e por toda ajuda.

Aos meus queridos professores da UFMG, em especial às doutoras Lêda (Bioquímica) e Denise (Patologia), que sempre me incentivaram e me receberam com carinho. Obrigada por tudo.

Agradeço a esta cidade, Lavras, que me recebeu e me acolheu, que me deu alegrias e que eu adotei como minha cidade do coração.

OBRIGADA A TODOS !!!!!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Conceitos gerais sobre as micorrizas	4
2.2 Processo de formação das micorrizas vesículo-arbusculares	6
2.3 Fatores que afetam a formação micorrízica	7
2.3.1 Nutricionais	7
2.3.2 Não-nutricionais	12
2.4 Efeitos nutricionais das micorrizas sobre a planta hospedeira	13
2.4.1 No crescimento	13
2.4.2 Na absorção de nutrientes	14
2.4.3 Na absorção e metabolismo do nitrogênio	17
2.5 Efeitos não nutricionais dos FMA sobre as plantas hospedeiras	23
2.5.1 Relação água-planta	23
2.5.2 Anatomia e morfologia da raiz	25
2.5.3 Alterações bioquímicas na planta	26
2.6 A seringueira e a associação micorrízica	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Época e localização do experimento	30
3.2 Obtenção e caracterização da amostra de solo	30
3.3 Obtenção do inóculo do fungo micorrízico <i>Glomus clarum</i>	32
3.4 Obtenção do material vegetal	32
3.5 Preparo das amostras de solo, plantio, inoculação e adubação	32
3.6 Características avaliadas	35
3.6.1 Altura e diâmetro dos caules	35
3.6.2 Área foliar	35
3.6.3 Massa seca da parte aérea e raízes	35
3.6.4 Análise de colonização radicular pelo fungo micorrízico	36
3.6.5 Características biofísicas	37
3.6.6 Características anatômicas	38
3.6.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para observação de arbúsculos nas raízes.	38

3.6.6.2 Características anatômicas de folhas em relação ao número médio de estômatos por mm ² , diâmetros polar e equatorial (epiderme da face abaxial)	39
3.6.6.3 Características anatômicas de raízes (alterações no tecido vascular)	39
3.6.7 Preparo do material para as análises bioquímicas	40
3.6.7.1 Obtenção dos extratos	40
3.6.7.2 Proteínas	41
3.6.7.3 Aminoácidos.....	41
3.6.7.4 Açúcares solúveis totais	41
3.6.7.5 Açúcares redutores	41
3.6.8 Teor de clorofila	42
3.6.9 Teores de nutrientes na folhas	42
3.6.10 Atividade radicular da enzima redutase do nitrato	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Colonização micorrízica.....	44
4.2 Altura das plantas e diâmetro dos caules.....	51
4.3 Produção de matéria seca na parte aérea, raiz e matéria seca total	55
4.4 Área foliar.....	61
4.5 Teor e acúmulo de nutrientes nas folhas	62
4.6 Teores de clorofilas nas folhas	66
4.7 Resistência estomática, transpiração e temperatura média foliar.....	69
4.8 Densidade estomática	74
4.9 Concentração de açúcares solúveis totais e açúcares redutores	77
4.10 Concentração de proteínas solúveis totais e aminoácidos totais	84
4.11 Anatomia da raiz	88
4.12 Atividade radicular da redutase do nitrato	92
5 CONCLUSÕES	96
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

RESUMO

DINIZ, Patrícia Fabian de Araújo. **Influência do fungo micorrízico arbuscular (*Glomus clarum*) sobre características biofísicas, nutricionais, metabólicas e anatômicas em plantas jovens de seringueira**. 2007. 112p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. *

A utilização de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), associados às plantas hospedeiras, tem sido considerada uma alternativa para a redução no uso de fertilizantes e pesticidas na agricultura, devido aos seus efeitos benéficos no crescimento das plantas, principalmente aquelas de interesse agrônomo. A inoculação artificial de FMAs tem sido uma técnica pouco aproveitada e pode ser uma alternativa a ser utilizada na formação de porta-enxertos precoces e bem nutridos. O estudo objetivou avaliar o efeito da inoculação do FMA *Glomus clarum* no crescimento, características biofísicas, bioquímicas e anatômicas em plantas jovens de seringueira. O experimento foi instalado em casa de vegetação e os tratamentos consistiram de plantas inoculadas com o FMA *Glomus clarum* e adubadas com 50 ppm de fósforo (mic+50P), plantas não inoculadas e adubadas com 50 ppm de fósforo (s/mic+50P) e plantas não inoculadas e adubadas com 500 ppm de fósforo (s/mic+500P). Ao longo dos 195 dias foram avaliadas a altura e o diâmetro das plantas. Ao final do experimento efetuaram-se as avaliações biofísicas, a taxa de colonização radicular pelo fungo, área foliar da planta, massa seca da parte aérea, raiz e total, teores foliares de nutrientes, teores de clorofilas *a*, *b* e total, concentração de proteínas solúveis totais, aminoácidos totais, açúcares redutores e solúveis totais, atividade radicular da redutase do nitrato, além de avaliações anatômicas de folhas e raízes. A taxa de colonização radicular foi baixa (18%). Constatou-se que as plantas micorrizadas apresentaram altura e diâmetro dos caules, matéria seca da parte aérea, matéria seca total, densidade estomática, área foliar, teores de clorofilas *a* e totais, razão clorofila *a/b* semelhantes às plantas s/mic+500P. Maior acúmulo de matéria seca de raiz, maior taxa de transpiração, menor resistência estomática e menor temperatura foliar foram observadas para as plantas micorrizadas. Os teores de P e S apresentaram diferença estatística significativa nas plantas s/mic+500P, em comparação com os demais nutrientes. As plantas micorrizadas mostraram maiores concentrações de açúcares solúveis nas folhas e maior teor de sacarose estimada. Houve ainda uma maior concentração de açúcares solúveis nas raízes laterais micorrizadas, observando-se uma queda na concentração de açúcares redutores nessas raízes em relação às raízes s/mic+500P. As folhas das plantas

* Comitê de Orientação: Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA

micorrizadas mostraram ainda maiores teores de proteínas solúveis totais em relação ao tratamento s/mic+50P. As raízes laterais micorrizadas também mostram maiores concentrações de proteínas solúveis totais e aminoácidos em relação ao tratamento s/mic+50P. As análises anatômicas das raízes evidenciaram a ocorrência de alterações no tecido vascular, com aumento no número de pólos de xilema nas raízes micorrizadas. Além disso, a micorrização aumentou a atividade radicular da enzima redutase do nitrato.

ABSTRACT

DINIZ, Patrícia Fabian de Araújo. **Influence of the mycorrhizal fungus (*Glomus clarum*) on biophysical, nutritional, metabolic and anatomic characteristics on young rubber plants.** 2007. 112p. Dissertation (Master in Plant Physiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Use of arbusculares mycorrhiza fungi (FMAs) associated to host plants has been considered an alternative to the reduction in the use of both fertilizers and pesticides in agriculture, due to their beneficial effects on the growth of plants, mainly those of agronomic interest. The artificial inoculation of FMAs has been a little utilized technique and can be an alternative to be utilized in the formation of early and well-nourished rootstocks. The study aimed to evaluate the effect of the inoculation of FMA *Glomus clarum* on the growth, biophysical, biochemical and anatomical characteristics of rubber tree. The experiment was installed in a greenhouse and the treatments consisted of plants inoculated with FMA *Glomus clarum* and fertilized with 50 ppm of phosphorus (mic+50P), plants not inoculated and fertilized with 50 ppm of phosphorus (s/mic+50P) and non-inoculated plants and fertilized with 500 ppm of phosphorus (s/mic+500P). Throughout the 195 days, both the height and diameter of the plants were evaluated. At the end of the experiment, the biophysical evaluations, the rate of root colonization by the fungus, leaf area of the plant, shoot, root and total dry matter, leaf nutrient contents, contents of chlorophylls *a*, *b* and total, concentration of total soluble proteins, total aminoacids, reducing sugars and total soluble sugars, nitrate reductase root activity, in addition to anatomic evaluations of leaves and roots were performed. The rate of root colonization was low (18%). It was found that the mycorrhizal plants presented height and diameter of stems, shoot dry matter, total dry matter, stomatal area, leaf area contents of *a* and total chlorophylls, ratio *a/b* chlorophyll similar to those of s/mic+500P plants. Increased accumulation of root dry matter, higher rate of transpiration, lower stomatal resistance and lower leaf temperature were observed from the mycorrhizal plants. The contents of P and S presented statistical significant difference in the s/mic+500P plants, as compared with the other nutrients. The mycorrhizal plants showed highest concentrations of soluble sugars in leaves and greatest content of estimated sucrose. There was still a higher concentration of soluble sugars in the mycorrhized side roots, observing a fall at the concentration of reducing sugars in these roots relative to the s/mic+500P roots. The leaves of the mycorrhizal plants showed, further, higher

* Guidance Committee: Luiz Edson Mota de Oliveira – UFLA

contents of total soluble proteins in relation to the s/mic+50P treatment. The mycorrhizal side roots also showed higher concentrations of total soluble proteins and aminoacids in relation to the s/mic+50P treatment. The anatomic studies of roots pointed out the occurrence of alterations in the vascular tissue, with increased number of xylem poles in the mycorrhizal roots. In addition, mycorrhization increased the root activity of nitrate reductase enzyme.

1 INTRODUÇÃO

Hevea brasiliensis [(Willd. ex. Adr. de Juss.) Müell-Arg.] é uma espécie arbórea, pertencente à família Euphorbiaceae, que possui a maior capacidade produtiva de látex e variabilidade genética para resistência a doenças, dentre todas as outras 11 espécies pertencentes ao gênero *Hevea*. Seu principal produto, o látex, é a base para produção da borracha natural, matéria prima fundamental para o agronegócio brasileiro.

A adubação correta das plantas de seringueira é essencial para uma nutrição equilibrada que se reflete em crescimento e produtividade e tem diferentes objetivos de acordo com as fases do seringal. Na formação dos porta-enxertos, visa-se ao suprimento de nutrientes para se atingir o máximo de uniformidade, precocidade em muitos casos, qualidade do sistema radicular e aptidão para enxertia (Bataglia & Santos, 1998).

Entretanto, as práticas agrícolas atuais estão mudando de um enfoque convencional para uma abordagem mais sustentável. Os sistemas agrícolas sustentáveis são caracterizados pela reduzida inserção de insumos sintéticos tais como pesticidas e fertilizantes e um aumento considerável de informações relacionadas com práticas conservacionistas.

Dentro dessa lógica, a utilização de FMAs (fungos micorrízicos arbusculares) associados às plantas hospedeiras tem sido considerada há três décadas, como uma alternativa para a redução no uso de insumos (fertilizantes e pesticidas) na agricultura, devido aos seus efeitos benéficos no crescimento de plantas de interesse agrônômico, florestal, hortícola e pastoril (Miranda & Miranda, 1997).

Ultimamente, têm-se multiplicado as evidências do efeito benéfico das associações micorrízicas com diversas plantas superiores de importância

econômica, sendo bem conhecidos e documentados esses benefícios na melhora nutricional das plantas, especialmente em relação ao fósforo.

Devido ao fato da disponibilidade de N (nitrogênio) e P (fósforo) ser um dos principais fatores limitantes para o crescimento e a produtividade das plantas, os FMAs apresentam grande potencial como insumo biológico para a agricultura. No Brasil, há uma predominância de solos pobres e a exigência de P pelas culturas é alta, o que torna o país um enorme potencial para utilização dessa tecnologia.

A principal fonte de P para os seres vivos são as rochas fosfáticas que constituem um recurso natural não renovável e que precisa ter seu uso racionalizado, pois se estima que as reservas de P se esgotarão nos próximos 80, 100 anos.

A micorrização representa, portanto, uma importante estratégia econômica para a maximização do uso de fertilizantes fosfatados aplicados aos solos deficientes e com elevada capacidade de fixação de fosfatos, como aqueles predominantes nos trópicos (Chu et al., 2004), além de propiciar a redução no uso de insumos químicos na agricultura.

Para as plantas perenes, como é o caso da seringueira, a micorrização artificial pode ser uma alternativa a ser utilizada na formação de porta-enxertos mais bem nutridos, vigorosos e uniformes, com um índice elevado de sobrevivência e um melhor desempenho das plantas no campo.

Escassos são os trabalhos que objetivam avaliar os efeitos de fungos micorrízicos arbusculares na formação de porta-enxertos de seringueira, sendo que estes se restringem à avaliação da melhora nutricional, crescimento e trocas gasosas, não havendo, portanto, nenhum trabalho relacionando à micorrização em seringueira com as alterações em nível bioquímico e enzimático, assim como alterações anatômicas.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos que a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares possa ter sobre as plantas de seringueira, em nível de crescimento e alterações biofísicas, bioquímicas e anatômicas das mesmas. Isso, associado aos poucos trabalhos encontrados na literatura, envolvendo esses fungos e a seringueira, poderá subsidiar trabalhos futuros, objetivando a utilização da simbiose na formação de porta-enxertos mais eficientes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Conceitos gerais sobre as micorrizas

Fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são fungos da ordem Glomales que formam associações simbióticas mutualísticas com raízes de quase todas as espécies vegetais terrestres. Trata-se de uma simbiose quase universal, ocorrendo em aproximadamente 80% das espécies vegetais (Bonfante & Peroto (1995), Gadkar et al., (2001), numa imensa amplitude de habitats naturais (Barea et al., (1984), Miller et al. (1986). Somente poucas espécies de plantas como os membros das famílias Brassicaceae, Caryophyllaceae, Chenopodiaceae, ou Urticaceae não estão envolvidas nessas interações, de acordo com Smith & Read (1997) e Vierheilig et al. (1996).

Entre os hospedeiros, encontra-se ampla variedade de espécies de interesse agrônomo, entre elas: o algodão, o gergelim, a mamona, o sisal e o amendoim (Hoffmann & Lucena, 2006). Esses fungos são seres biotróficos obrigatórios, ou seja, sua propagação só é possível quando estão associados às raízes de uma planta viva (Barea et al., 1984). Uma vez estabelecida a simbiose, ocorre a troca de nutrientes entre o fungo e a planta hospedeira, visto que as hifas fúngicas funcionam como extensão das raízes das plantas, pois devido à sua grande capacidade de ramificação, exploram o solo, realizando absorção de água e nutrientes minerais, os quais são transferidos para as plantas por meio de estruturas intracelulares efêmeras, denominadas arbúsculos. A planta hospedeira, em contrapartida, fornece o substrato energético para o fungo na forma de hexoses (Miller et al., 1986).

Os fungos formadores das micorrizas arbusculares (MAs) são habitantes comuns do solo e colonizam as células do córtex das raízes inter e intracelularmente, sendo que a colonização ocorre na epiderme e parênquima

cortical. O cilindro central e regiões meristemáticas não são colonizados (Bonfante-Fasolo, 1984).

Os arbúsculos, estruturas típicas desses fungos, originam-se da penetração de células corticais pela hifa, causando invaginação da plasmalema. São esses os principais locais de troca de metabólitos e, assim, do ponto de vista fisiológico, a principal estrutura da simbiose, tendo sua vida duração de 4 a 5 dias, período após o qual sofrem degeneração, e a célula volta a ter atividade normal (Bonfante-Fasolo, 1984). Esse é um processo dinâmico, ou seja, enquanto alguns arbúsculos entram em senescência, outros estão em formação.

De acordo com Lima (1989), as MAs desempenham papel importante na evolução e na sobrevivência das plantas, contribuindo significativamente para a produção vegetal, principalmente devido a seu efeito na absorção de fósforo e de outros nutrientes. Não há especificidade hospedeira, nem ocorrem alterações morfológicas macroscópicas nas raízes colonizadas, tal como acontece com as bactérias nodulíferas, sendo a presença da associação detectada através de observações microscópicas de raízes clarificadas e coloridas com corantes especiais.

A técnica de inoculação de fungos micorrízicos, em especial os arbusculares, apresenta algumas limitações, as quais têm sido objeto de estudos em muitos países, inclusive no Brasil. Uma delas é a dificuldade de cultivo do fungo em condições axênicas, *in vitro*, ou seja, eles não são cultiváveis em meio artificial (Silveira, 1992) e produção de inóculo, limitando o seu estudo separado da planta hospedeira (Moreira & Siqueira, 2006). Outra, é a compatibilização entre o uso de FMAs e o uso de insumos, especialmente adubos, os quais ainda são usados em larga escala na produção de mudas, causando redução da germinação dos esporos e afetando a população de FMAs no solo (Silveira, 1992).

2.2 Processo de formação das micorrizas vesículo-arbusculares

De acordo com Tamasloukht et al. (2003), o desenvolvimento do fungo se inicia com a germinação de esporos quiescentes, dando origem a uma hifa. Na ausência de uma planta hospedeira, o fungo micorrízico mostra um limitado crescimento da hifa, ao passo que na presença de exsudatos de raízes de plantas hospedeiras, o crescimento e a ramificação dicotômica da hifa aumenta consideravelmente.

De acordo com Smith & Read (1997), a hifa cresce em direção à raiz da planta hospedeira, com formação de uma estrutura de adesão e penetração, o apressório funcional, que determina a penetração das raízes (Eckardt, 2005). A penetração do córtex ocorre através de pressão e da ação balanceada de enzimas hidrolíticas produzidas pelo fungo e reguladas pela planta (Demchenko et al, 2004).

Ainda segundo aqueles autores, a infecção prossegue com a colonização apoplástica, dando-se pelo crescimento das hifas tanto inter quanto intracelularmente, sendo a última resultante da invaginação da membrana plasmática vegetal e síntese de uma interface fungo-planta bem característica denominada matriz. Na parte mais interna do córtex, hifas intracelulares se diferenciam nos arbúsculos, as estruturas especializadas no fluxo bidirecional de nutrientes, através da contínua ramificação dicotômica de suas extremidades.

Jacquelinet-Jeanmougin et al. (1987) relatam que a estrutura fúngica pode ser completamente degradada pela célula vegetal e esta recupera sua morfologia original, tornando-se capaz de permitir uma segunda penetração fúngica e formação arbuscular. Nem todas as células corticais são infectadas, sendo que a diferenciação de hifas terminais em arbúsculos ocorre somente em algumas das células colonizadas (Siqueira et al., 2002). De acordo com Bonfante-Fasolo (1984), as hifas intra-radiculares se diferenciam em estruturas

globosas e alongadas, ricas em lipídios, chamadas vesículas, que aparentemente possuem função de reserva.

O ciclo de vida do fungo se completa pela formação de esporos extra-radiculares, os quais podem iniciar um novo processo de colonização. O micélio externo cresce no solo adjacente à raiz, simultaneamente à colonização interna (Hayman, 1974). A quantidade de micélio extra-radicular pode chegar a 50 metros de hifa por grama de solo.

Contudo, deve ser deixado claro que não há, necessariamente, um paralelo entre colonização e efetividade da micorriza formada (Barea et al., 1984). Um FMA pode colonizar extensivamente uma raiz hospedeira sem que isso seja traduzido, necessariamente, em benefícios consideráveis para o hospedeiro.

2.3 Fatores que afetam a formação micorrízica

2.3.1 Nutricionais

Segundo Moreira & Siqueira (2006), as MAs são inibidas em condições de alta fertilidade e favorecidas pela baixa fertilidade do solo, onde a colonização e a esporulação são geralmente máximas. A adição de P suficiente para otimizar o crescimento da planta, geralmente reduz a colonização. Mesmo em espécies com dependência micorrízica, a colonização intra e extra-radicular pode ser bastante reduzida, dependendo do nível e da disponibilidade de nutrientes no solo (Lopes et al., 1983).

O efeito do P na colonização já é bastante conhecido e sabe-se que as concentrações de P próximas do ótimo para o crescimento da planta tem um efeito fungistático sobre os propágulos do fungo na rizosfera, sendo a colonização reduzida. Apenas os exsudatos radiculares de plantas deficientes de P estimulam o crescimento assimbiótico do fungo.

Os efeitos negativos da alta concentração de P são muito consistentes, mas o mecanismo exato da inibição não foi completamente elucidado. Segundo Moreira & Siqueira (2006), existem algumas hipóteses para explicar os efeitos negativos da alta concentração de fósforo na colonização de raízes hospedeiras por FMAs, dentre elas destaca-se a presença de lectinas nas raízes das plantas.

As lectinas são proteínas vegetais defensivas que se ligam a carboidratos ou a glicoproteínas, inibindo sua digestão por herbívoros. Essas lectinas poderiam se ligar aos carboidratos nas paredes do fungo, inibindo seu crescimento. Postula-se que, em condições de baixo P, as plantas teriam elevada atividade de fosfatases nas raízes, as quais formam dímeros com as lectinas, inativando-as e permitindo o crescimento do fungo no córtex. Em alto fósforo, as plantas teriam baixa atividade de fosfatases e as lectinas estariam livres para bloquear a entrada do fungo.

Os mesmos autores também têm observado, *in vitro*, que altas concentrações de açúcares inibem os propágulos do fungo. Com o aumento das concentrações de P no solo, a fotossíntese aumenta e a exportação de trioses fosfato dos cloroplastos para o citoplasma da folha, onde ocorre síntese de sacarose, também aumenta. A sacarose é translocada pelo floema até as raízes. Sacarose e seus derivados, em baixas concentrações, beneficiam o crescimento do fungo, mas em altas concentrações tornam-se inibitórias. Isso foi demonstrado *in vitro*. Admitindo-se efeitos semelhantes *in vivo*, esse mecanismo regularia a taxa de colonização das plantas.

As altas concentrações de P têm um efeito negativo sobre as MAs porque a maior concentração de P na raiz vai levar à menor alocação de C para o fungo (Olsson et al., 2002). Portanto, existe conexão entre o suprimento externo de P e a alocação de C para o fungo. Quando a planta está bem suprida de fósforo, ela não depende do fungo, e a presença dele torna-se um investimento energético supérfluo e sem retorno, uma vez que a associação

constitui-se em um dreno forte na raiz. Há evidências de que a planta regula a colonização de acordo com sua necessidade, através de um balanço delicado entre o nível de P no solo, atividade do fungo e resposta da planta.

Além disso, ressalta-se que o fungo micorrízico possui um transportador de P (GiPT), cuja transcrição é induzida apenas num nível mais baixo de Pi no ambiente (Olsson et al., 2006). Esse transportador é expresso na hifa externa de *G. intraradices* e não está associado com movimento de P na interface micorrízica (Harrison et al., 1995; Maldonado-Mendoza et al., 2001, citados por Olsson et al., 2006); assim, esse transportador pode ser responsável pela absorção de P, diretamente do ambiente externo à raiz, pelas hifas externas.

O fungo se estabelece e se desenvolve dentro da raiz hospedeira, e para isso ele necessita dos fotoassimilados produzidos pelo vegetal. Shachar-Hill et al. (1995), citado por Bago et al. (2003), postularam que o FMA obtém a maior parte, senão todo o seu carbono dentro da raiz da planta hospedeira. Ali, eles adquirem hexoses, as quais são convertidas em trehalose, glicogênio e quitina, carboidratos típicos dos FMAs, e em triacilglicerídeo (TAG), que é a principal forma de carbono estocado no FMA, sendo este principalmente ou exclusivamente sintetizado no micélio intra-radicular (MIR), de acordo com Pfeffer et al. (1999).

Bago et al. (2003) concluem, em seus experimentos, que o fluxo de carbono de dentro das raízes micorrizadas para o micélio extra-radicular (MER) é na forma de carboidratos e lipídios, e que o glicogênio é possivelmente a forma predominante de carboidrato que se move dentro do fungo (Fig. 1). A hexose incorporada pelo MIR é convertida em precursores do TAG pela glicólise; o glicogênio é produzido pela gliconeogênese e a rota das pentoses fosfato (RPF) opera tanto no MIR quanto no MER (Bago et al., 2000).

De acordo com Lammers et al. (2001), o carbono se move dentro do fungo por meio de duas rotas; a rota A, que envolve o triacilglicerídeo, e a rota

B, que envolve o glicogênio (Fig.1). O ciclo do glioxilato e a gliconeogênese são ativos no MER e esta via parece ser importante na utilização do TAG exportado pelo MIR para síntese de carboidratos no MER; as enzimas glicolíticas não possuem atividades no MER

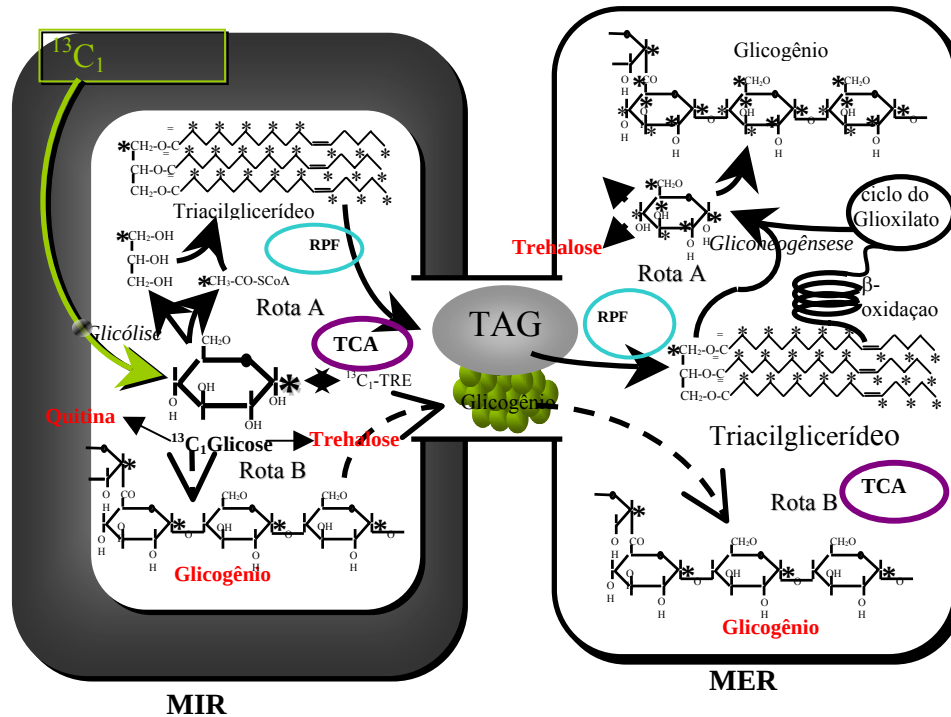


FIGURA 1: Fluxo do carbono dentro de uma raiz micorrizada, adaptado de acordo com modelos propostos por Lammers et al. (2001) e Bago et al. (2003). RPF: rota da pentoses fosfato, TCA: ciclo dos ácidos tricarboxílicos, TAG: triacilglicerídeo. Lavras, MG, 2007.

Além de glicogênio, a gliconeogênese produz os demais carboidratos típicos desses fungos, trehalose e quitina. De acordo com Lammers et al. (2001), o ciclo do glioxilato no MER pode funcionar também como uma via anaplerótica, porque o malato produzido na mitocôndria a partir do succinato pode repor intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), assim como

ser precursor gliconeogênico. Ainda de acordo com Bago et al. (2000), grande quantidade de aminoácidos são produzidos tanto no MIR quanto no MER.

Se o fluxo de carbono diminuir, a abundância do fungo também diminui. Desse modo, é vantagem para o fungo prover P de maneira que permita à planta alocar C para uma parte particular do micélio, especialmente porque diferentes FMAs colonizam diferentes partes da raiz sob condições de campo. Assim, respostas dos FMAs podem também ser analisadas sob a perspectiva de interações entre espécies de fungos ou plantas. A planta aloca carbono para partes ricas em fósforo, o que significa que ela aloca carbono para partes ricas em um fungo eficiente, uma vez que diferentes fungos micorrízicos podem competir pelo suprimento de carbono da planta hospedeira, ou seja, colonizar o mesmo hospedeiro. Portanto, quando há aumentos na concentração de P, o efeito de crescimento do FMA cai e pode ser abolido ou levar à depressão do crescimento (mudar de mutualismo para parasitismo) se, por exemplo, o custo de C na simbiose não for compensado por outros benefícios.

A maioria dos estudos verificando dependência micorrízica está relacionada com a absorção de P. Plantas que apresentam uma maior dificuldade de absorção de P e aquelas que possuem maior demanda por P, para seus processos metabólicos, são as mais dependentes da simbiose. Mas isso não ocorre somente para o P (esse é mais evidente). Nitrogênio e outros nutrientes também inibem a micorrização, quando em excesso no solo. Alguns micronutrientes (Zn, Cu, Mn e Fe) atuam diretamente sobre os propágulos, os quais apresentam alta sensibilidade a esses elementos, interferindo na micorrização (Moreira & Siqueira, 2006), sendo que algumas vezes as concentrações desses elementos são consideradas fungitóxicas (Hepper, 1979).

2.3.2 Não-nutricionais

Tem sido postulado que a colonização intra-radicular por FMAs depende diretamente da capacidade do fungo em evitar a ativação ou mesmo em suprimir o sistema de defesa da planta. Portanto, segundo Barea et al. (1984), deve haver uma combinação ideal entre o FMA e a planta, ou seja, os simbiossiontes devem ser compatíveis. Existem plantas que dependem totalmente da simbiose, como é o caso da mandioca; outras, como as crucíferas, produzem substâncias que são fungitóxicas, como os glicosinolatos, e inibem a colonização.

Segundo Pereira (1995), o pH do solo pode afetar a associação fungo-raiz hospedeira, seja por seus efeitos diretos sobre a permeabilidade das membranas do fungo e da planta, ou por efeitos indiretos na disponibilidade de nutrientes. Fungos micorrízicos arbusculares podem ser encontrados em solos com pH variando de 2,7 a 9,2 (Bowen, 1980), ocorrendo, entretanto, diferenças entre as espécies e isolados de fungos quanto à capacidade de germinar e colonizar o hospedeiro em função do pH do solo.

A salinidade do solo também influi na simbiose, sendo que sódio e cloro reduzem a germinação dos esporos (Silveira, 1992). Também o excesso de umidade do solo exerce um efeito negativo sobre a germinação dos esporos, colonização das raízes e esporulação dos fungos. Reid & Bowen (1979) enfatizam que a colonização é geralmente mais rápida quando a umidade do solo é menor que a capacidade máxima de retenção de água.

A aeração é outro fator importante para o estabelecimento da simbiose, uma vez que esses fungos possuem processo de germinação de esporos estritamente aeróbico, até o estabelecimento e efeito da associação (Silveira, 1992). Segundo Saif (1981), o comprimento de raízes colonizadas aumentou duas vezes e a quantidade de vesículas cinco vezes, quando o nível de O₂ do solo passou de 2 para 21 %.

Presença de nematóides micófagos e colêmbolas (pequenos artrópodes), os quais se alimentam do micélio, e certos fungos que parasitam propágulos de FMAs podem reduzir o micélio e o número de esporos, de acordo com Silveira (1992).

A presença de metais pesados no solo pode não ser capaz de inibir a germinação dos esporos e a colonização das raízes, uma vez que esses fungos são capazes de promover a imobilização desses metais na rizosfera, diminuindo ou até mesmo anulando seu efeito fungitóxico (Barea et al., 1984).

De acordo com Silveira (1992), muitos pesticidas inibem o estabelecimento da micorriza. Dentre os fumigantes, os mais tóxicos para os FMAs são cloropicrina, formaldeído, milone, brometo de metila, vapam e vorlex. Muitos nematicidas podem favorecer a associação micorrízica. Os fungicidas sistêmicos, como o brometo de metila, inibem a micorrização, agindo tanto nas estruturas externas do fungo, mas também na sua eliminação dentro dos tecidos colonizados. Fungicidas não sistêmicos podem ser menos prejudiciais. Há relatos que alguns inseticidas podem inibir a micorrização.

2.4 Efeitos nutricionais das micorrizas sobre a planta hospedeira

2.4.1 No crescimento

A micorriza arbuscular, na maioria dos casos, estimula o crescimento vegetal, como consequência de seu efeito sobre a nutrição mineral da planta, principalmente no aumento da absorção de fósforo. A simbiose não só aumenta a biomassa vegetal, como também influencia a proporção na qual esta se distribui entre a parte aérea e a raiz. O estímulo da captação de nutrientes e posterior translocação destes à parte aérea causa, relativamente, menor transferência de fotossintatos à raiz e maior retenção deles na parte aérea, sendo utilizado na produção de matéria verde. Como consequência, a relação peso da matéria seca da parte aérea/peso da matéria seca da raiz é, em geral, mais

elevada em plantas micorrizadas, quando comparada às plantas não micorrizadas (Silveira, 1992; Smith, 1980).

Entretanto, em algumas condições, observam-se efeitos negativos da micorriza sobre o crescimento das plantas, mas na maioria das vezes, esses efeitos ocorrem de forma transitória, normalmente nos estágios iniciais da colonização micorrízica, quando o fungo funciona simplesmente como parasita, competindo por fotossintatos com a própria planta hospedeira (Schwob et al., 1998), ou quando as condições de fotossíntese são sub-ótimas com relação à luminosidade, temperatura, ou quando a oferta de fósforo no substrato é tal que a planta não necessita do fungo para sua nutrição, situação em que o fungo também estaria funcionando como um autêntico parasita (Barea et al, 1984).

Há relatos da existência de interações entre FMAs e bactérias diazotróficas, propiciando maior crescimento das plantas micorrizadas. Na cultura do tomateiro (El-Raheem et al., 1989) e da batata-doce (Paula, 1992), essa interação estimulou a infecção bacteriana, promovendo o crescimento e aumentando os teores de nutrientes nas plantas. Esses efeitos podem ocorrer pelo incremento na absorção de P pelas plantas micorrizadas, o que daria melhores condições energéticas para o estabelecimento da associação das diazotróficas (Barea & Azcon-Aguilar, 1983). Paula et al. (1991) argumentam que os mecanismos de infecção e colonização da planta hospedeira pelas bactérias diazotróficas poderiam ser mediados pela infecção micorrízica, uma vez que no processo de penetração das hifas infectivas ocorre maior exsudação de nutrientes, o que poderia acelerar o crescimento das bactérias diazotróficas.

2.4.2 Na absorção de nutrientes

O fósforo é um elemento importante a todas as formas de vida por fazer parte de biomoléculas como os ácidos nucleicos, ATP, muitos açúcares fosfatados intermediários da respiração e da fotossíntese, bem como integrante

dos fosfolipídeos das membranas vegetais, além de ser um dos mais importantes nutrientes envolvidos na resposta de crescimento das plantas micorrizadas (Silveira, 1992). Por essa razão, a grande maioria dos estudos envolvendo micorrizas dão ênfase a esse nutriente.

As plantas e os organismos vivos do solo absorvem P na forma de ortofosfato solúvel (PO_4^{-2}), o qual se encontra normalmente em concentrações muito baixas na solução do solo (2 a 5 μM). Segundo Fernandes et al. (2003), a deficiência de fósforo nos solos brasileiros é uma das maiores limitações aos bons rendimentos das culturas, principalmente quando se trata de solos ácidos e com elevada capacidade de fixação de P por compostos de alumínio e de ferro.

O ciclo do fósforo é aberto e flui das rochas para o fundo dos oceanos, tendo maior intensidade entre a biota e o solo. Devido ao intemperismo químico de rochas e minerais e da atividade microbiana, o fluxo global de P já aumentou em cerca de 400 vezes. Isso se torna motivo de preocupação devido aos potenciais efeitos ambientais de P como agente eutrofizante e recurso natural finito. A principal fonte de P para os seres vivos são as rochas fosfáticas que constituem um recurso natural não renovável que precisa ter seu uso racionalizado, pois se estima que as reservas de P se esgotarão nos próximos 80, 100 anos (Moreira & Siqueira, 2006).

A absorção de P é um processo ativo, acontecendo contra um gradiente de concentração, tendo-se em vista que, no citoplasma, deve-se manter uma concentração entre 5 e 10 mM. Devido à alta exigência das plantas e à baixa disponibilidade no solo, esse nutriente é quase sempre muito limitante ao crescimento delas, que geralmente apresentam um déficit nutricional de P (Moreira & Siqueira, 2006).

O processo de transporte de fosfato da solução do solo à planta, mediado pelo FMA, divide-se em 3 fases, segundo Silveira (1992). Inicialmente, ocorre a captação do fosfato pelo micélio externo. A velocidade de captação do íon é

função da velocidade com que este chega à superfície da raiz, o que depende, por sua vez, da mobilidade e concentração na solução do solo. No caso dos íons fosfatos, sua concentração na solução edáfica é de 10^{-6} M e sua difusão é muito lenta, além do fato de sofrerem, freqüentemente, o processo de fixação ou precipitação com cálcio, ferro ou alumínio. Uma vez alcançada a rizosfera, as raízes absorvem o fosfato a uma velocidade superior à sua liberação para a solução do solo, formando uma zona de depleção de fósforo (1-2 mm) ao redor da raiz. As hifas do fungo micorrízico são capazes de crescer e se ramificar para além da zona de depleção, chegando a alcançar vários centímetros de distância da superfície da raiz.

Portanto, o FMA atua por um mecanismo físico, proporcionando à raiz um aumento no número de sítios de absorção de fósforo, ao mesmo tempo que explora um maior volume de solo.

O fosfato (PO_4^{-2}) é absorvido pela hifa externa através da alta atividade de bombas H^+ATPase , sendo convertidos e acumulados no vacúolo como grânulos de polifosfato, pela enzima polifosfatoquinase específica; esse armazenamento nos vacúolos mantém baixa a concentração de Pi dentro da hifa. Os grânulos de polifosfatos são translocados através das estruturas intra-radiciais do fungo, impulsionados por correntes citoplasmáticas até os arbúsculos. Nestes, os grânulos de polifosfato sofrem a ação de fosfatases alcalinas que se concentram nos vacúolos, sendo então liberados os Pi que são translocados ativamente para a célula cortical da raiz. Essas enzimas são inibidas com o aumento da concentração de fosfato (Silveira, 1992).

A maior participação da simbiose está na absorção de íons que se difundem lentamente no solo, como o fósforo, zinco e cobre. Sua absorção é facilitada pelas hifas externas (Siqueira et al., 2002), razão pela qual a sua contribuição para absorção de nitratos é limitada (Silveira, 1992), uma vez que

estes são mais móveis no solo. Se a difusão química no solo é limitante, as hifas podem aumentar a área de absorção em até 1800% (O'keefe & Sylvia, 1991).

Em geral, as plantas micorrizadas têm maior capacidade de absorção e por isso acumulam maiores quantidades de vários macros e micronutrientes, além de Br, I, Cl, Al, Si e metais pesados. Diminuição nos teores de Mn e Al em planta micorrizada sugere que, talvez, a simbiose desempenhe algum papel de proteção direta da planta à toxicidade desses elementos e/ou esteja envolvida num mecanismo de exclusão desses elementos (Silveira, 1992). Os teores de N, K, Ca, Mg e Na são geralmente menores, enquanto os de S e P são maiores. A diminuição nos teores é devida à diluição pelo maior crescimento e não à sua menor absorção (Moreira & Siqueira, 2006).

2.4.3 Na absorção e metabolismo do nitrogênio

O nitrogênio (N) é, também, um dos fatores limitantes do crescimento das plantas (Malavolta, 1980). As principais formas desse elemento no solo, disponíveis às plantas, são a nítrica (NO_3^-) e a amoniacal (NH_4^+), enquanto o restante do nitrogênio, que está na forma orgânica, não é prontamente disponível para as plantas.

A nutrição nitrogenada depende, portanto, da mineralização do nitrogênio orgânico até a obtenção de formas aproveitáveis pelas plantas. Assim, as plantas adquirem o nitrogênio mineral basicamente nas formas de nitrato (NO_3^-) ou amônio (NH_4^+), e podem apresentar respostas fisiológicas muito diferentes a esses íons, bem como capacidade diferenciada em absorvê-los e metabolizá-los.

Há estudos que demonstram que as micorrizas arbusculares absorvem e transferem até 49% do nitrogênio incorporado na planta (Johansen et al, 1994, citado por Pereira et al. (1996). Embora haja confirmação da importância das micorrizas arbusculares no processo de absorção e assimilação de nitrogênio

(Smith & Read, 1997), ainda se sabe muito pouco sobre sua translocação e transferência para as raízes das plantas hospedeiras (Bago et al., 2001). E raros são os estudos que investigam as enzimas-chave do metabolismo do nitrogênio em simbiose micorrízica arbuscular (Subramanian & Charest, 1999).

Vale ressaltar que as ectomicorrizas, ou seja, micorrizas formadas por fungos que não penetram as células corticais, dominam ambientes pobres em nitrogênio, ao passo que as endomicorrizas dominam aqueles pobres em fósforo (Vogt et al., 1991) e a maioria dos estudos disponíveis, envolvendo o metabolismo do nitrogênio, foram realizados com ectomicorrizas.

Govindarajalu et al. (2005) informam que não há evidências de alteração na rota metabólica do N na planta, mas plantas micorrizadas apresentam maior assimilação de NH_4^+ no MER (alta atividade da glutamina sintetase), produção de glutamina e translocação de N via xilema. Ainda de acordo com esses autores, o MER pode absorver tanto o NH_4^+ , quanto NO_3^- , possuindo todas as enzimas necessárias para sua assimilação em aminoácidos, os quais são translocados para o MIR.

Em vista da alta mobilidade do NO_3^- , mas geralmente baixa mobilidade de NH_4^+ nos solos, uma importante contribuição das hifas externas na nutrição do hospedeiro pode ser uma melhor captação de NH_4^+ , em comparação com NO_3^- (Marschner & Dell, 1994), o que é confirmado por López-Pedrosa et al. (2006), citados por Cruz et al (2007), que encontraram um transportador de alta afinidade para NH_4^+ em hifas do FMA *Glomus intraradices*, o que reforça a idéia de que o fungo capta tanto amônio quanto nitrato.

Se os efeitos das micorrizas arbusculares na absorção de N pelas plantas forem tão generalizados quanto aqueles verificados para o P, o papel das MAs na funcionalidade dos ecossistemas será maior do que se considera, tendo em vista a deficiência generalizada no nutriente na maioria dos solos cultivados.

Análises de níveis de aminoácidos no MER revelaram que arginina (Arg) é o mais abundante aminoácido sintetizado e estocado neste micélio externo, sendo transportado para o MIR (Govindarajulu et al., 2005; Bago et al. 2001). Segundo Jin et al. (2005), o NH_4^+ é a mais provável forma de N transferido ativamente para as células hospedeiras, após sua geração através da quebra da Arg.

Toussaint et al (2004) e Bago et al. (2001) citam que não há evidências da translocação de NO_3^- e/ou NH_4^+ do MER para o MIR, sendo mais provável que o N seja, de fato, translocado na forma de aminoácidos. Assim, Bago et al. (2001) propuseram um modelo especulativo que mostra que tanto o nitrato quanto o amônio podem ser assimilados em glutamina no MER (Fig. 2).

Esse modelo não especifica outras enzimas, além da redutase do nitrato (RN), cuja atividade tem sido encontrada em esporos de FMAs (Ho & Trappe, 1975), e em extratos de raízes micorrizadas (Subramanian & Charest, 1999).

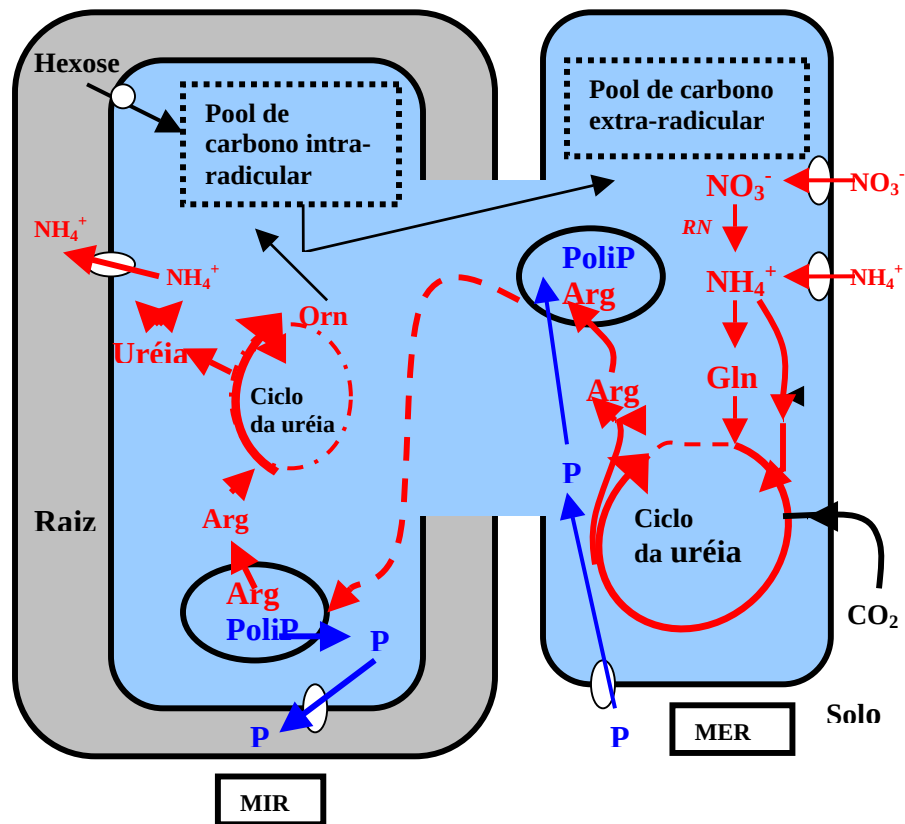


FIGURA 2: Modelo proposto através do qual o ciclo da uréia, junto com a translocação de arginina, poderia atuar para movimentar o N na simbiose. O fluxo de N está representado em vermelho; o de fósforo, em azul; o de carbono, em preto. Adaptado de Bago et al. (2001). Lavras, MG, 2007.

De acordo com a Fig. 2, o nitrogênio adquirido diretamente do solo é metabolizado para glutamina, pela ação da enzima glutamina sintetase (GS) no MER. Segundo Johansen et al. (1996), o ciclo GS/GOGAT pode ser responsável pela assimilação do amônio no MER; mas, o envolvimento da GDH (glutamato desidrogenase) não tem sido excluído (Pateman & Kinghorn, 1975, citados por Bago et al., 2001).

Entretanto, o passo-chave na transformação do nitrogênio assimilado em Arg é a síntese do intermediário carbamil fosfato, cujas enzimas que catalizam estas séries de reações usam preferencialmente a glutamina como fonte de nitrogênio (Thoden et al., 1997).

Devido ao fato de todas as fontes endógenas ou exógenas de nitrogênio serem convertidas para NH_4^+ , a atividade da GS tem sido maior em sistemas de raízes micorrizadas (Govindarajulu et al., 2005), não só devido à enzima fúngica, mas também à enzima da própria raiz vegetal.

Ainda de acordo com a Figura 2, a Arg é produzida pelo braço anabólico do ciclo da uréia, no MER, o qual apresenta alta atividade de GS e argininosuccinato sintetase (ASS), segundo Cruz et al. (2007). A Arg produzida é, então, importada para dentro de vacúolos, onde se liga aos grânulos de polifosfatos, movendo-se ambos para o MIR.

Dentro do MIR, Arg e P são liberados para o citoplasma do fungo simbiote, onde aquela será hidrolizada pelo braço catabólico do ciclo da uréia, produzindo uréia e ornitina, e finalmente o amônio, o qual é transferido para a raiz hospedeira. Essa atividade de hidrólise da arginina pelo ciclo da uréia dentro do MIR é confirmada pela alta atividade das enzimas urease e arginase.

Os esqueletos de carbono resultantes podem ser reincorporados para o *pool* de carbono do fungo. O amônio liberado para a raiz hospedeira é, então, assimilado em glutamina através da ação da GS do vegetal (Cruz et al., 2007).

A redutase do nitrato (RN) é uma enzima-chave no metabolismo do nitrogênio nos vegetais, pois cataliza o primeiro passo na conversão de NO_3^- , que é a principal forma de N-inorgânico presente nos solos cultivados, em N-orgânico que será utilizado no metabolismo vegetal. O nitrato aumenta a expressão do mRNA da RN, e leva a aumentos na sua atividade. A luz, através da ativação da fotossíntese e produção de açúcares, estimula o gene promotor da

redutase do nitrato (Vincentz et al., 1993) e a atividade da enzima (Lillo et al., 2004), via desfosforilação de resíduos de serina na enzima.

Em seringueira, o sítio preferencial de redução do NO_3^- ainda parece ser, exclusivamente, as raízes (Alves, 2001; Delú-Filho, 1994; Lemos et al., 1999). Entretanto, Shan (2007)*, utilizando ensaio *in vitro*, encontrou, além de atividade nas raízes, fraca atividade da enzima nos caules de plantas jovens de seringueira.

Apesar de toda a sua importância, estudos envolvendo a atividade da enzima RN em plantas micorrizadas têm recebido pouca atenção, quando se compara com o volume de estudos sobre o efeito dessa associação simbiótica na nutrição fosfatada (Bowen & Smith, 1981).

No geral, as plantas bem nutridas de P apresentam uma maior atividade da RN tanto em raízes quanto na parte aérea. Contudo, segundo Oliver et al. (1983), poucos trabalhos objetivaram avaliar se essa maior atividade é devida ao efeito da melhoria na adubação fosfática ou à colonização micorrízica em si.

Estudos que visem relacionar os efeitos das micorrizas arbusculares com uma melhor utilização do nitrogênio do solo são de extrema importância ecológica quando se pretende a implantação de mudas em solos pobres em nitrogênio, especialmente aqueles sujeitos a déficits hídricos, como ocorre nas regiões de escape onde a seringueira vem sendo implantada, condição em que o nitrogênio nítrico se torna menos móvel no solo.

Portanto, de acordo com Moreira & Siqueira (2006), os mecanismos da melhoria nutricional podem ser assim resumidos: aumento da superfície de absorção e exploração do solo; aumento da capacidade de absorção da raiz; absorção de nutrientes disponíveis, mas não acessíveis às raízes não micorrizadas, diretamente pelas hifas ou, indiretamente, através de favorecimento no desenvolvimento das raízes absorventes; armazenagem

* SHAN, A. Tese. Universidade Federal de Lavras. 2007. No prelo.

temporária de nutrientes na biomassa fúngica ou nas raízes, evitando sua imobilização química ou biológica e lixiviação; favorecimento dos microrganismos mineralizadores e solubilizadores de nutrientes e diazotróficos na micorrizosfera; favorecimento na nodulação e fixação de N₂ em leguminosas; amenização dos efeitos adversos do pH, Al, Mn, metais pesados, salinidade, estresse hídrico, pesticidas, poluentes orgânicos e ataque de patógenos do sistema radicular sobre a absorção de nutrientes; produção de ácidos orgânicos eficazes na solubilização das formas de P no solo; produção de quelantes e complexantes capazes de mobilizar principalmente P ligado a ferro.

2.5 Efeitos não nutricionais dos FMA sobre as plantas hospedeiras

2.5.1 Relação água-planta

Dentre os efeitos não nutricionais, o mais importante é o favorecimento da relação água-planta (Moreira & Siqueira, 2006). A resistência difusiva (Rs) mede o comportamento dos estômatos em resposta à perda de vapor de água. Altas resistências indicam o fechamento dos estômatos, o qual torna mais lenta a perda de vapor de água, reduz a absorção de CO₂ e, conseqüentemente, a fotossíntese (Larcher, 2000). Segundo Hsiao (1973), o fechamento dos estômatos é a estratégia mais comumente utilizada pela planta para manter a turgescência durante as horas mais quentes do dia e para diminuir a taxa de transpiração. Esse mecanismo, entretanto, pode prejudicar a atividade fotossintética devido ao impedimento à entrada de CO₂, com conseqüente redução no crescimento da planta (Boyer, 1971).

Augé et al. (2004) observaram que plantas micorrizadas mantêm uma maior condutância estomática durante períodos de déficits hídricos e, conseqüentemente, menor resistência difusiva. Essa contribuição dos fungos micorrízicos arbusculares em cultivos sujeitos às deficiências hídricas é, de fato, importante, pois estimula o crescimento do vegetal, uma vez que a simbiose se

tenha estabelecido de forma eficiente. Entretanto, a colonização de sistemas radiculares por FMAs pode afetar o comportamento estomático das plantas hospedeiras (Augé, 2000), mesmo sob condições de boa hidratação (Nelsen & Safir, 1982; Augé et al., 1986).

Segundo Augé et al. (2004), o aumento da condutância estomática (gs) ao vapor de água pelo FMA tem sido relatado para um grande número de plantas hospedeiras.

O aumento da captação de nutrientes tem, algumas vezes, resultado em uma redução da resistência estomática, e conseqüente aumento da gs, ou da transpiração, onde plantas melhor nutridas (H_2O e minerais) podem apresentar uma condutância estomática maior à de plantas com limitações nutricionais (Graham & Syvertsen, 1984), especialmente de fósforo (Fitter, 1988; Moreira & Siqueira, 2006).

De acordo com Augé (2001), plantas micorrizadas realizam maiores taxas de trocas gasosas em comparação com plantas de mesmo tamanho e concentração de fósforo foliar, porém não micorrizadas. Isso sugere que existem outros mecanismos, além da melhora nutricional, que influenciam na gs, mas isso ainda não está satisfatoriamente esclarecido. Além disso, uma vez que o fungo simbionte conta com os fotoassimilados derivados da planta hospedeira, Augé et al. (2004) especulam que a promoção da gs pelas MAs pode ser relativamente alta em uma baixa irradiância.

Outras explicações para o efeito das MAs sobre a gs incluem uma maior condutividade hidráulica das raízes micorrizadas ou da planta toda (Allen et al., 1980); alteração no balanço hormonal (Drüge & Schönbeck, 1993); aumento na capacidade de absorção de água pelas hifas extra-radiculares (Faber et al., 1991) e uma maior eficiência no uso da água. Plantas de alface micorrizadas mostraram maiores taxas de trocas de CO_2 , transpiração, condutância estomática

e eficiência do uso da água para algumas espécies de fungos testadas (Ruiz-Lozano & Azcón, 1995).

Schwob et al. (1998), trabalhando com *Hevea brasiliensis* inoculada com o fungo micorrízico arbuscular *G. mosseae*, em condições de boa hidratação, associam o maior crescimento das plantas a uma maior captação de água pelas raízes e uma alta atividade fotossintética, a qual pode ser devida a um aumento na condutância estomática das plantas.

Como não se têm encontrado registros de estudos envolvendo aspectos de ecofisiologia em *Hevea brasiliensis* micorrizada, em condições de boa hidratação e/ou déficit hídrico, informações sobre o assunto poderão fornecer subsídios sobre os benefícios que a associação pode proporcionar no estabelecimento e desenvolvimento de mudas de seringueira para produção de porta-enxertos, principalmente em locais ou épocas onde o déficit hídrico torna-se fator limitante ao crescimento da planta.

2.5.2 Anatomia e morfologia da raiz

De acordo com Siqueira et al. (2002), não são reportadas mudanças na morfologia do sistema radicular de raízes infectadas por fungos micorrízicos arbusculares, como ocorre na colonização por ectomicorrizas (formação do manto) ou por rizóbio (formação de nódulos).

Uma das conseqüências mais freqüentes da colonização do FMA é um aumento da ramificação, com raízes maiores e mais profundas, resultando em uma proporção relativamente maior de raízes no sistema radicular, especialmente em plantas habitando solos sujeitos a déficits hídricos.

Na maioria dos estudos com FMAs, as raízes não têm sido examinadas quanto às alterações anatômicas, exceto alguns trabalhos relacionados à resistência a metais pesados. Silva (2006) observou que isolados de FMAs são capazes de exercer proteção à *B. decumbens* contra o excesso de metais,

reduzindo os danos desses metais aos tecidos foliares e radiculares, aumentando o parênquima lignificado, exoderme e endoderme que são barreiras naturais apoplásticas e diminuindo os vasos xilemáticos. Essas alterações têm relações diretas com os processos de translocação dos elementos na planta e ocorrem no sentido de reduzir a translocação. É razoável sugerir que tais alterações estejam envolvidas na proteção da *B. decumbens* ao excesso de metais pesados.

Espécies nativas, como a seringueira, estão sendo reintroduzidas no Brasil, sendo essa espécie susceptível ao ataque de suas raízes pelo nematódeo *Meloidogyne exigua*, o qual causa severos danos (Santos, 1992; Santos et al., 1992, citados por Schwob et al., 1999). As raízes de *Hevea* quando micorrizadas são mais lignificadas do que aquelas não micorrizadas (Schwob et al., 1999). Quando o FMA penetra a raiz, eles induzem a um aumento na lignificação da parede celular, o que protegeria as raízes da penetração por outros patógenos (Morandi, 1996). Schwob et al. (1999) mostram a importância de se manter a colonização micorrízica das raízes de *Hevea*, devido ao possível efeito profilático (mas não curativo) dos FMAs sobre a infecção de *M.exigua*.

2.5.3 Alterações bioquímicas na planta

Os fungos micorrízicos arbusculares provêem água e nutrição para suas plantas hospedeiras e, em retorno, as plantas hospedeiras transferem seus carboidratos produzidos no processo fotossintético para o FMA, que o utilizará como fonte de energia.

O FMA aumenta a distribuição de açúcares solúveis totais para as raízes de plantas inoculadas (Wu & Xia, 2006). Segundo esses autores, 46 % dos açúcares (sacarose, glicose, frutose) localizam-se nas raízes de plantas micorrizadas contra 43% nas raízes de plantas não micorrizadas, ambas sob condições de boa hidratação.

A simbiose demanda açúcares solúveis que são providenciados pela planta hospedeira. Apesar de apenas 10% a 17% da matéria seca das MAs (micorrizas arbusculares) serem biomassa fúngica (Tinker, 1978; Hepper, 1977), o simbionte funciona como um competidor por produtos elaborados pela planta, pois ela aumenta a respiração das raízes em até 74% (Pang & Paul, 1980, citados por Sena, 1998) e causa acúmulo de carbono no citoplasma das células corticais. A abundância de lipídios nos arbúsculos, vesículas e hifas, bem como a alta concentração de fosfolipídios e triglicerídios em raízes micorrizadas, comparado àquelas não micorrizadas, justificam essa demanda de energia (Nagy et al., 1980).

Para compensar essas perdas, as plantas colonizadas exibem maiores taxas fotossintéticas, o que é primariamente devido às adaptações morfológicas, que resultam em aumento de área foliar (Sennelgrove et al., 1982) e possíveis alterações no número e estrutura dos cloroplastos.

Em experimentos com Citrus utilizando-se o ^{14}C , as raízes micorrizadas acumularam de 66% a 68% de seus fotossintatos marcados (Koch & Johnson, 1984, citados por Sena, 1998), sendo que essa distribuição foi independente do status de P nas folhas. Entretanto, o processo de transferência de carboidratos do hospedeiro para o FMA não está ainda totalmente esclarecido. Além disso, o FMA converte os açúcares absorvidos do hospedeiro em compostos de armazenamento que não estão prontamente disponíveis para a planta, como o glicogênio, manitol (no caso de ectomicorrizas) ou trehalose (Bago et al., 2000). As estimativas variam, mas as plantas hospedeiras têm demonstrado que direcionam 4 a 20% mais fotoassimilados para o sistema de raízes micorrizadas (Graham, 2000).

Além disso, as raízes micorrizadas apresentam diferença não só na concentração, mas também no padrão de proteínas em relação às não-micorrizadas, o que pode ser consequência de fatores como a alta atividade

metabólica nas células de raízes contendo os arbúsculos, e também devido à presença de micélio fúngico interno e externo (Arines et al., 1993).

Auxinas e citocininas acumulam-se em maiores quantidades em plantas micorrizadas (tanto na parte aérea quanto nas raízes), sendo que os fungos micorrízicos podem influenciar o crescimento da planta hospedeira pela produção desses compostos hormonais. Allen et al. (1980), trabalhando com plantas de *B. gracilis*, observaram maior concentração de citocininas em folhas (57%) e raízes (111%). Aumentos nos níveis de citocininas estão envolvidos no aumento de fotossíntese e crescimento de *Linum usitatissimum* micorrizado (Drüge & Schönbeck, 1993). Barroso et al. (1986) observaram a produção de compostos com atividade auxínica por fungos ectomicorrízicos, tendo sugerido a transferência desses compostos do fungo para a planta hospedeira durante o estabelecimento da associação micorrízica.

2.6 A seringueira e a associação micorrízica

A seringueira (*Hevea brasiliensis*) está entre as espécies arbóreas brasileiras naturalmente infectadas pelos FMAs (Tawaraya et al., 2003), porém não se encontra ainda uma informação precisa sobre os efeitos que essa associação possa trazer para a cultura, especialmente em nível de produção de porta-enxertos.

De acordo com Bataglia & Santos (1998), a fase de produção de mudas de seringueira, principalmente em grandes viveiros, requer uma adubação cujo objetivo é a produção de mudas uniformes, com alto aproveitamento para a enxertia e redução do tempo de permanência no viveiro. A adubação, nessa fase, deve suprir, pelo menos, os nutrientes removidos para a produção da parte aérea dos porta-enxertos.

Entretanto, apesar da adubação ser fator de grande importância para a heveicultura, são ainda escassas as pesquisas envolvendo a produção de mudas

de seringueira inoculadas artificialmente com uma determinada população de espécies de FMAs pré-selecionados, os quais poderiam contribuir para o melhor desenvolvimento das mudas em regiões de déficit nutricional no solo, levando também a uma economia no uso de fertilizantes, sem onerar o custo da produção.

D'Angremond & Van Hell (1939), citados por Schwob et al. (1999), foram os primeiros a demonstrar a presença de um endófito dentro do córtex de raízes de seringueira. Posteriormente, a associação micorrízica em seringueira foi também relatada por Wastie (1965), citado por Janos (1980).

Ikram & Mahmud (1984), citados por Lopes (1988), observaram a presença de esporos dos gêneros *Glomus*, *Gigaspora*, *Sclerocystis* e *Acaulospora*, ocorrendo em quantidades significativas em solos sob seringais, além de índices de colonização micorrízica variando de 0 a 50%.

Efeitos positivos da micorrização sobre mudas de seringueira inoculadas com *Glomus mosseae* foram também observados por Schwob et al. (1998), como aumentos das taxas de assimilação de CO₂, taxas de transpiração e condutância estomática, além de um maior crescimento vegetativo das mesmas.

Lima et al. (1986) observaram um aumento de 120 % no peso de matéria seca da parte aérea de mudas de seringueira micorrizadas em relação às mudas não micorrizadas, além de aumento de 30% no teor de P e aumento no diâmetro dos caules em mudas inoculadas com *Glomus clarum*, sugerindo uma resposta positiva da espécie à micorrização, com possibilidade de obtenção mais rápida de plantas em condições adequadas para a enxertia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Época e localização do experimento

Este trabalho foi desenvolvido no período compreendido entre Julho de 2006 a março de 2007, em casa de vegetação do setor de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, localizada a 918 m de altitude, latitude 21°14'S e longitude 45°00'W GRW.

3.2 Obtenção e caracterização da amostra de solo

O solo utilizado para o plantio das mudas de seringueira foi oriundo de um latossolo vermelho de textura muito argilosa, coletado de uma encosta localizada dentro do campus universitário da Universidade Federal de Lavras - MG. Uma amostra desse solo foi encaminhada para caracterização química e física (quadro 1) no laboratório de química e análises de solos do Departamento de Solos da Universidade Federal de Lavras, MG, e apresentou as seguintes características químicas e físicas.

QUADRO 1: Características químicas e físicas da amostra de solo.

PH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al
H ₂ O	Mg/dm ³			Cmolc/dm ³			
5,7	1,7	31	-	1,5	0,7	0,0	2,6

SB	(t)	(T)	V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
Cmolc/dm ³			%			Dag/Kg	Mg/L	Mg/dm ³					
2,3	2,3	4,9	46,7	0	-	2,4	3,9	-	-	-	-	-	-

Areia	Silte	Argila	Classe textural
Dag/Kg			
12	14	74	Muito argilosa

PH em água, KCl e CaCl₂ – Relação 1:2,5

P-Na-K-Fe_ZN-Mn-Cu – extrator Mehlich 1

Ca-MG-Al- Extrator: KCl 1N

H+Al- Extrator: SMP

B-Extrator água quente

S- Extrator – Fosfato monocálcico em ácido acético

SB= soma de bases trocáveis

CTC (t): capacidade de troca catiônica efetiva

CTC(T)- capacidade de troca catiônica a pH 7,0

V= índice de saturação de bases

M= índice de saturação de alumínio

ISNa- índice de saturação de sódio

Mat. Org. (MO)- oxidação: Na₂Cr₂O₇ 4N + H₂SO₄ 10N

P-rem= fósforo remanescente

3.3 Obtenção do inóculo do fungo micorrízico *Glomus clarum*

O fungo micorrízico arbuscular da espécie *Glomus clarum* foi obtido de vaso de cultivo com *Brachiaria decumbens*, proveniente do Departamento de Microbiologia de Solos da Universidade Federal de Lavras-MG. O inóculo consistiu de uma mistura de substrato (areia) e raízes trituradas de *B. decumbens*, contendo esporos, hifas e vesículas do fungo.

3.4 Obtenção do material vegetal

As sementes de seringueira foram originárias da Fazenda Água Milagrosa, Tabapuã - São Paulo, coletadas em fevereiro de 2006 e mantidas armazenadas por 5 meses em sacos de papel revestidos com sacola plástica, contendo cerca de 1 quilo de sementes por saco, em armário arejado e à temperatura ambiente. Esses sacos de armazenamento eram trocados a cada 20 dias de acordo com recomendações de Bonome (2006). As sementes foram germinadas em bandejas plásticas, contendo areia lavada com água de torneira e posteriormente com água destilada, em condições de sala de germinação (temperatura de 27°C, radiação de aproximadamente 300 $\mu\text{mol. S}^{-1}$, fotoperíodo de 12 horas e 60 a 80% de umidade relativa do ar). A umidade das bandejas foi mantida a 80% da capacidade de campo.

3.5 Preparo das amostras de solo, plantio, inoculação e adubação

O solo, classificado como muito argiloso, foi misturado posteriormente à areia lavada na proporção 1 solo :1 areia. A adubação fosfatada consistiu de 2 doses de fósforo na forma de fosfato super triplo, o qual fornece aproximadamente 41% de P. O solo fora dividido em duas partes, sendo que uma delas foi adubada com 50 mg/dm^3 , destinados aos tratamentos micorrizado e não micorrizado em baixo nível de P, e a outra parte foi adubada com 500 mg/dm^3 , para o segundo tratamento não micorrizado em alto nível de P.

Posteriormente, as duas partes de solo foram fumigadas com o fungicida Brometo de Metila em dosagem de $393 \text{ cm}^3/\text{m}^3$ de substrato. Não foi considerada a necessidade de calagem do substrato, com base no valor de pH apresentado pela análise do solo.

Após fumigação e volatilização do excesso de Brometo de Metila (aproximadamente 10 dias), o solo foi transferido para sacos de plástico com capacidade para 3 dm^3 de substrato.

O transplantio foi feito com as plântulas no estádio, comumente chamado “palito”, sendo utilizadas as plântulas que estavam com alturas entre 5 e 10 cm. Cada plântula foi introduzida com suas raízes no furo de plantio, de forma tal que, no tratamento de inoculação, essas raízes tivessem contato direto com o inóculo.

Os tratamentos sem inoculação receberam 10 ml de um filtrado preparado a partir do substrato do inóculo diluído em água de modo a se obter uma suspensão, peneirada em malha de 0,71 e 0,053 mm e filtrada em papel de filtro para eliminar os propágulos de FMAs. A finalidade desse filtrado é homogeneizar a população microbiana do inóculo em todos os tratamentos.

Após o transplantio, procedeu-se à adubação de cada saco de cultivo, em forma de solução, de acordo com Malavolta (1980), a qual consistiu de: 20 ml de uma solução de uréia, a qual forneceu 100 ppm de N. Essa solução foi preparada separadamente dos outros nutrientes. 20 ml de uma solução contendo 100 ppm de K (KCl) e 30 ppm de Mg (MgSO_4), 10 ml de uma solução contendo 5 ppm de Zn (ZnSO_4), 1,5 ppm de Cu (CuSO_4) e 5 ppm de Mn (MnSO_4); 10 ml de uma solução contendo 0,5 ppm de B (H_3BO_3); 10 ml de uma solução contendo 0,1 ppm de Mo (Molibdato de amônio). A concentração de enxofre adicionado pelas fontes sulfatadas foi aproximadamente 41,7 ppm. Ressalta-se que os macronutrientes foram aplicados inicialmente em concentração abaixo daquela

recomendada, a fim de se evitar uma possível inibição da colonização micorrízica devido à fertilização.

Os sacos de cultivo foram irrigados diariamente, mantendo-se a umidade do substrato a aproximadamente 70% da capacidade de campo, sendo a irrigação cuidadosa, a fim de se evitar a contaminação entre os recipientes de cultivo. Estes foram mantidos em casa de vegetação durante todo o período de condução do experimento, tomando-se todo o cuidado para não permitir a lixiviação dos adubos através dos sacos de cultivo.

Aos 35 e 60 dias após o plantio, foi necessária a pulverização de um fungicida não sistêmico (Kumulus), diluído em água, à base de enxofre e material inerte, na dosagem de 2g/L, para combate à presença de oídeos nas folhas.

Aos 100 dias após o plantio, foi aplicado o acaricida Vertimec em solução aquosa na dosagem de 0,5 ml/litro, para combate a ácaro.

Aos 60 e 120 dias após o transplantio das mudas, foram aplicados em todos os tratamentos 100 ppm de N na forma de uréia e 100 ppm de K na forma de KCl.

Aos 180 dias foram aplicados mais 100 ppm de N na forma de uréia e mais 30 ppm de Mg na forma de MgSO₄.

O experimento foi constituído por três tratamentos:

Plantas micorrizadas e cultivadas em 50 ppm de P (baixo nível de P) = **mic +50P**

Plantas cultivadas em 50 ppm de P (baixo nível) = **s/mic +50P**

Plantas cultivadas em 500 ppm de P (alto nível de P) = **s/mic +500P**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com uma planta por unidade experimental e 20 plantas por tratamento. Dessas 20 plantas, 10 foram destinadas às análises de crescimento e análises biofísicas, das quais se obtiveram 7 plantas para análise de área foliar, massa seca de parte aérea, raiz e

massa seca total. 7 plantas foram destinadas à avaliação de colonização radicular pelo fungo endomicorrízico, teores de clorofila, anatomia foliar e radicular, incluindo a microscopia eletrônica de varredura em raízes. As três plantas foram destinadas à avaliação da atividade radicular da redutase do nitrato.

Todo o experimento foi conduzido por um período de 195 dias a contar do transplantio das mudas e inoculação.

3.6 Características avaliadas

3.6.1 Altura e diâmetro dos caules

Foram efetuadas medições mensais em 10 plantas por tratamento, de altura das plantas (do colo ao meristema apical) e diâmetro do caule a uma distância de 7 cm da superfície do solo. Essas medições foram realizadas 15 dias após o plantio e inoculação das plântulas, se repetindo a cada 30 dias. Vale ressaltar que as plantas utilizadas para as medições de altura e diâmetro dos caules foram as mesmas utilizadas para as análises biofísicas ao final do experimento.

3.6.2 Área foliar

No final do experimento, foram feitas as medidas de área foliar, a partir de 7 plantas por cada tratamento (escolhidas entre as 10 plantas nas quais foram efetuadas as medições de altura e diâmetro do caule e análises biofísicas), utilizando-se um aparelho Licor Li 3100 do Departamento de Engenharia, no Setor de Hidráulica da Universidade Federal de Lavras.

3.6.3 Massa seca da parte aérea e raízes

As plantas utilizadas nas avaliações de crescimento, características biofísicas e área foliar (7 plantas de cada tratamento) foram separadas em folhas, caules, raízes laterais e raízes principais. Posteriormente foram, então, levadas à

estufa de ventilação forçada a 70°C por 72 horas e com circulação de ar forçada, até a obtenção do peso constante. Após secagem, procedeu-se à pesagem para obtenção da massa seca da parte aérea, raízes e massa seca total.

Esse material seco foi posteriormente triturado em moinho *willey* para posterior utilização nas análises bioquímicas e análise foliar de nutrientes.

Ressalta-se que para obtenção da matéria seca da parte aérea, foram incorporadas as folhas que caíram das plantas durante todo o período de condução do experimento.

3.6.4 Análise de colonização radicular pelo fungo micorrízico

Ao final do experimento, estimou-se a colonização das raízes pelo fungo *Glomus clarum*, a partir de amostras de aproximadamente 1 g de raízes laterais de menor diâmetro de 7 plantas por tratamento (aproveitando-se, inclusive, as raízes retidas no substrato de cultivo por serem mais finas).

As raízes foram colocadas em placas destinadas ao preparo das raízes, sendo as mesmas mergulhadas em solução de KOH 10% a frio, onde permaneceram até total clareamento das raízes (aproximadamente 36 horas. Em seguida, o KOH foi drenado em peneira; as placas contendo as amostras foram lavadas em água corrente e colocadas em solução de HCL (1%) por 5 minutos. O HCL foi escorrido e nas amostras foi adicionada uma solução de azul de tripano em lactofenol (0,05%), onde foram deixadas imersas por 2 a 3 dias para corar as estruturas fúngicas (Phillips & Hayman 1970). Para retirar o excesso de corante, as amostras foram lavadas em água corrente.

A avaliação da colonização micorrízica foi realizada pelo método de Giovanetti & Mosse (1980), denominado “gridline intersect method”. Com auxílio de microscópio binocular com aumento de 40X, determinou-se a presença ou ausência das estruturas fúngicas em interseções de segmentos de raízes, com os retículos espaçados de ½ polegada, marcadas em placa de petri.

Após a análise microscópica das estruturas fúngicas dentro das raízes intactas, destas foram realizadas microfotografias.

3.6.5 Características biofísicas

Nos últimos trinta dias do período experimental, foram avaliadas as seguintes características: transpiração (E), temperatura foliar (°C) e resistência difusiva dos estômatos (Rs), utilizando-se um porômetro (Steady State Porometer, Licor. 1600M). Essas avaliações foram feitas entre 10 e 11 horas da manhã, a cada 10 dias, perfazendo um total de 3 leituras para cada tratamento, das quais se obteve a média. A escolha do horário de observações foi devido à elevada demanda atmosférica, característica desse horário. Essas avaliações foram feitas utilizando-se 10 plantas de cada tratamento, as mesmas utilizadas nas avaliações de crescimento, sendo selecionado de cada planta o folíolo central, completamente expandido e do terceiro nó, contado do ápice caulinar para a base, com uma mesma orientação cardinal em relação à radiação solar incidente.

3.6.6 Características anatômicas

3.6.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para observação de arbúsculos nas raízes.

As preparações das amostras e as observações para MEV foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia da UFLA.

Para a observação das raízes quanto à presença dos arbúsculos (estruturas típicas de fungos micorrízicos arbusculares) nas células corticais, foram coletadas amostras de raízes laterais de 4 cm cortadas a partir do ápice, em todos os tratamentos. Estas foram fixadas em solução Karnovisk's modificada a pH 7,2 e armazenadas em câmara fria para observação em microscopia eletrônica de varredura; em seguida, as amostras foram transferidas para glicerina (30 min) e foram efetuados os cortes transversais em nitrogênio líquido de segmentos de aproximadamente 2 mm. Os fragmentos foram lavados em água destilada e pósfixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05 mol.L⁻¹ por 1-2 horas, para posterior desidratação em gradiente de acetona (25 %, 50%, 70% e 90% por 10 minutos e três vezes por 10 minutos em 100%). Em seguida, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico (equipamento BAL-TEC, CPD-03), fixadas no suporte metálico (stubs) com ajuda de uma fita de carbono colocada sobre a película de papel alumínio dos stubs e submetidas ao processo de metalização em ouro em aparelho BAL-TEC, SCD-050. O material radicular preparado foi observado e eletromicrografado em microscópio eletrônico de varredura LEO-EVO 40, XVP.

3.6.6.2 Características anatômicas de folhas em relação ao número médio de estômatos por mm², diâmetros polar e equatorial (epiderme da face abaxial)

As análises anatômicas foram realizadas em lâminas foliares coletadas em todos os tratamentos, na ocasião da colheita do experimento. Foram utilizadas folhas completamente expandidas, sendo escolhidas preferencialmente folhas similares às aquelas nas quais foram realizadas as avaliações biofísicas.

Após a coleta, as folhas foram fixadas em FAA 70% e armazenadas em álcool 70% até a realização dos cortes. Foram efetuados cortes paradérmicos à mão livre, corados com safranina 0,1% em água glicerizada (Johansen, 1940), para confecção de lâminas semi-permanentes. A contagem do número de estômatos foi realizada com o auxílio de câmara clara, em microscópio OLIMPUS CBB, segundo técnica de Labouriau et al. (1961) em cinco lâminas, sendo cinco campos de cada uma, totalizando 25 leituras por cada tratamento. As lâminas foram fotografadas com câmera digital (Canon Power Shot A620), utilizando microscópio de luz (Ken-a-Vision TT18).

3.6.6.3 Características anatômicas de raízes (alterações no tecido vascular)

Ao final do experimento, foram coletadas raízes laterais, fixando-as, logo após a coleta, em álcool etílico 70%.

Para a confecção das lâminas de raízes, secções transversais de raízes de cinco plantas, por tratamento, foram feitas a mão livre a uma distância de 5 cm da ponta da raiz, perfazendo um total de 15 lâminas. As secções foram clarificadas em solução a 50% de hipoclorito de sódio, sendo, em seguida, lavadas em água destilada, neutralizadas em água acética 1%, coradas com azul de astra-safranina (Kraus & Arduin, 1997) e montadas em glicerina 50%.

As lâminas foram microfotografadas com câmera digital (Canon Power Shot A620), utilizando microscópio de luz (Ken-a-Vision TT18).

3.6.7 Preparo do material para as análises bioquímicas

Para a determinação das análises bioquímicas, utilizou-se material seco em estufa e moído (folhas e raízes laterais). Esse material vegetal seco foi o mesmo no qual foram obtidos os dados de massa seca, ficando armazenado por aproximadamente 50 dias até a obtenção dos extratos.

Deste material seco foram obtidos os extratos, nos quais foram quantificados açúcares redutores, açúcares solúveis totais, proteínas e aminoácidos. Foram utilizadas 3 repetições para cada parte da planta, de um total de 3 plantas por tratamento.

3.6.7.1 Obtenção dos extratos

Os extratos vegetais para análise bioquímica foram obtidos através da homogeneização de 3 amostras de tecido vegetal seco. Para cada amostra foram utilizados 0,3 gramas de tecido vegetal seco homogeneizado em graal e utilizando-se como extrator o tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5, sendo que foi considerado um volume final de 9 ml, divididos em 3 ml a cada centrifugação. O material foi submetido à centrifugação durante 30 minutos a 3000g, sendo os precipitados ressuspensos por 2 vezes em 3 ml do extrator, sendo coletados e reunidos os 3 sobrenadantes.

3.6.7.2 Proteínas

As proteínas solúveis foram determinadas segundo a metodologia de Bradford (1976), utilizando-se alíquotas de 100 µl de extrato para todas as partes vegetais em questão. Os resultados foram calculados com base na curva padrão de BSA (soro albumina bovina) e expressos em mg.g MS⁻¹.

3.6.7.3 Aminoácidos

A determinação de aminoácidos foi realizada pelo método de Yemm & Cocking (1955), utilizando-se alíquotas de 20 µl de extratos de folhas e alíquotas de 10 µl de extratos de raízes laterais. Os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicina e expressos em mg/g MS.

3.6.7.4 Açúcares solúveis totais

Os açúcares solúveis foram quantificados segundo a metodologia descrita por Yemm & Willis (1954), utilizando-se alíquotas de 6 µl de extratos de folhas e de raízes laterais. Os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em mg/g MS.

3.6.7.5 Açúcares redutores

Os açúcares redutores foram quantificados segundo a metodologia de Miller (1959), utilizando-se alíquotas de 100 µl de extratos foliares e 400 µl de extratos de raízes laterais. Os resultados foram calculados com base na curva padrão de glicose e expressos em mg/g MS. A sacarose foi estimada subtraindo-se a concentração de açúcares redutores da concentração de açúcares solúveis totais.

3.6.8 Teor de clorofila

Ao final do experimento, foram quantificados os teores de clorofilas seguindo a metodologia descrita por Arnon (1949), utilizando-se 0,1 g de material foliar fresco, considerando-se 7 folhas completamente expandidas (estádio “D”) de cada tratamento.

3.6.9 Teores de nutrientes na folhas

Foram avaliados também os teores de nutrientes nas folhas, utilizando-se as amostras secas obtidas no item 3.6.3, as quais foram conduzidas ao Departamento de Química da Universidade federal de Lavras, setor de análise química foliar, para determinação dos teores de nutrientes. O teor de N foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl: digestão por ácido sulfúrico seguida por destilação e titulação. Para determinação do teor de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Al, Na, foi realizada a digestão nitroperclórica do material. O teor de Ca e Mg foi determinado por espectrofotometria de absorção atômica: P pelo método colorimétrico do metavanadato fósforo total; S, por turbidimetria do sulfato de bário; K, por fotometria de chama de emissão. Teores de Cu, Fe, Mn, Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. O teor de B foi determinado por digestão via seca (incineração) e reação colorimétrica por curcumina.

3.6.10 Atividade radicular da enzima Redutase do Nitrato

Ao final do experimento, realizou-se o ensaio *in vivo* da enzima Redutase do Nitrato nas raízes das plantas de seringueira. Antes de se proceder ao ensaio da atividade da enzima, as plantas foram supridas com 8mM de nitrato na forma de KNO_3 . Após 48 horas, as raízes foram coletadas às 8 horas da manhã, sendo devidamente fragmentadas, tomando-se 0,5 g do material o qual foi transferido para béqueres contendo 5 ml do meio de incubação, constituído

de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 7,5), nitrato de potássio 100mM e 1% de n-propanol (v/v). Os béqueres contendo as amostras foram levados para infiltração a vácuo durante 1 minuto por 2 vezes. Logo após a infiltração, os béqueres foram transferidos para banho-maria a 30°, sob agitação constante e no escuro, para incubação. Foram coletadas alíquotas de 500 µl aos 10' e aos 40' de incubação. As alíquotas foram adicionadas ao meio de reação constituído por 1 ml de sulfanilamida 1% em HCl 1,5 N, 1 ml de N-2-naftil etileno, sendo o volume completado para 4 ml com água destilada. A quantidade de nitrito formada neste ensaio foi determinada colorimetricamente através de leituras espectrofotométricas do meio de reação realizadas a 540 nm e comparadas contra uma curva padrão para nitrito. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{MF} \cdot \text{h}^{-1}$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Colonização micorrízica

A porcentagem de colonização radicular foi baixa (Fig.1), em torno de 18%, no tratamento inoculado com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*, após 195 dias de inoculação das plantas, quando comparado com os poucos trabalhos utilizando a seringueira como planta hospedeira, os quais obtiveram valores mais altos de colonização radicular, cerca de 62% (Lima, 1989) utilizando-se a dose de 40 ppm de fósforo.

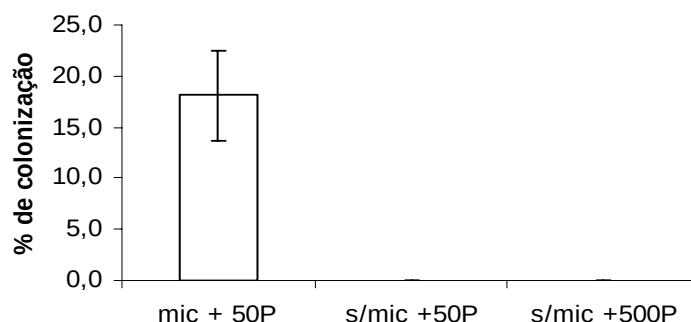


FIGURA 1: Colonização radicular (%) de plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P. A avaliação foi feita após 195 dias de inoculação com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*. As barras correspondem ao erro padrão da média de 7 repetições. Lavras, 2007.

Os outros dois tratamentos não apresentaram colonização pelo fungo, indicando que não houve contaminação entre os tratamentos.

A espécie de fungo micorrízico utilizada neste experimento trata-se de uma espécie considerada invasiva, eficiente em promover a colonização de raízes de plantas hospedeiras. Em seringueira, trabalhos anteriores utilizando o fungo *Glomus clarum* e outros fungos do gênero *Glomus sp.*, em proporções

iguais, têm relatado taxas de colonização relativamente altas, mesmo em condições de solos bem supridos com fósforo (46% de colonização em substrato suprido com 640 ppm de fósforo), o que sugere que a espécie *Glomus clarum* é uma espécie de FMA capaz de se adaptar mesmo às condições de elevada fertilização de P (Lima, 1989).

Em trabalho realizado por Lima et al. (1986), foram inoculadas algumas espécies de FMAs em plântulas de seringueira, sendo que a espécie *Glomus clarum* foi a que mostrou maior resposta no desenvolvimento das plantas e maiores teores de fósforo nos tecidos.

Schwob et al. (1998), trabalhando com seringueira inoculada com o fungo micorrízico *Glomus mosseae*, encontraram uma taxa de infecção que aumentou rapidamente a partir dos 45 dias de inoculação, alcançando um valor máximo de cerca de 47% aos 180 dias após a inoculação, coincidindo com o período em que se puderam observar os efeitos benéficos mais significativos dos FMAs sobre as plantas de seringueira, em termos de crescimento vegetativo e trocas gasosas.

Contudo, Siqueira & Saggin-Junior (2001), citados por Chu et al. (2004), estudando 29 espécies de plantas perenes, constataram que algumas espécies formam micorriza com porcentagem de colonização muito baixa. Ainda assim eles verificaram aumento significativo na concentração de fósforo na planta inoculada, pois quando o teor do elemento que limita o desenvolvimento da planta é baixo no solo, a colonização micorrízica, mesmo sendo em menor intensidade, pode trazer benefícios para o crescimento e o desenvolvimento da planta. Partindo desse pressuposto, a seringueira pode formar uma micorriza eficiente, mesmo com uma colonização baixa, como observado nos resultados do presente trabalho.

No trabalho conduzido por Lima (1989), as plântulas de seringueira foram inoculadas com um material inoculante contendo aproximadamente 1000

esporos das espécies de FMA utilizadas, ou seja *Glomus clarum* e *Glomus* sp., introduzidas no fundo do furo de plantio. Essa quantidade maior de esporos pode ter ocasionado a maior taxa de colonização observada por esse autor. No presente trabalho, o inóculo continha cerca de 200 esporos do FMA *Glomus clarum*.

Assim, pode-se concluir que, talvez, o processo de colonização micorrízica seja lento por parte do FMA *Glomus clarum*, e que uma maior quantidade de esporos possa ser necessária para promover uma colonização mais pronunciada e, possivelmente, mais rápida.

No experimento, foi utilizado o fungicida Brometo de Metila no processo de esterilização do substrato. Existe a possibilidade de que algum resíduo do fungicida utilizado no processo de fumigação do solo tenha ficado retido no mesmo e tenha tido algum efeito adverso sobre o inóculo, diminuindo sua densidade e causando uma reduzida colonização das raízes de seringueira.

A aeração do substrato é um fator importante para o estabelecimento da simbiose, porque a germinação dos esporos é um processo obrigatoriamente aeróbico (Silveira, 1992), sendo inibido por tensões reduzidas de O₂. Se o nível de O₂ no solo é aumentado de 2% para 21 %, o comprimento das raízes colonizadas aumenta duas vezes e a quantidade de vesículas fúngicas aumenta cinco vezes, como observado por Saif (1983), trabalhando com *G. macrocarpus* e *G. mosseae*.

Durante a condução do experimento, houve um curto período de tempo em que as plantas ficaram sujeitas a um excesso hídrico, o que pode também ter contribuído para redução da taxa de germinação dos esporos e, conseqüentemente, da taxa de colonização, uma vez que o excesso de água nos vasos de cultivo podem ter criado uma condição de hipoxia.

De acordo com o resultado das análises química e física do solo (Quadro 1), o solo foi classificado como muito argiloso. Segundo Kruckelmann (1975),

uma maior infecção e conseqüente multiplicação de esporos de FMAs fora observada em solos mais arenosos. Entretanto o solo, utilizado por Lima (1989), fora também analisado e classificado como muito argiloso. Vale ressaltar que o substrato utilizado no experimento constituiu-se de uma mistura 1:1 (solo: areia), a fim de torná-lo mais arenoso, e a análise química e física fora realizada antes de se promover a mistura do solo à mesma proporção de areia.

Nas figuras 2 e 3 estão apresentadas fotomicrografias de raízes laterais de menor diâmetro de *Hevea brasiliensis*, inoculadas com o FMA e coradas com azul de tripano (tópico 3.6.4), sem serem submetidas a nenhum tipo de corte anatômico, visualizadas ao microscópio binocular com aumento de 40X. O micélio que cresce dentro da raiz se restringe ao córtex, e as ramificações das hifas ocorrem inter e intracelularmente, sendo que as hifas intercelulares ocorrem nas camadas mais internas do córtex.

As hifas intra-radiculares também se diferenciam em vesículas, que são estruturas globosas e mais alongadas, ocupando posição terminal ou intercalar na hifa. Elas podem ser inter ou intracelulares e ocupam as camadas internas e externas do córtex, contendo grande quantidade de lipídios, sendo consideradas estruturas de reserva (figura 2A).

Em um segmento de raiz do tecido cortical intacto, podem ser visualizadas, dentro das células do córtex, as estruturas arbusculares (Fig. 3A) responsáveis pela troca de nutrientes entre os simbiontes, que são produzidas pela ramificação dicotômica extensiva das hifas intracelulares, não comprometendo a integridade das células radiculares; a figura 3E mostra as mesmas estruturas arbusculares, em raiz que sofreu uma leve abrasão, a fim de se obter uma melhor visualização das células corticais contendo arbúsculos e hifas intercelulares. Isso se fez necessário devido ao fato das raízes da seringueira serem muito grossas e de difícil visualização pelo método empregado.

Os esporos formados pelos FMAs são estruturas globosas, às vezes irregulares, com diâmetro que varia de 45 a 700 μm , responsáveis pela sua disseminação e sobrevivência (Siqueira et al., 2002). No caso do FMA *Glomus clarum*, seus esporos possuem tamanho variando de 100 a 260 μm , sendo produzidos em grandes quantidades dentro do córtex radicular (Fig.3C). A figura 2C mostra um esporo extra-radicular; as figuras 2B e 2D apresentam esporos e hifas intra-radulares e esporos e hifas extra-radulares, respectivamente.

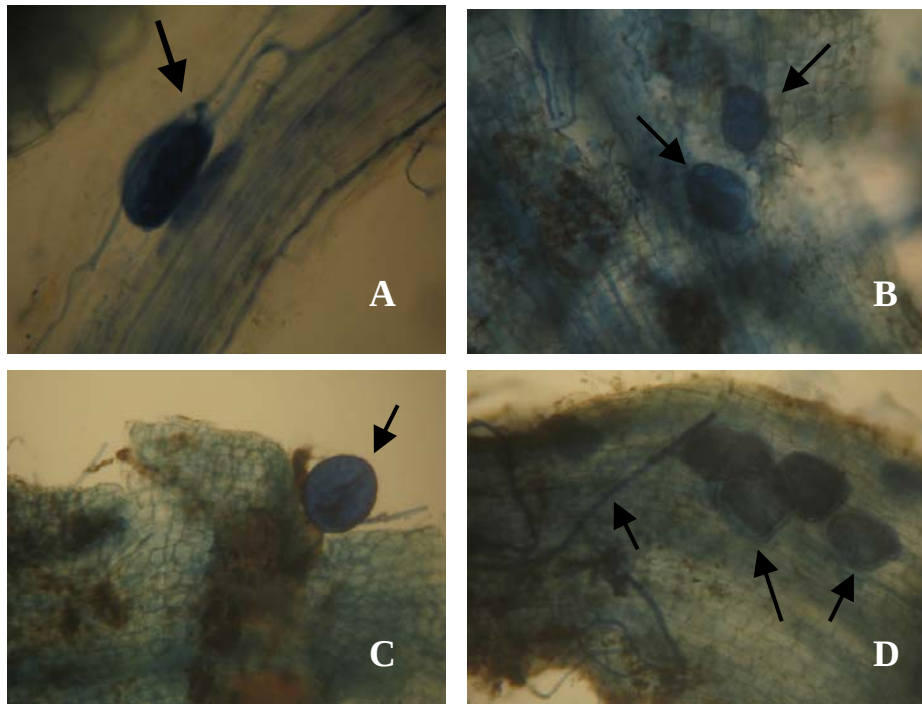


FIGURA 2: Fotomicrografias de estruturas fúngicas em raízes laterais de plantas jovens de seringueira inoculadas com o FMA *Glomus clarum* e coradas com azul de tripano. As pontas de setas apontam uma vesícula (A), esporos intra-radulares (B), esporo extra-radicular (C) e esporos e hifas intra-radulares (D). Aumento 40x. Lavras, MG, 2007.

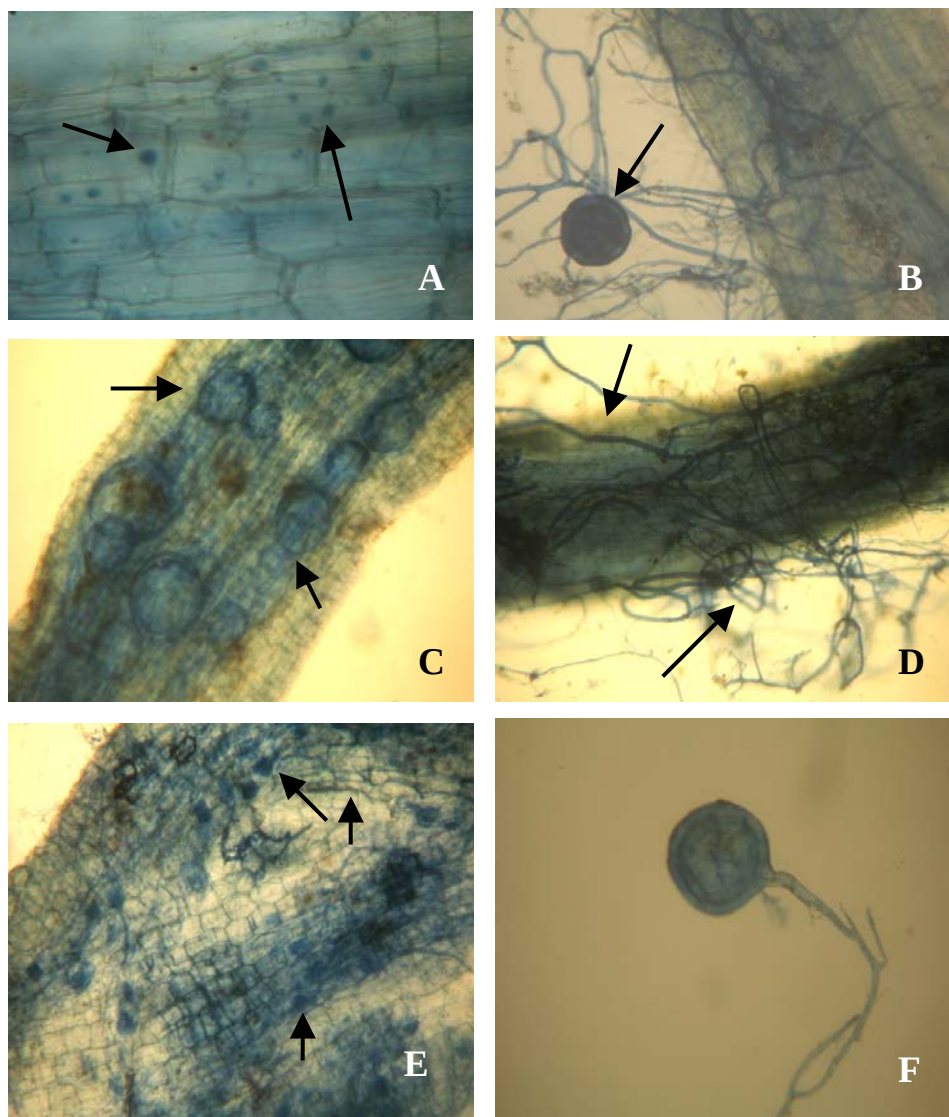


FIGURA 3: Fotomicrografias de estruturas fúngicas em raízes laterais de plantas jovens de seringueira inoculadas com o FMA *Glomus clarum* e coradas com azul de tripano. As pontas de seta apontam arbúsculos dentro das células corticais (A), esporo e hifas extra-radiculares (B); esporos intra-radulares (C), micélio externo (D), arbúsculos e hifas intra-radulares (E) e um esporo isolado (F). Aumento 40x. Lavras, MG, 2007.

As figuras 3B e 3F mostram uma porção do micélio extra-radicular com esporo e um esporo extra-radicular de *Glomus clarum*, respectivamente. Na figura 3D pode ser visualizado o micélio extra-radicular envolvendo uma porção de raiz lateral de seringueira.

4.2 Altura das plantas e diâmetro dos caules

Um dos efeitos mais bem documentados dos FMAs sobre as plantas hospedeiras é o aumento do crescimento da mesma. Todos os tratamentos mostram um ganho linear semelhante, tanto em altura quanto em diâmetro do caule (Fig. 4).

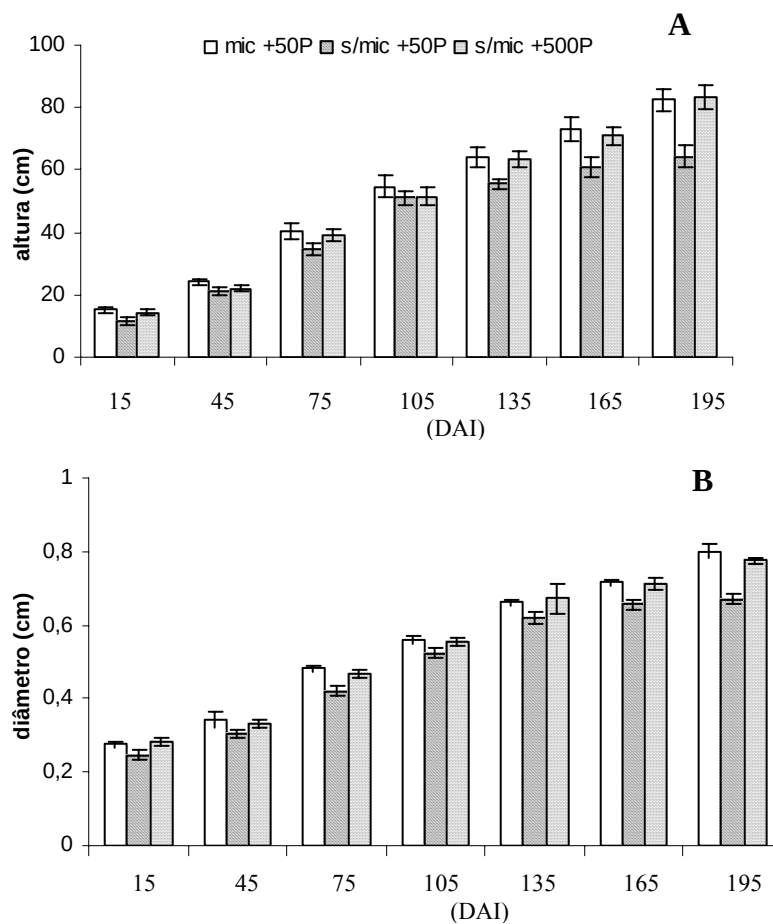


FIGURA 4: A= crescimento em altura das mudas e B= diâmetro dos caules de plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P, s/mic+500P, ao longo de 195 dias de cultivo. DAI= dias após a inoculação do FMA. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 10 repetições. Lavras, MG, 2007.

Essas avaliações no crescimento foram iniciadas a partir de 15 dias de inoculação. Até os 105 dias, após a inoculação do FMA, todas as plantas de todos os tratamentos ganham em altura; entretanto, após esse período, as plantas mic+50P têm seu crescimento equiparado ao das plantas s/mic+500P, em detrimento das plantas s/mic+50P, as quais mostram crescimento reduzido (Fig. 4A). Aos 195 dias após a inoculação, as plantas mic+50P e as plantas s/mic+500P já demonstram um crescimento bem acentuado em relação ao tratamento s/mic+50P.

O mesmo padrão de crescimento é observado para o diâmetro dos caules, onde todas as plantas ganham em diâmetro ao longo do período experimental, sendo que, a partir dos 165 dias, esse ganho para as plantas mic+50P se equipara ao ganho observado para as plantas s/mic+500P, ambos diferindo do outro tratamento (Fig. 4B). Vale ressaltar que o aumento no diâmetro dos caules das plantas micorrizadas é de grande importância para a heveicultura, uma vez que é com base no diâmetro do caule que se estabelece o ponto de enxertia.

Rocha et al. (2006), trabalhando com mudas de cedro inoculadas com espécies variadas de FMAs, encontraram resultados significativos no crescimento das plantas após 180 dias de emergência das plântulas, sendo que os autores não efetuaram medições de crescimento ao longo do tempo de cultivo, fazendo-as somente ao final do experimento.

Também Schwob et al. (1998), em seu trabalho com *Hevea brasiliensis* inoculada com *Glomus mosseae*, encontraram taxas de crescimento significativas 135 dias após a inoculação, em relação ao tratamento não micorrizado. Essas plantas tiveram um crescimento médio de 66,1 cm em altura e 0,81 cm em diâmetro.

O efeito do fungo simbiote sobre o crescimento em altura e diâmetro dos caules pode refletir o estágio em que a colonização começa a ser traduzida

em benefícios para a planta hospedeira. Essa resposta demorada do fungo pode ser causada pelo fato de que, durante os primeiros 30-45 dias, as plântulas ainda crescem utilizando as reservas das sementes, e assim são independentes de nutrição externa ou de infecção micorrízica.

Segundo Schwob et al. (1998), outro fato que leva a uma demora na resposta de crescimento da planta é uma redução da disponibilidade de fotossintatos para o crescimento da planta, a qual surge nos estádios mais iniciais da colonização, como observado para *Hevea brasiliensis* inoculada com *Glomus mosseae*, na qual um menor crescimento se mostra visível no estágio 2 (de 45 a 90 dias após a inoculação) de desenvolvimento, coincidindo com o início da infecção propriamente dita. Esse atraso temporário no crescimento da planta é causado, provavelmente, pela penetração inicial do fungo nas raízes de *Hevea*. Atuando como um forte dreno de carboidratos produzidos pela planta hospedeira e utilizados para o crescimento do simbionte e para seu próprio metabolismo, o fungo leva a esse atraso em se observar um crescimento mais acentuado nos primeiros estádios da colonização, uma vez que esta ainda se encontra incompleta (Smith, 1980).

Soares et al. (2003), trabalhando com mudas de ipê roxo inoculadas com FMAs de espécies variadas, encontraram para as espécies *G. margarita* e *G. fasciculatum* aumentos de 87 % no diâmetro do caule, quando comparados às mudas não inoculadas, enquanto que as espécies *G. etunicatum* e *G. clarum* promoveram aumentos de 78 % e *Glomus* sp. de 61 % no diâmetro do caule.

Além de uma significativa economia em fósforo e nitrogênio, as plantas inoculadas levam menos tempo para atingirem o ponto adequado de enxertia e, conseqüentemente, menos tempo no viveiro. Esses porta-enxertos são mais tolerantes ao transplântio, mais resistentes a deficiências hídricas, mais tolerantes a estresses abióticos resultantes de níveis tóxicos de manganês e

alumínio, este ultimo muito comum nos solos de cerrado, além da minimização da ação de pragas e doenças de importância econômica.

Ao final do período de condução do experimento, pôde-se notar (Fig. 5) um maior incremento no crescimento das plantas mic+50P e naquelas s/mic+500P, em comparação com as plantas s/mic+50P.



FIGURA 5: Aspecto das plantas jovens de seringueira após 195 dias de cultivo. Da esquerda para a direita podem-se observar as plantas s/mic +50P, s/mic +500P e mic +50P. Lavras, MG, 2007.

4.3 Produção de matéria seca na parte aérea, raiz e matéria seca total

O maior acúmulo de matéria seca na parte aérea (Fig. 6A) e matéria seca total (Fig.6C) das plantas mic+50P e das plantas s/mic+500P está associado ao maior crescimento dos caules tanto em comprimento quanto em diâmetro.

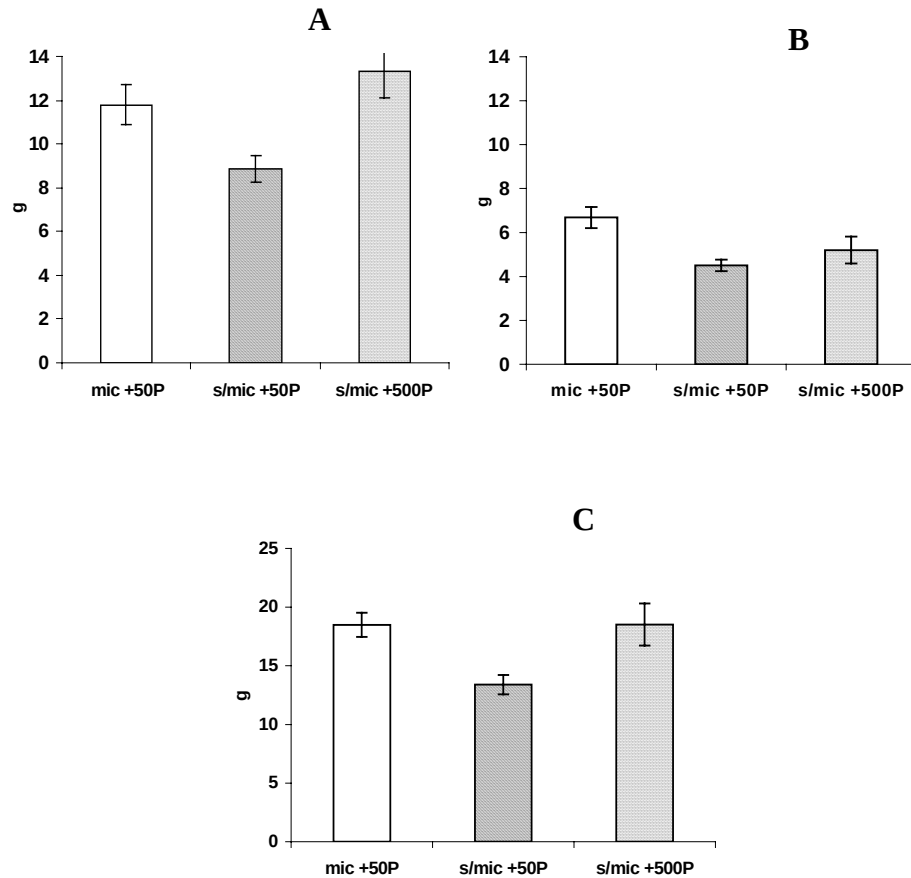


FIGURA 6: A= Acúmulo de matéria seca na parte aérea, B= acúmulo de matéria seca nas raízes, e C= acúmulo de matéria seca total em plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P, após 195 dias de cultivo. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 7 repetições. Lavras, MG, 2007.

As plantas micorrizadas apresentaram um ganho de 38%, 33% e 49% na matéria seca total, matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz, respectivamente, em relação ao controle não micorrizado. As plantas s/mic +500P apresentam ganhos de 38%, 50% e 16% na matéria seca total, matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz, respectivamente, em relação às plantas s/mic +50P.

No caso das plantas micorrizadas, a maior produção de matéria seca, necessária para o maior crescimento em altura e diâmetro, está associada aos efeitos da micorrização que, a priori, promove maior captação de nutrientes para as raízes, inclusive água, ainda contribui para a síntese de fitohormônios como as auxinas e citocininas, e também para uma maior produção de fotoassimilados produzidos pelo estímulo desses fatores nutricionais e hormonais nos mecanismos de fotossíntese da planta hospedeira.

Plantas jovens de seringueira, inoculadas com espécies de *Glomus* e adubadas com doses variadas de P, mostraram valores de matéria seca da parte aérea de 9,20 g para a dose de 40 ppm de P; e 11,05 g para a dose de 80 ppm de P, após 180 dias de plantio (Lima, 1989). Pelos dados da figura 6A, observam-se ganhos maiores de MS na parte aérea de plantas mic+50P do que aqueles observados por Lima (1989). Também os tratamentos s/mic+50P e s/mic+500P mostram valores de MS muito superiores àqueles encontrados pelo referido autor.

Schwob et al. (1998) observaram para plantas jovens de seringueira inoculadas com o FMA *Glomus mosseae* um incremento de 18% na MS total, 27% na MS da parte aérea, 17% na MS da raiz, após 270 dias de inoculação das plantas. Esses valores foram inferiores aos encontrados no presente experimento para as plantas micorrizadas, ou seja, 38%, 33% e 49%, respectivamente.

Viégas et al. (1992) encontraram um maior incremento de MS em todas as partes das plantas jovens de seringueira não inoculadas com FMAs entre os

180-240 dias após o plantio, sendo que a parte aérea teve maior incremento que as raízes. Os valores encontrados pelos autores aos 180 dias de idade das plantas (1,87 g MS da raiz e 7,91 g MS da parte aérea) são inferiores aos aqui encontrados (Fig. 6A e 6B), e aos 240 dias (3,82 g MS da raiz e 17,54g MS da parte aérea) são superiores apenas os valores da parte aérea.

Mudas de embaúba inoculadas com mistura de FMAs mostraram uma maior produção de raízes, refletindo no aumento da matéria seca das mesmas, aos 120 dias de cultivo em casa de vegetação, diferindo significativamente das plantas sem inoculação (Carneiro et al., 2004).

Muitos autores sugerem que auxinas e citocininas, liberadas pelo fungo infectante, ou pela própria planta, por indução deste, possam contribuir para o crescimento da planta (Frankenberger & Arshad, 1995, citados por Fitze et al., 2005). Raízes de milho inoculadas com FMAs mostraram um aumento precoce no nível de ácido 3-indol- butirico livre (AIB), (Ludwig-Müller et al., 1997; Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000), coincidindo com um aumento muito significativo na porcentagem de raízes laterais.

Em simbiose ectomicorrízica, vários exemplos são conhecidos em que o AIA é produzido pelo fungo associado, resultando em um aumento de raízes laterais (Karabaghli-Degron et al., 1998). Kaldorf & Ludwig-Müller (2000), propuseram um modelo similar para raízes colonizadas por FMAs, nas quais o aumento de raízes laterais poderia ser atribuído a um estímulo precoce do fungo simbiote, justificando o aumento observado na matéria seca das raízes das plantas de *Hevea brasiliensis* micorrizadas, em relação aos demais tratamentos (Fig. 6B).

Kaldorf & Ludwig-Müller (2000) atribuíram o maior crescimento dos caules a um aumento nos níveis de AIB livre nas folhas. Esse AIB poderia ser sintetizado “de novo” nas folhas e/ou ser transportado das raízes micorrizadas para as folhas, sendo que a síntese desse fitohormônio é muito mais alta em

raízes micorrizadas em comparação com as folhas, o que poderia levantar a questão de que o maior incremento no crescimento das plantas possa ser devido não somente à melhora nutricional, especialmente a nutrição fosfatada, mas também a uma maior produção de fitohormônios. Entretanto, estudos de hormônios em micorrizas são ainda escassos.

O maior ganho em matéria seca das raízes das plantas de seringueira micorrizadas em relação aos outros dois tratamentos justifica uma menor razão parte aérea/raiz para o tratamento micorrizado (1,83) em relação ao tratamento s/mic+500P (2,60) (Fig.7), embora não haja diferença estatística entre o tratamento mic+50P e s/mic+50P (1,97).

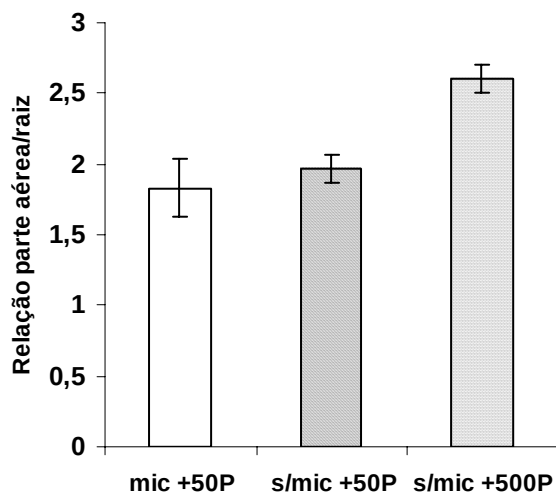


FIGURA 7: Relação parte aérea/raiz de plantas jovens de seringueira em função dos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P, após 195 dias de cultivo. Lavras, MG, 2007.

A figura 6C mostra o acúmulo de matéria seca total nas plantas de seringueira nos três tratamentos. Observa-se que, mesmo em baixa colonização micorrízica, as plantas mic+50P mostram um ganho em matéria seca total

comparável à produção conseguida com 500 mg de P/dm³, ou seja, a inoculação com o fungo micorrízico arbuscular foi capaz de produzir resultados semelhantes àqueles obtidos por plantas adubadas com 500 mg de P/dm³.

Soares et al. (2003) encontraram aumentos de 560% na matéria seca total das raízes de plântulas de ipê roxo inoculadas com *Gigaspora margarita*, aos três meses após a inoculação, quando comparadas com o controle não inoculado.

O maior desenvolvimento do sistema radicular proporciona à planta maior capacidade de absorção de nutrientes e água, sendo uma fonte de reserva de nutrientes para a planta, além de uma melhor sustentação e capacidade de sobrevivência após o transplântio para o campo (Andrade & Faria, 1997, citados por Soares et al., 2003). Um sistema radicular mais abundante torna-se uma vantagem seletiva para sobrevivência, favorecendo o desenvolvimento vegetal. Portanto, a inoculação das mudas de seringueira com FMAs reveste-se de grande importância quando se objetiva a produção de porta-enxertos mais vigorosos.

Trabalhos realizados por Delú-Filho (1994) e Shan (2007)*, relatam que houve um incremento de nitrogênio em plantas de *Hevea brasiliensis* mantidas em solução nutritiva isenta de nitrogênio. Esse aumento do nitrogênio evidenciado por esses autores pode ser decorrente da contribuição de bactérias diazotróficas. Delú-filho (1994) constatou a presença dessas bactérias diazotróficas no sistema radicular das plantas de seringueira cultivadas. Essas bactérias associadas às raízes das plantas eram das espécies *Azospirillum brasiliensis*, *A. lipoferum* e *Herbaspirillum seropedicae*.

Efeitos sinérgicos entre FMAs e bactérias diazotróficas no crescimento das plantas já foram constatados, anteriormente, em outras culturas, como em tomateiro (Bagyaraj & Menge, 1978), em *Paspalum notatum* (Barea et al., 1983) e em batata-doce, na qual Paula (1992) observou que a inoculação

* SHAN, A. Tese. Universidade Federal de Lavras. 2007. No prelo.

conjunta incrementou o desenvolvimento das plantas em até 44% em relação à inoculação do fungo isoladamente.

Neste experimento não foi realizada metodologia com a finalidade de determinar a presença de bactérias diazotróficas, associadas aos fungos micorrízicos inoculados, e analisar a contribuição dessas bactérias para o desenvolvimento das plantas de seringueira. Entretanto, existe a possibilidade de que a presença de bactérias diazotróficas tenha contribuído para potencializar os efeitos do fungo *Glomus clarum*, apesar da baixa colonização radicular por parte do mesmo, uma vez que já foi constatado por inúmeros autores o efeito positivo da interação fungos/bactérias para o crescimento da planta hospedeira. Portanto, esse é um aspecto que merece ser melhor investigado futuramente. Vale ressaltar que bactérias encontram-se presentes livremente no ambiente e que a fumigação do substrato não impede o estabelecimento de bactérias após esse procedimento.

4.4 Área foliar

Pelos resultados das medidas de área foliar (Fig.8), pode-se observar que as plantas micorrizadas e as plantas s/mic+500P tiveram aumentos de 40,9% e de 71,43% , respectivamente, em relação às plantas s/mic+50P.

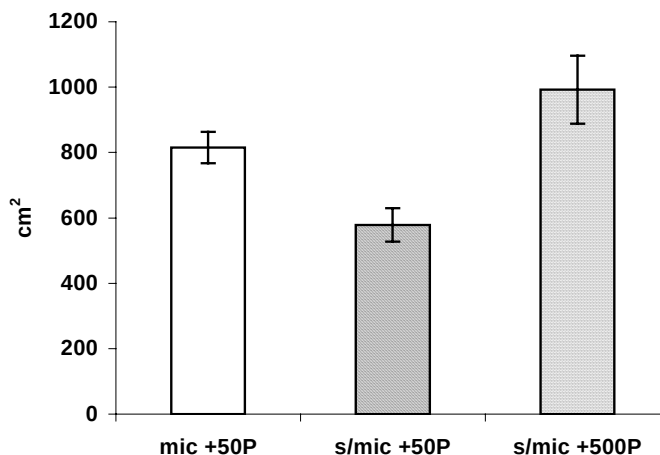


FIGURA 8: Área foliar de plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P, após 195 dias de cultivo. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 7 repetições. Lavras, MG, 2007.

Plantas de seringueira inoculadas com *Glomus mosseae* apresentaram área foliar de 858 cm² (Schwob et al., 1998), após 180 dias de inoculação do FMA, valor ligeiramente superior ao encontrado no presente trabalho, cuja área foi de 815,35 cm².

O aumento de 40,9% na área foliar das plantas micorrizadas, mesmo tendo ocorrido uma baixa colonização pelo fungo, implica aumentos na superfície de captação de luz, aumento na assimilação de CO₂ e produção de fotoassimilados, necessária para atender a demanda do sistema micorrízico e da planta hospedeira (Peng et al., 1993; Shachar-Hill et al., 1995, citado por Bago et al., 2003).

Esse tipo de benefício é resultante, possivelmente, do aumento na absorção de nutrientes e água pelo FMA e suas implicações em nível fisiológico e bioquímico, como o estímulo da síntese de hormônios, especialmente auxinas (AIB) e citocininas, aminoácidos e proteínas e fotoassimilados (Sena, 1998). Drüge & Schönbeck (1993), trabalhando com plantas de *Linum usitatissimum* L. micorrizadas, constataram um aumento do nível interno de citocininas, o que foi relacionado à melhora da fotossíntese e crescimento das plantas infectadas.

As plantas s/mic+50P apresentam menor área foliar (Fig. 8). Isso resulta numa queda na produção de fotoassimilados pelas mesmas.

4.5 Teor e acúmulo de nutrientes nas folhas

Os teores de todos os nutrientes, com exceção do fósforo e do enxofre, nas plantas s/mic+500P, não diferiram estatisticamente em relação aos demais tratamentos (Tab. 1). Vale ressaltar que as análises de nutrientes foram realizadas apenas nos tecidos foliares e não em toda a parte aérea, o que não reflete todo o nutriente absorvido pelas plantas.

TABELA 1: Médias de teores de macro e micronutrientes nas folhas de plantas jovens de seringueira em função dos tratamentos mic +50P, s/mic +50P e s/mic +500P, após 195 dias de cultivo. Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott no nível de 5% de significância. Lavras, MG, 2007.

	Plantas mic+50P	Plantas s/mic+50P	Plantas s/mic+500P
% N	2,02 a	1,79 a	2,96 a
% P	0,07 b	0,05 b	0,10 a
% K	1,05 a	0,77 a	1,07 a
% Ca	1,14 a	0,93 a	1,44 a
% Mg	0,19 a	0,16 a	0,20 a
% S	0,17 b	0,16 b	0,21 a
ppm B	41,33 a	35,26 a	47,86 a
ppm Mn	109,1 a	93,66 a	87,43 a
ppm Zn	18,06 a	16,43 a	24,13 a
ppm Cu	2,36 a	2,70 a	2,43 a
ppm Fe	443,03 a	206,30 a	498,23 a

TABELA 2: Limites nutricionais definidos por Bolle-Jones (1954) para folhas sadias de seringueira. Fonte: Adaptado de Lopes (1988).

	Limites de Bolle-Jones (1954) para folhas sadias de seringueira
% N	2,6%-3,5%
% P	0,16%-0,23%
% K	1,0-1,4%
% Ca	0,76%-0,82%
% Mg	0,17%-0,24%
% S	0,18%-0,26%
ppm B	7-181 ppm
ppm Mn	13-68 ppm
ppm Zn	14-21 ppm
ppm Cu	--
ppm Fe	80-96 ppm

Não houve efeito da micorrização e do nível de fósforo em todos os tratamentos, exceto para o S e P para o tratamento s/mic+500P.

Entretanto, comparando-se os teores de nutrientes obtidos (Tab. 1) com os limites estabelecidos por Bolle-Jones (1954), citado por Lopes, (1988), para folhas sadias de seringueira (Tab. 2), observa-se que apenas as plantas mic+50P e as plantas s/mic+500P mostraram os teores de K, Mg e B dentro daqueles limites. Isso pode indicar um efeito da micorrização e do fósforo na melhora nutricional.

Todos os três tratamentos mostraram teores de fósforo abaixo daqueles limites, embora sintoma de deficiência de fósforo só tenha sido observado nas plantas s/mic+50P. A ausência de sintomas visuais de deficiência de P em folhas de seringueira micorrizada foi também verificada. Esse mesmo comportamento, ou seja, ausência de sintomas visuais de deficiência de P em folhas de seringueira inoculada apresentando porcentagens de P abaixo do limite estabelecido por Bolle-Jones (1954), citado por Lopes (1988), foi observado por Lopes (1988) para folhas de plantas jovens de seringueira inoculadas com *Gigaspora margarita*.

Apenas o tratamento s/mic+500P mostrou teores de N e S dentro dos limites mostrados na tabela 2. Moreira & Siqueira (2006) citam que os teores de N, K, Ca, Mg e Na são geralmente menores em plantas micorrizadas, enquanto os de S e P são maiores. É importante ressaltar que a redução dos teores de nutrientes nas plantas micorrizadas, como observado para o N (Tab. 1), resulta, na maioria dos casos, de efeitos de diluição, e não de sua menor absorção, visto que as plantas micorrizadas acumulam mais matéria seca total (Fig. 6C) em relação às plantas não micorrizadas.

Não foi observado nenhum sintoma visual de deficiência de S nos tratamentos mic+50P e s/mic+50P.

As concentrações foliares de Mn e Fe encontraram-se acima dos limites (13 – 68 ppm para o Mn e 80 – 96 ppm para o Fe) para folhas sadias em todos os tratamentos. Entretanto, nenhum sintoma visual de toxidez por esses dois micronutrientes foi observado.

Para o zinco, todos os três tratamentos mostraram teores foliares abaixo dos limites (35 – 67 ppm) estabelecidos para folhas sadias, embora nenhum sinal visual de deficiência tenha sido observado, como clorose e manchas necróticas brancas nas folhas mais velhas, o que indicaria um comprometimento da síntese de clorofila. Com relação ao cobre, não foram observados sinais de deficiência, exceto para o tratamento em alto nível de P. Ao longo do experimento pôde-se observar, em algumas plantas s/mic+500P, um secamento das extremidades e das margens de folhas jovens, ocorrendo uma desfolha precoce das mesmas, o que evidencia uma deficiência de cobre nessas plantas, possivelmente ocasionada pela alta concentração de P no substrato de cultivo.

Além do efeito de diluição dos nutrientes já comentado anteriormente, no caso das plantas micorrizadas, também deve-se levar em consideração a baixa taxa de colonização radicular pelo fungo, o que poderia ter ocasionado uma menor massa de hifas extra-radiculares capazes de absorver os nutrientes, embora não o suficiente para comprometer o crescimento das plantas.

Assim, com base nos outros parâmetros analisados, especialmente a capacidade de crescimento das plantas s/mic+500P, que mostrou-se igual ao tratamento mic+50P, observa-se que essas plantas cultivadas em um alto nível de fósforo no substrato, apesar do maior teor de P nos tecidos foliares, apresentaram capacidade de aproveitamento do nutriente do substrato de cultivo inferior às plantas micorrizadas, uma vez que estas últimas apresentaram a mesma capacidade de crescimento. Desse modo, as plantas mic+50P, as quais apresentaram um menor teor de fósforo nas folhas, possivelmente devido a uma

menor taxa de colonização pelo fungo, indicam um melhor aproveitamento do nutriente contido no substrato.

4.6 Teores de Clorofilas nas folhas

As plantas micorrizadas apresentam uma maior concentração de clorofila *a*, razão clorofila *a*/clorofila *b* e maior conteúdo de clorofila total, em comparação ao tratamento s/mic+50P, sendo que para clorofila *a* e total não há diferença estatística em relação ao tratamento s/mic+500P (Figuras 9 e 10). Para os teores de clorofila *b*, não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos.

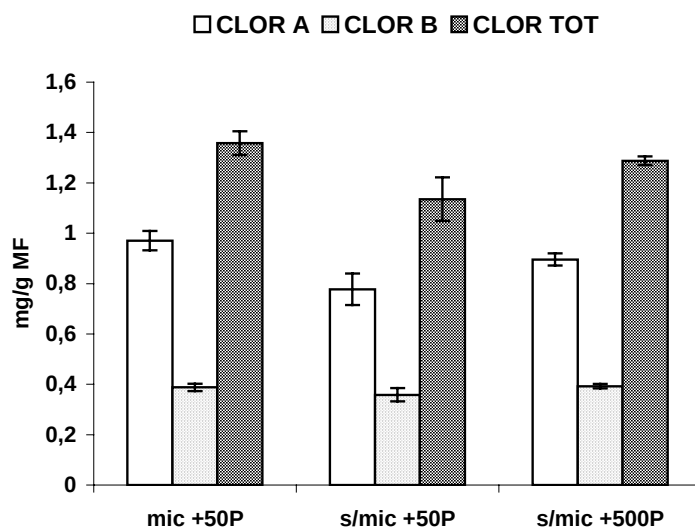


FIGURA 9: Teor de clorofilas *a* e *b* e clorofila total em folhas de plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P, após 195 dias de cultivo. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 7 repetições. Lavras, MG, 2007.

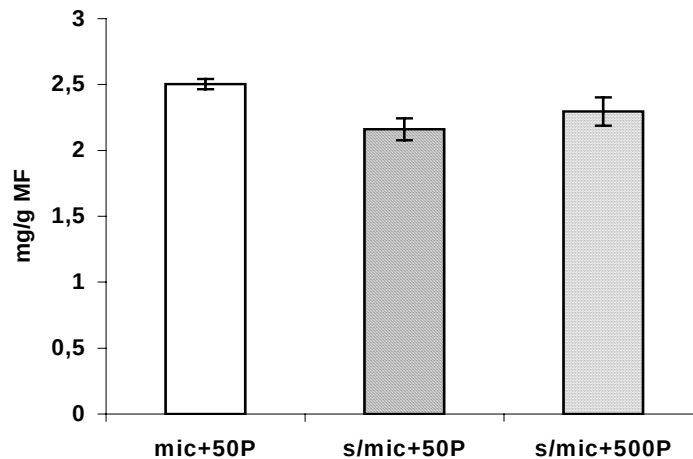


FIGURA 10: Razão clorofila *a/b* em plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P, após 195 dias de cultivo. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 7 repetições. Lavras, MG, 2007

Apesar de apenas 10 a 17% da matéria seca das micorrizas arbusculares serem biomassa de fungos (Tinker, 1978), o simbionte é um competidor por fotoassimilados que a planta hospedeira elabora, uma vez que a respiração das raízes aumenta em cerca de 74%, levando a um acúmulo de carbono no citoplasma das células corticais. Então para compensar essas perdas, as plantas micorrizadas exibem maiores taxas de fotossíntese (Sena, 1998).

Tristão et al. (2006), trabalhando com mudas de café inoculadas com FMAs em diferentes tipos de adubação, encontraram maiores teores de clorofila *a* e clorofila total, em comparação com plantas não micorrizadas. Esses mesmos autores também não encontraram alterações significativas nos teores de clorofila *b* nas folhas do cafeeiro entre os tratamentos.

Abdel-Fattah et al. (2002) também observaram, no geral, que os conteúdos dos pigmentos fotossintéticos nas folhas de plantas de *Vicia faba*

micorrizadas foram significativamente mais elevados do que os encontrados nas folhas das plantas não micorrizadas, em condições de boa hidratação.

Magnésio e nitrogênio são dois nutrientes importantes para a síntese de clorofilas, entrando diretamente na sua composição. Seus teores em plantas micorrizadas normalmente podem ser encontrados em concentrações inferiores devido ao efeito de diluição, conforme já discutido anteriormente. As plantas mic+50P e as plantas s/mic+500P mostram, respectivamente, um incremento de 12,85% e 65,36% no teor de N, e 18,75% e 25% no teor de magnésio, em relação ao tratamento s/mic+50P.

Ferro e manganês são também importantes no processo de síntese de clorofila, embora não integrem a sua molécula (Malavolta, 1980; Marschner, 1997; Melarato et al., 2002). O teor de ferro encontrado nas folhas das plantas mic+50P e nas plantas s/mic+500P é de, respectivamente, cerca de 114,75% e 141,50% superior ao encontrado nas plantas s/mic+50P. O conteúdo de manganês sofreu um pequeno incremento de 16,48% nas plantas micorrizadas e uma redução de 6,6% nas plantas s/mic+500P, em comparação com as plantas s/mic+50P, embora os 3 tratamentos mostraram valores acima dos limites estabelecidos por Bolle-Jones (1954), citado por Lopes, (1988).

Como sugerido por Frankenberger & Arshad (1995), citados por Fitze et al. (2005), os FMAs podem, ainda, produzir ou induzir a planta hospedeira a produzir citocininas. As citocininas podem, junto a outros fatores, como luz e nutrição, regular a capacidade de síntese dos pigmentos fotossintéticos e proteínas fotossintéticas, além de contribuir para a formação de cloroplastos com grana mais amplos (Taiz & Zeiger, 2004; Dourado Neto et al., 2004).

4.7 Resistência estomática, transpiração e temperatura média foliar

A figura 11 apresenta os valores de resistência estomática e transpiração obtidos no último mês de condução do experimento.

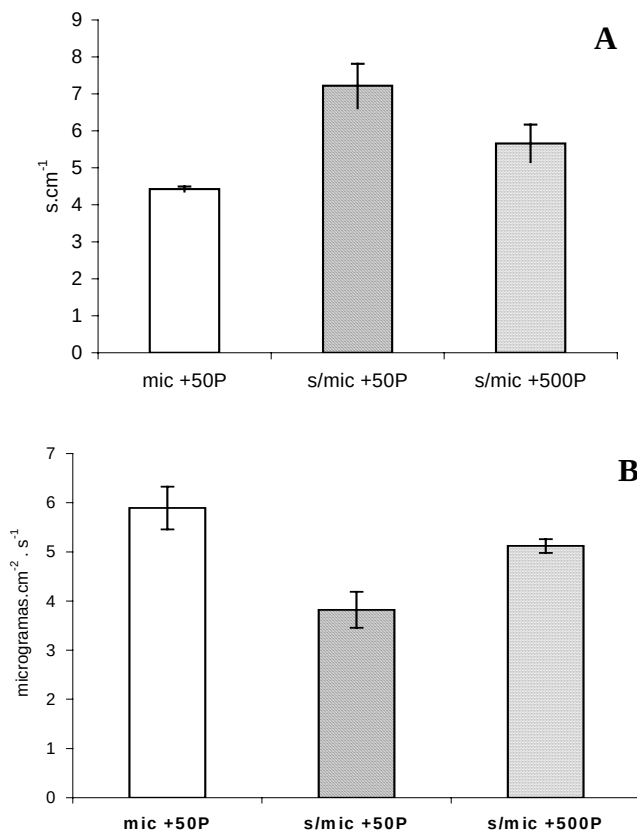


FIGURA 11: A= Resistência estomática (R_s) e B= Transpiração (E) em plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P. As avaliações foram realizadas no último mês de condução do experimento, sendo realizadas 3 medições a cada 10 dias e tomadas as médias. As barras em cada coluna indicam o erro padrão da média de 10 repetições. Lavras, MG, 2007.

Pela análise dos dados apresentados (Fig. 11A e 11B), observa-se que as plantas micorrizadas mostram, no período de avaliação, os mais altos valores de transpiração e os menores valores de resistência estomática em relação aos demais tratamentos.

Esse resultado corrobora com os obtidos por Schwob et al., (1998), os quais também encontraram as maiores taxas de condutância estomática e, conseqüentemente, os menores valores de resistência estomática, associados a uma maior assimilação de CO₂ a partir dos 180 dias de inoculação das raízes de *Hevea brasiliensis* com o fungo micorrízico *Glomus mosseae*, alcançando as maiores taxas de condutância estomática, absorção de CO₂ e transpiração aos 225 dias após a inoculação.

Durante os primeiros estádios de crescimento, a planta de seringueira se nutre das reservas de suas sementes, ricas em fítina e por isso não depende tanto dos benefícios promovidos pelo fungo associado, como já citado anteriormente. Após o esgotamento das reservas de semente, os primeiros benefícios da associação podem ser observados (Oihabi et al., 1993). Depois que ocorre o estabelecimento da simbiose, as plantas micorrizadas passam a ter um comportamento semelhante ou até mesmo superior ao de plantas com boa nutrição fosfatada.

A redução na resistência estomática, e conseqüente aumento na condutância estomática, leva a um aumento na concentração de CO₂ intracelular, o que pode aumentar a atividade fotossintética das plantas infectadas. Plantas micorrizadas apresentam uma maior absorção de água que as plantas não micorrizadas, não só devido à presença do micélio externo, mas também pelo incremento de raízes laterais, como confirmado, neste trabalho, pelo aumento de peso seco da raiz (Fig. 6B). Assim, essas plantas podem transpirar mais, o que é acompanhado pela entrada de CO₂.

Segundo Wu & Xia (2006), a maior taxa de transpiração e condutância estomática de plantas de *Citrus* micorrizadas, comparadas com aquelas não micorrizadas, implicou uma baixa resistência difusiva ao vapor de água de dentro das folhas para a atmosfera quando ambas estavam expostas às mesmas condições de hidratação.

As plantas s/mic+500P têm um sistema radicular mais abundante que as plantas s/mic+50P, uma vez que o fósforo incrementa o crescimento tanto da parte aérea quanto das raízes, e por isso captam também mais água do solo (Koide, 1993), conseguindo manter uma menor resistência estomática e maior transpiração que o tratamento s/mic+50P.

As maiores taxas de transpiração observadas nas plantas micorrizadas capacitam-nas a resfriar mais as folhas, mantendo a integridade do aparelho fotossintético, o que é confirmado pelos dados de temperatura foliar obtidos no mesmo período (Fig. 12).

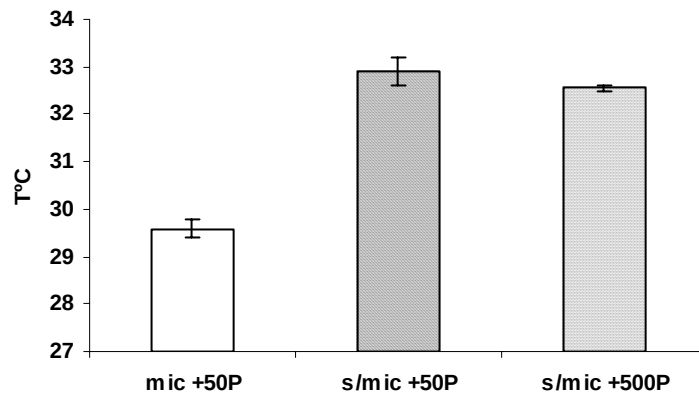


FIGURA 12: Temperatura média foliar (°C) para plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P. As avaliações foram realizadas no último mês de condução do experimento, sendo realizadas 3 medições a cada 10 dias e tomadas as médias. As barras correspondem ao erro padrão da média de 10 repetições. Lavras, MG, 2007.

Portanto, plantas de *Hevea brasiliensis* micorrizadas e bem hidratadas foram capazes de potencializar a entrada de CO₂, sem necessidade de regular tanto as perdas de água pela transpiração, o que possibilitou menores temperaturas foliares e maiores taxas de fotossíntese.

Segundo Miguel (2005), a seringueira apresenta alta sensibilidade estomática ao déficit hídrico, mesmo os mais suaves. O fechamento estomático prematuro, nessas circunstâncias, provoca o bloqueio parcial ou total não somente à perda de água, como também à entrada de CO₂ (Resnik & Mendes, 1979; Rocha Neto et al., 1983, citados por Miguel, 2005). Isso pode levar a uma redução no resfriamento da folha, sendo que, uma temperatura foliar mais elevada pode trazer efeitos negativos sobre os processos redutivos e oxidativos do metabolismo do carbono.

Os efeitos benéficos das micorrizas sobre os parâmetros biofísicos de plantas hospedeiras (baixa resistência estomática e altas taxas de transpiração) têm sido exaustivamente documentados, especialmente para plantas em condições de estresse por déficit hídrico (Augé et al., 1986; Augé, 2001; Augé, 2004). Entretanto, plantas jovens de seringueira demonstram o mesmo comportamento em condições de boa hidratação (figuras 11A e 11B).

Uma vez que as regiões de escape onde a seringueira vem sendo implantada, como Minas Gerais, são regiões de clima mais seco e, portanto, sujeitos a maiores déficits hídricos nos solos, pode-se avaliar a importância do processo de micorrização para a formação de porta-enxertos dessa espécie.

Como as plantas micorrizadas conseguem manter maiores taxas transpiratórias e menores resistências estomáticas que as plantas s/mic+500P, pode-se crer que outros mecanismos, além da melhoria da nutrição fosfatada, estejam associados aos mecanismos de trocas gasosas, em plantas bem hidratadas, tais como balanços hormonais alterados.

Alguns autores têm encontrado níveis elevados de citocininas nos caules de plantas micorrizadas submetidas a déficit hídrico (Goicoechea et al., 1997), e não correlacionam os efeitos sobre a gs com a nutrição fosfatada (Ebel et al., 1996, citados por Wu & Xia, 2006).

Os mecanismos que permitem as plantas micorrizadas, em condições de boa hidratação, aumentarem suas taxas de transpiração e diminuir a resistência dos estômatos, incluem uma significativa contribuição das hifas externas para a captação de água pelas raízes micorrizadas (Marulanda et al., 2003), estímulo na produção de raízes laterais precoces que perduram nas plantas adultas, uma maior densidade estomática, e também níveis aumentados de citocininas nos caules e folhas.

Muitos microrganismos que fazem associações mutualísticas com raízes produzem e secretam quantidades substanciais de citocininas e/ou induzem as células vegetais a sintetizá-las. A infecção de tecidos vegetais por esses microrganismos pode induzir o tecido a se dividir e, em alguns casos, a formar micorrizas. Esses hormônios produzidos pelo simbionte ou pela planta hospedeira vão estimular a divisão celular e o desenvolvimento do vegetal.

As citocininas influenciam também o movimento de nutrientes para a folha a partir de outras partes da planta. Allen et al. (1980), trabalhando com *Bouteloua gracilis* inoculada com FMA, encontrou atividade de citocininas aumentada em cerca de 57 e 111% nas folhas e raízes, respectivamente, em relação às plantas não inoculadas. Portanto, uma raiz micorrizada possivelmente produz maiores teores de citocinina, a qual pode ser translocada para outras partes da planta, regulando o crescimento e mobilizando nutrientes para outras regiões do vegetal. É possível que a água, sendo também um nutriente para a planta, possa ser mais facilmente translocada para a parte aérea, mantendo uma maior taxa de transpiração.

Portanto, pelos dados obtidos, pode-se inferir que muitos outros mecanismos, além da melhora nutricional, estão envolvidos nas alterações em nível de trocas gasosas de plantas micorrizadas.

Um outro dado importante e que merece destaque, refere-se ao fato de que os FMAs produzem grandes quantidades da glicoproteína glomalina (Rillig, 2004), a qual está fortemente relacionada com a estabilidade da estrutura do solo, ou seja, os poros existentes no solo e os agregados.

Então, devido ao fato de que os FMAs afetam a estrutura do solo, parece lógico suspeitar que a colonização micorrízica do solo poderia afetar suas propriedades de retenção de umidade, e assim, o comportamento das plantas crescendo nesses solos, mais particularmente no caso de solos mais secos. Um solo bem estruturado contém mais água disponível do que um solo pobremente estruturado. As hifas penetram nos poros mais finos do solo e grudam-se às partículas através da glomalina. Um contato mais eficiente do solo com a raiz poderia ser traduzido em uma mais alta condutância hidráulica do solo para a raiz (Augé, 2004).

4.8 Densidade estomática

De acordo com a tabela 3, as plantas mic+50P e as plantas s/mic+500P apresentaram maior densidade estomática, maior diâmetro polar e equatorial dos estômatos, sendo que os dois tratamentos não diferiram estatisticamente entre si. As plantas s/mic+50P apresentaram a menor densidade estomática.

TABELA 3: Densidade e diâmetros polar e equatorial dos estômatos de folhas de plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P. Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade. DPEEAb: diâmetro polar dos estômatos da epiderme abaxial; DEEEAb: diâmetro equatorial dos estômatos da epiderme abaxial; razão DP/DE, onde DP: diâmetro polar dos estômatos e DE: diâmetro equatorial dos estômatos. Lavras, MG, 2007.

tratamentos	Nº de estômatos/mm ²	DPEEAb (µm)	DEEEAb (µm)	DP/DE
MIC+ 50P	301,02 a	28,44a	14,4 a	1,97 a
S/MIC+ 50P	249,00 b	20,7b	12,24 b	1,67 a
S/MIC+ 500P	318,42 a	28,26 a	14,4 a	1,96 a

Pela análise microscópica foi observado que os estômatos de *Hevea brasiliensis* se localizam quase exclusivamente na superfície abaxial das folhas, conforme já relatado por Miguel (2005). Ressalta-se que, neste trabalho, todos os cortes paradérmicos para quantificação da densidade estomática foram realizados na região mediana do folíolo central, região de maior número de estômatos na seringueira. Nessa região também foram realizadas todas as medições de resistência estomática e transpiração.

Aumentos na densidade estomática podem permitir que a planta eleve a condutância de gases e, assim, evitar que a fotossíntese seja limitada. Alguns trabalhos têm demonstrado correlações positivas entre o número de estômatos e taxa fotossintética (Castro, 2002). Martins et al. (1993), citação de Cavalcante & Conforto (2002), consideram que, embora a relação entre o número estomático e a eficiência do seu funcionamento não seja muito evidente, a manutenção do controle hídrico via número estomático é bastante significativo.

Em *Hevea brasiliensis* inoculada com o FMA *Glomus mosseae*, a densidade estomática não sofreu alteração como consequência da micorrização (Schwob et al., 1998), ao contrário dos resultados obtidos no presente trabalho, indicando que o *Glomus mosseae* não teve contribuição significativa sobre o

numero de estômatos, embora tenha aumentado a condutância estomática e a concentração intracelular de CO₂.

Cavalcante & Conforto (2002) observaram, em mudas de seringueira (sem inoculação), clone RRIM 600, após 18 meses de desenvolvimento após a enxertia, uma frequência média de 468,83 estômatos/mm², sendo esse valor superior aos encontrados aqui, enquanto Miguel (2005) observou, para plantas adultas desse referido clone, uma frequência de cerca de 373 estômatos/mm².

Diversos fatores atuam de diferentes modos, ocasionando variações entre os valores de densidade estomática encontrados nesses trabalhos. Gómez & Hamsah (1983), citados por Martins & Zieri (2003), observaram diferenças na densidade estomática entre plantas do mesmo clone, entre idades das folhas do mesmo clone (geralmente as mais velhas mostram maior número de estômatos) e entre local de amostragem da folha (maior densidade estomática quanto maior a exposição ao sol).

Em plantas jovens de seringueira do clone RRIM 701, foi constatada correlação positiva entre quantidade de estômatos e transpiração (Coutinho & Conforto, 2001, citados por Miguel, 2005). Quanto maior o número de estômatos/mm², maior a condutância estomática e menor a resistência à difusão dos gases.

Rocha (2005) informa que a relação entre os diâmetros polar (DP) e equatorial (DE) fornece um bom indicativo do formato dos estômatos, sendo que quanto maior a razão DP/DE, mais elipsóide é o formato e maior sua funcionalidade. Entretanto, no presente trabalho, não houve diferença estatística entre os três tratamentos (Tab.3).

A densidade dos estômatos das plantas de seringueira micorrizadas não apresentou diferença estatística em relação às plantas s/mic+500P (Tab. 3). Entretanto, as plantas micorrizadas conseguem manter uma maior taxa de transpiração e menor resistência estomática em relação aos demais tratamentos.

Isso reflete um efeito do fungo micorrízico associado no sentido de manter um influxo de CO₂ para atividade fotossintética, ao mesmo tempo que mantém maior fluxo transpiratório, o qual vai se refletir em temperaturas foliares menores (fig. 12).

4.9 Concentração de açúcares solúveis totais e açúcares redutores

Nas figuras 13A, 13B e 13C são apresentadas as concentrações de açúcares solúveis totais, açúcares redutores e teores estimados de sacarose nas folhas e nas raízes laterais das plantas jovens de seringueira.

Observa-se que, para as plantas mic+50P, houve um aumento na concentração dos açúcares solúveis totais nas folhas e, conseqüentemente da sacarose (Fig 13C) em relação aos demais tratamentos. Nas raízes laterais, a concentração desses açúcares se iguala estatisticamente ao tratamento s/mic+500P, sendo ambos superiores ao tratamento s/mic+50P.

Como mostrado na figura 13B, os menores teores de ARs são encontrados nas folhas das plantas s/mic+500P; e os maiores nas plantas s/mic+50P. As plantas micorrizadas mostram uma concentração de ARs inferior às plantas s/mic+50P e superior às plantas s/mic+500P. Nas raízes laterais das plantas s/mic+500P foi observada uma concentração de açúcares redutores ligeiramente superior aos demais tratamentos; os menores teores são encontrados nas raízes laterais das plantas s/mic+50P.

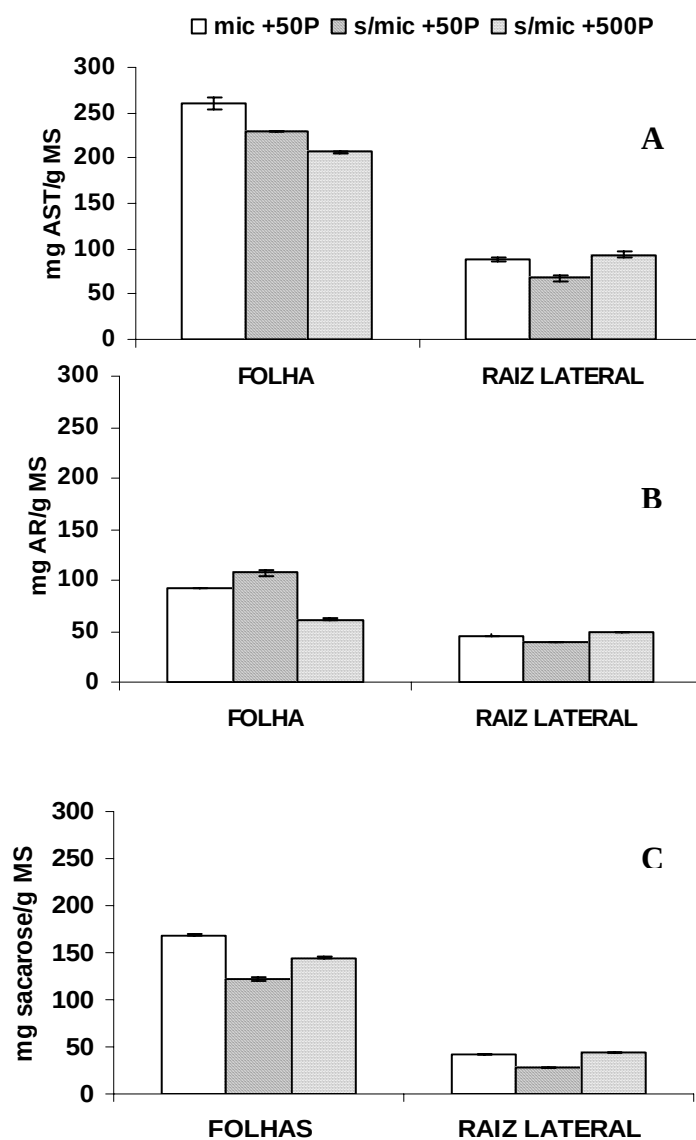


FIGURA 13: A= teores de açúcares solúveis totais (AST), B= açúcares redutores (AR) e C= teores estimados de sacarose em lâminas foliares e raízes laterais de plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P, após 195 dias de cultivo. As barras correspondem ao erro padrão da média de três repetições. Lavras, MG, 2007.

A Figura 13C mostra os teores estimados de sacarose em cada parte das plantas. Observa-se que as folhas das plantas micorrizadas apresentam a maior concentração de sacarose em relação aos dois outros tratamentos. Para as raízes laterais, os teores de sacarose nas plantas micorrizadas igualam-se ao tratamento em s/mic+500P, sendo ambos superiores ao tratamento s/mic+50P.

Açúcares solúveis totais são compostos basicamente por hexoses (redutores) e outros açúcares de cadeias maiores com função de armazenamento e transporte (não-redutores), como a sacarose que, em plantas de seringueira, é essencial para a biossíntese do látex (Tupy, 1985; Castro, 1990; citados por Oliveira, 1999).

A diferença entre os conteúdos de ASTs e ARs representa a disponibilidade total de açúcares com função de transporte, especialmente a sacarose, de acordo com Lima et al. (2002), citado por Melo et al. (2004). Quanto maior a diferença entre os teores de ASTs e de ARs, maiores os teores de sacarose. De acordo com Oliveira (1999), espera-se que folhas maduras apresentem maiores concentrações de sacarose em função da maior taxa metabólica, resultante de uma maior capacidade fotossintética.

Borges & Cheney (1989) mostram que plântulas de *Fraxinus*, inoculadas com *Glomus macrocarpum*, tiveram mais baixos teores de açúcares solúveis do que as plântulas não inoculadas, enquanto soja inoculada com *Glomus mosseae* não mostrou diferenças na concentração de açúcares nas folhas (Brown & Bethlenfalvay, 1988).

Na associação *Citrus/Glomus fasciculatum*, o nível de açúcares redutores nas raízes aumentou, enquanto as folhas apresentaram altos níveis de açúcares solúveis totais, sacarose e açúcares redutores (Nemec & Guy, 1982).

Estima-se que, durante a esporulação, são produzidos cerca de 14000 a 38000 esporos por raiz, sendo que cerca de 45% a 95% do *pool* de carbono, nesses esporos de FMAs, é composto por lipídeos neutros (TAG), de acordo

com Bécard et al. (1991). Por usar carboidratos para estocagem, construção de biomassa e para conversão em energia metabólica, os fungos representam um forte dreno adicional de fotoassimilados (Dosskey et al., 1990).

A sacarose é transportada pelo floema até as raízes micorrizadas, onde é então convertida em compostos específicos de fungos, no caso de FMAs, a trehalose e o glicogênio (armazenamento) e quitina (estrutural) de acordo com Bago et al. (2003). Harrison (1996), citado por Bago et al. (2000), encontrou um aumento significativo na expressão de genes para um transportador de hexoses, o qual está possivelmente envolvido na incorporação de hexoses para dentro do micélio intra-radicular.

Alguns autores têm detectado atividades elevadas de invertases alcalinas em raízes micorrizadas e ausência de ciclagem de sacarose dentro do MER (Schubert et al., 2004), enquanto outros têm encontrado elevados níveis de atividade de invertases ácidas extracelulares nas raízes hospedeiras (Garcia-Rodrigues et al., 2007), o que sugere que a sacarose é convertida em hexose fora do micélio fúngico, sendo, então, capturada pelo micélio intra-radicular.

No micélio intra-radicular, as hexoses são convertidas em trealose e glicogênio (Shacchar-Hill et al., 1995, citado por Bago et al., 2003) e TAG (Pfeffer et al., 1999). Ainda dentro do micélio intra-radicular, a glicólise e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos são ativos, fornecendo intermediários para síntese de aminoácidos e proteínas. Hexoses citoplasmáticas também podem ser metabolizadas pela via das pentoses fosfato, uma vez que é alta a atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase no micélio intra-radicular (Saito, 1995). A operação da rota das pentoses fosfato no micélio intra-radicular leva à síntese de NADPH, ribose-5-fosfato, importante para a síntese de nucleotídeos, os quais são importantes para síntese de citocininas, que, como citado anteriormente, está associada com o maior crescimento das plantas micorrizadas.

Várias enzimas glicolíticas e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos têm suas atividades aumentadas no MIR. A síntese de lipídeos de armazenamento é um forte dreno de carbonos para o MIR, sendo que uma substancial fração de hexoses translocadas para o MIR é convertida a TAG. O glicerol e ácidos graxos precursores do TAG são derivados de hexoses metabolizadas, via glicólise, em trioses fosfato e acetil coenzima A. O glicogênio e o TAG podem ser translocados para o MER e para os esporos em germinação (Shachar- Hill et al., 1995, citados por Bago et al., 2000; Bago et al., 2003).

De acordo com Bago et al. (2000), o ciclo do glioxilato é muito ativo no MER, sendo acoplado à gliconeogênese. As enzimas glicolíticas não têm atividade no MER (Bago et al., 2000). Essas observações são importantes para justificar a maior transferência de carboidratos (hexoses) para o fungo simbiote, o qual corresponde a um dreno adicional dos açúcares produzidos pelo processo fotossintético da planta hospedeira.

De acordo com Graham (2000), a quantidade de carbono requerida por um fungo simbiote varia de 4 a 20% de todo o carbono fixado pela planta hospedeira. Comparando-se os dados obtidos nas plantas micorrizadas com os outros dois tratamentos sem micorrizas, percebe-se que, mesmo apresentando uma baixa taxa de colonização, o fungo aumentou os teores de ASTs e de sacarose estimada nas folhas; e isso não é somente devido apenas a uma melhora nutricional (P), uma vez que o tratamento s/mic+500P apresentou menores teores de ASTs, ARs e sacarose nas folhas, o que sugere o envolvimento de outros fatores. Esse maior teor de ASTs e sacarose nas folhas micorrizadas pode ser consequência do aumento da demanda por carboidratos ocasionada pela presença do FMA.

O tratamento s/mic+50P mostra a menor concentração foliar de sacarose. Esse menor conteúdo de sacarose nas folhas pode ocorrer devido a um aumento de amido, embora não tenham sido realizadas quantificações de amido

nas folhas das plantas de seringueira. Isso acontece pelo fato de existir uma ligação entre fosfato e síntese de sacarose e de amido (Cseke et al., 1984). Quando o fosfato inorgânico é limitado no citosol, ocorrerá uma retenção das trioses fosfato no estroma do cloroplasto, favorecendo a síntese do amido sobre a da sacarose. Após 195 dias de condução do experimento, as plantas s/mic+50P já evidenciavam alguns sinais visuais de deficiência de fósforo.

Esse aumento nas concentrações de sacarose nas plantas micorrizadas foi seguido por aumento nos teores de clorofilas totais e densidade estomática; aumentos na taxa de transpiração com diminuição da resistência estomática; uma melhora nutricional (desde que se leve em consideração o efeito de diluição dos nutrientes nas plantas micorrizadas). Tudo isso refletindo diretamente em uma maior produção de fotoassimilados, para sustentar o metabolismo do vegetal e do fungo simbiote.

As raízes laterais micorrizadas apresentam, em relação às raízes laterais s/mic+500P, concentrações similares de sacarose estimada. O alto nível de fósforo aumentou a massa de raízes, o que justifica uma maior translocação de carboidratos para essas regiões, para construção de aminoácidos e proteínas, para o crescimento e metabolismo radicular.

No caso das raízes laterais micorrizadas, há uma tendência a existir uma maior concentração de ASTs e açúcares redutores em relação às raízes não micorrizadas, de acordo com Jakobsen (1995), uma vez que a demanda de carbono é muito grande, devendo atender às exigências energéticas do fungo e da própria raiz. Entretanto, Garcia-Rodrigues et al. (2007) indicam que uma queda nos níveis de sacarose nas raízes, coincide com a transcrição de genes relacionados às enzimas de clivagem de sacarose. Também, esses mesmos autores informam que as raízes das plantas micorrizadas podem mostrar baixas concentrações de açúcares redutores, o que indica consumo dos produtos de quebra da sacarose.

Neste experimento, deve ser ressaltado que o valor estimado de sacarose nas raízes laterais micorrizadas pode não refletir a concentração de sacarose que realmente alcança as raízes e é convertida em hexoses e daí em compostos de armazenamento do fungo. Portanto, uma grande quantidade de sacarose, muito superior ao que chega a uma raiz em 500 ppm de fósforo, chega a essa região de dreno, pois o teor de açúcares, aqui quantificado, foram os teores de açúcares solúveis totais e redutores, não sendo realizadas quantificações de quitina, glicogênio, trealose (açúcares típicos de fungos), nem tampouco a quantificação do TAG, sintetizado a partir das hexoses oriundas do vegetal.

4.10 Concentração de proteínas solúveis totais e aminoácidos totais

As figuras 14A e 14B apresentam os teores de aminoácidos e proteínas, respectivamente, nas diversas partes das plantas jovens de seringueira, nos três tratamentos, após os 195 dias de inoculação com o FMA.

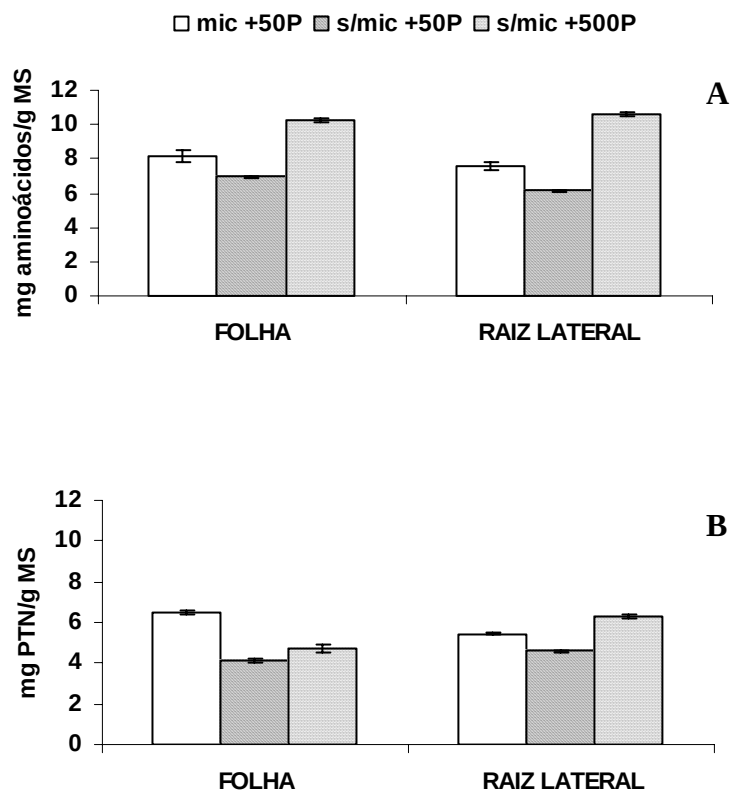


FIGURA 14: A= teores de aminoácidos (aa) e B= teores de proteínas solúveis totais (PTN) em lâminas foliares e raízes laterais de plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P, s/mic+500P, após 195 dias de cultivo. As barras correspondem ao erro padrão da média de três repetições. Lavras, MG, 2007.

A formação de aminoácidos e proteínas é dependente do suprimento de esqueletos de carbono. Esses são derivados de intermediários da glicólise (fosfoenolpiruvato e piruvato) e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos

(oxaloacetato, 2-oxoglutarato). Assim, como o fungo micorrízico aumenta o suprimento de nitrogênio, poderá ocorrer uma maior quantidade de aminoácidos e proteínas para uso pela simbiose e para exportação.

Obviamente, o efeito de aumentar a nutrição nitrogenada não depende somente da disponibilidade de nitrogênio, mas também de outros fatores como suprimento de água e capacidade fotossintética. Se esta for alta o suficiente para atender à necessidade de esqueletos de carbono adicionais para assimilação de nitrogênio (baixa resistência estomática e uma maior densidade de fluxo de fótons, por exemplo), então a partição de carbono dentro da planta, e assim a formação micorrízica, não seriam afetadas (Hampp & Schaeffer, 1999).

Observa-se que houve diferenças significativas nos teores de proteínas solúveis totais e aminoácidos nas folhas das plantas micorrizadas em relação ao tratamento s/mic+50P. Em relação ao tratamento s/mic+500P, as folhas das plantas micorrizadas apresentam maiores teores de proteínas e menores teores de aminoácidos, indicando uma mais alta atividade de síntese protéica. Como visto na figura 13A, as plantas micorrizadas apresentam as maiores concentrações de ASTs nas folhas, o que vai refletir numa maior disponibilidade de intermediários da glicólise para síntese de aminoácidos e, conseqüentemente, proteínas.

A maior concentração de aminoácidos nas folhas das plantas micorrizadas em relação ao tratamento s/mic+50P é justificável, uma vez que as plantas micorrizadas têm maior produção de fotoassimilados, os quais podem suprir a demanda energética das raízes e o metabolismo das folhas, levando a uma maior concentração de aminoácidos e proteínas.

Um dos aminoácidos que pode ter sua concentração aumentada é o triptofano, precursor das auxinas. Um aumento na concentração de triptofano, embora não tenha sido quantificado no presente trabalho, está de acordo com os outros parâmetros avaliados, nos quais se pôde observar o maior crescimento da

parte aérea, raízes laterais e o estímulo à diferenciação de tecidos condutores (no caso, os pólos de xilema, Fig. 17).

Também uma maior captação de nitrogênio, desde que levado em consideração o efeito de diluição do nutriente, associado a uma maior disponibilidade de esqueletos de carbono, contribuiria para uma maior síntese de aminoácidos e proteínas, como observado nas plantas micorrizadas.

Nas raízes laterais, o tratamento micorrizado mostrou um aumento nas concentrações de aminoácidos e proteínas solúveis totais, em relação ao tratamento s/mic+50P, mas inferior ao tratamento s/mic+500P. Isso, possivelmente, devido à baixa colonização radicular. Esses resultados estão de acordo com Gianinazzi-Pearson et al. (1995), que observaram aumentos na concentração de proteínas nos extratos de raízes micorrizadas, o mesmo sendo observado para as raízes de *Trifolium pratense* L. inoculadas com o fungo *Glomus mosseae* (Arines et al., 1993).

Em nível intracelular, a interface entre a membrana arbuscular e a célula vegetal possui alta atividade enzimática, como demonstrado por estudos citoquímicos (Jeanmarie et al., 1988, citação de Arines et al., 1993). Vários processos metabólicos ocorrem na interface fungo-planta e proteínas específicas (endomycorrizas) são produzidas durante as interações celulares em micorrizas arbusculares (Wyss et al., 1980, citação de Arines et al., 1993).

Uma maior captação de N pelas hifas fúngicas faz aumentar a taxa de produção de glutamina e arginina, este o principal aminoácido sintetizado pelo MER, que é translocado para o MIR, onde é convertido em amônio, o qual é liberado para as células hospedeiras. Esse amônio é utilizado pela planta para síntese de aminoácidos e proteínas (Govindarajulu et al., 2005). Isso evidencia a contribuição das hifas fúngicas na captação de nitrogênio. Além disso, as raízes micorrizadas têm alta atividade de enzimas da rota das pentoses fosfato,

glicólise, gliconeogênese, β -oxidação, ciclo do glioxilato, o que justifica uma maior concentração de proteínas e aminoácidos, para síntese das mesmas.

Raízes micorrizadas apresentam ainda alta síntese e atividade de fosfatases alcalinas vacuolares e ATPases, quando a planta cresce num substrato deficiente em P (Saito, 1995).

Ainda de acordo com Arines et al. (1993), a diferença não só na concentração, mas também no padrão de proteínas entre plantas micorrizadas e não-micorrizadas pode ser consequência de fatores como a alta atividade metabólica nas células de raízes contendo os arbúsculos, e também à presença de micélio fúngico interno e externo. Ressalta-se aqui que os atuais conhecimentos acerca de proteínas de fungos micorrízicos arbusculares ainda é muito limitado e não há nenhuma confirmação se as proteínas encontradas são do fungo ou da planta hospedeira.

Pode ser ressaltado também o fato de que muitos genes relacionados à nodulação têm sua expressão aumentada nas MAs, o que aumenta a concentração de proteínas nodulinas, o que sugere o paralelismo entre a nodulação e o processo de infecção micorrízica (Arines et al., 1993). Esses autores encontraram alta atividade de uma isoenzima de SOD (superóxido dismutase) somente nas raízes das plantas micorrizadas. Também uma maior atividade de peroxidase tem sido demonstrada em tais raízes (Spanu & Bonfante-Fasolo, 1988). As atividades de ambas enzimas estão associadas ao mecanismo de defesa da planta contra o estresse oxidativo produzido pela geração de espécies reativas de oxigênio.

4.11 Anatomia da raiz

As figuras 15A, 15B e 15D evidenciam a presença de arbúsculos no interior das células corticais das raízes das plantas jovens de *Hevea brasiliensis* inoculadas com o FMA *Glomus clarum*. As plantas s/mic+50P e s/mic+500P (figuras 16 A-D) não apresentaram nenhuma estrutura fúngica dentro do córtex radicular e nem hifas externas ou internas.

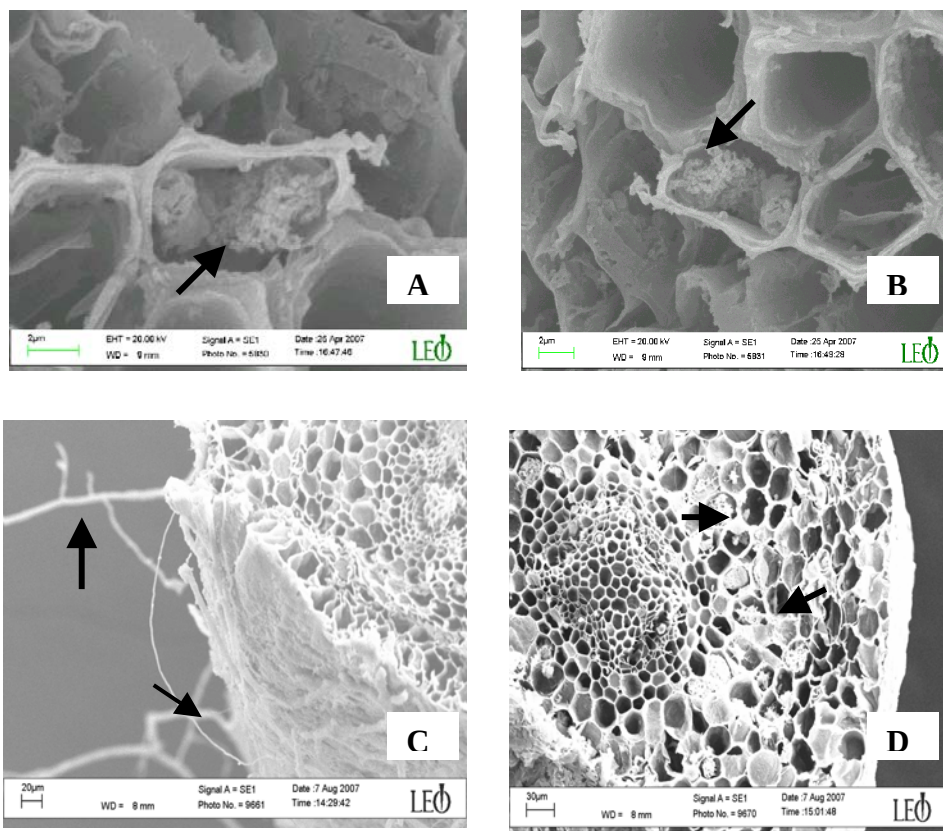


FIGURA 15: Eletromicrografias de varredura de raízes de plantas jovens de seringueira inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*. Os arbúsculos são apontados pelas setas nas figuras A, B e D. A seta na figura C mostra hifas penetrando a raiz. Lavras, MG, 2007.

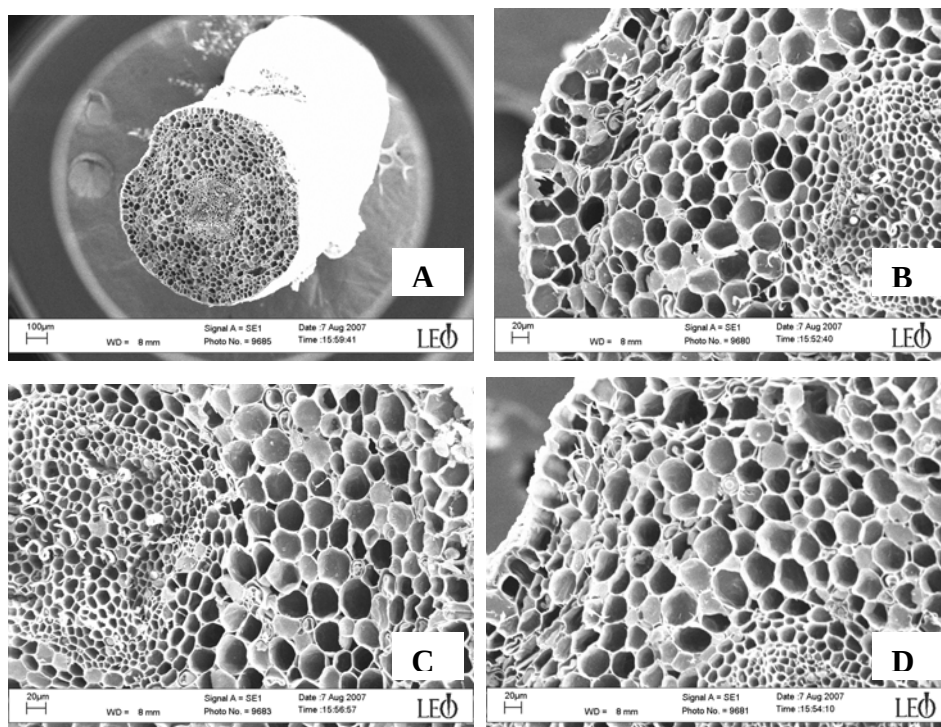


FIGURA 16: Eletromicrografias de varredura de raízes de plantas jovens de seringueira não inoculadas com o fungo micorrízico arbuscular *Glomus clarum*. A: raiz de planta jovem cultivada em 50 ppm de P evidenciando a ausência total de hifas externas; B: região cortical de raiz de planta jovem cultivada em 500 ppm de P com ausência de arbúsculos ou hifas internas; C e D: região cortical de raiz de planta jovem cultivada em 50 ppm de P e também denotando a total ausência de arbúsculos e/ou hifas. Lavras, MG, 2007.

Através da microscopia de varredura foi constatada a presença de estruturas fúngicas dentro das células corticais das raízes inoculadas. Embora não se observe a presença de hifas no espaço intercelular, nota-se a presença de arbúsculos, conforme observado por Schenck (1991). Essas estruturas se formam quando a hifa intracelular da camada mais interna do córtex sofre repetidas divisões dicotômicas, formando este complexo sistema de hifas, ao qual se dá o nome de arbúsculo. Os arbúsculos são envolvidos por uma

plasmalema intacta do hospedeiro e são os sítios preferenciais de intercâmbio de metabólitos entre os simbiontes, possuindo alta atividade fisiológica.

Os arbúsculos têm um período funcional que vai de quatro a cinco dias, quando entram em senescência. Após a sua degeneração, a célula cortical recupera sua atividade normal (Silveira, 1992). Não há dados na literatura que demonstrem a presença, através de eletromicrografias de varredura, de arbúsculos em células corticais de seringueira, pois além destes serem altamente efêmeros, as pesquisas com seringueira micorrizadas são muito raras.

As seções transversais das raízes das plantas de seringueira mostram alterações no número de pólos de xilema (Fig.17). As raízes micorrizadas apresentam um maior número de pólos de xilema (seis) em comparação com os outros dois tratamentos (cinco). Não foram encontrados dados na literatura que possam indicar uma provável contribuição dos FMAs nesse sentido. Entretanto, levando-se em consideração uma maior taxa de transpiração associada a uma maior condutância estomática e menor resistência difusiva, pode-se inferir que um maior número de pólos de xilema contribui para uma maior condutividade hidráulica da raiz, levando a raiz micorrizada a translocar maior volume de água do que as raízes não micorrizadas. Esse fato justifica a maior taxa de transpiração observada nas plantas micorrizadas em relação ao tratamento em alto nível de fósforo, após 195 dias de inoculação.

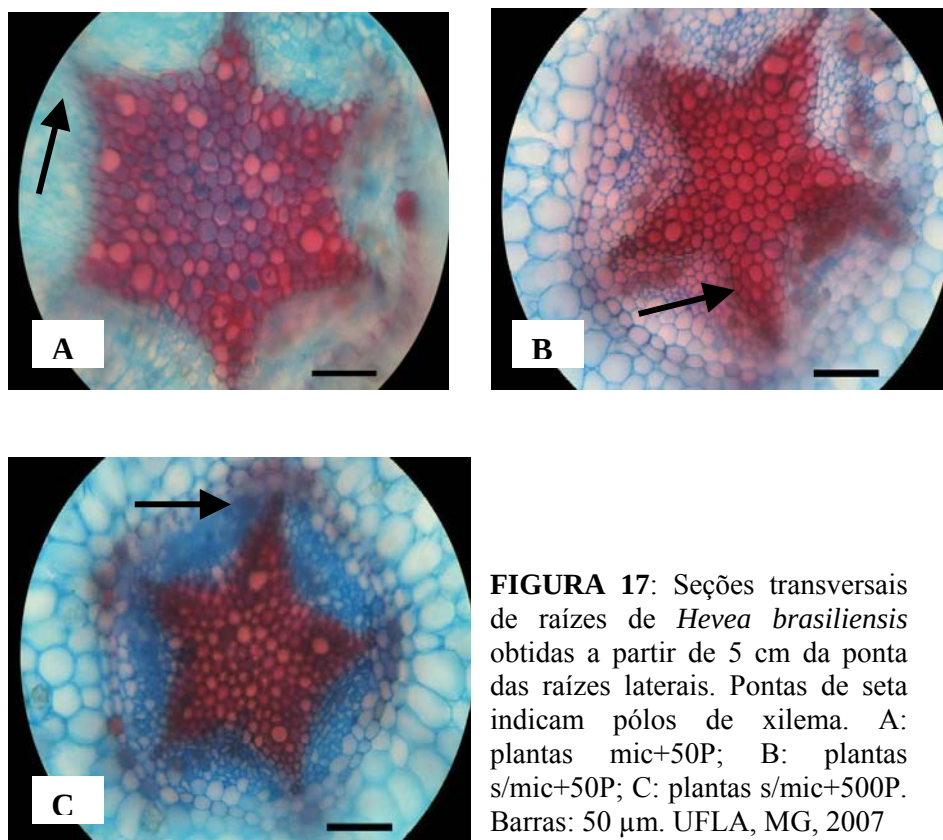


FIGURA 17: Seções transversais de raízes de *Hevea brasiliensis* obtidas a partir de 5 cm da ponta das raízes laterais. Pontas de seta indicam pólos de xilema. A: plantas mic+50P; B: plantas s/mic+50P; C: plantas s/mic+500P. Barras: 50 μ m. UFLA, MG, 2007

A observação de um maior número de pólos de xilema nas raízes micorrizadas está de acordo com Silveira (1992). O autor informa que, apesar de o FMA não causar alterações na morfologia da raiz, alterações anatômicas podem ocorrer como o aumento no tecido vascular da planta, o que facilita a translocação de água e nutrientes.

Níveis aumentados de citocininas nas raízes micorrizadas, como citado anteriormente, poderia explicar em parte esse aumento no número de pólos de xilema, ou seja, uma maior proliferação de células iniciais de vascularização da raiz. Soma-se a isso o fato de que plantas micorrizadas podem possuir também níveis mais elevados de auxinas e estas possuem papel reconhecido na

diferenciação vascular, regulando o número de elementos de vaso e também suas dimensões.

4.12 Atividade radicular da Redutase do Nitrato

Observa-se, na figura 18, que a atividade radicular da redutase do nitrato (RN), nas plantas jovens de *Hevea brasiliensis* micorrizadas, encontra-se mais elevada em relação ao tratamento em baixo nível de P. Entretanto, a maior atividade da enzima foi encontrada nas plantas cultivadas em alto nível de P.

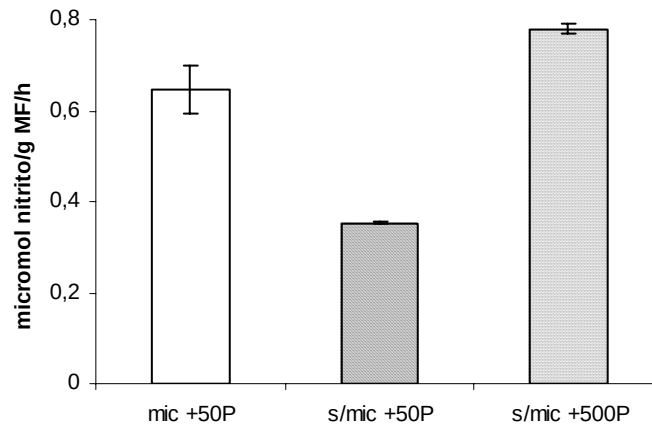


FIGURA 18: Atividade radicular da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira submetidas aos tratamentos mic+50P, s/mic+50P e s/mic+500P, após 195 dias de cultivo. Todas as plantas foram adubadas 48 horas antes do ensaio enzimático com 8 mM de N-nitrato na forma de KNO₃. Lavras, MG, 2007.

De acordo com Delú-Filho et al. (1997a), utilizando ensaio enzimático *in vivo*, a redução do nitrato a nitrito é observada apenas no sistema radicular de plantas jovens de seringueira, ou seja, nenhuma atividade da enzima foi encontrada nas folhas. O mesmo autor cita que essa redução exclusiva de nitrato no sistema radicular reveste-se de importância ecológica, uma vez que a

seringueira, sendo uma planta caducifolia, estaria com seu sistema de redução de nitrato intacto na ocasião de reenfolhamento, não dependendo de retranslocação de N-orgânico de outras partes da planta.

Outros estudos realizados com a RN em seringueira, utilizando a metodologia do ensaio *in vivo* (Lemos et al., 1999; Alves, 2001) não detectaram a atividade dessa enzima nas folhas.

Entretanto, Shan (2007)*, utilizando ensaio *in vitro*, encontrou, além da atividade radicular, fraca atividade da enzima também nos caules da seringueira e, assim como os autores citados anteriormente, nenhuma atividade nas folhas, confirmando a inexistência da enzima nos tecidos foliares.

De acordo com Pereira et al. (1996), a atividade da redutase do nitrato é, em geral, maior em raízes e parte aérea de leguminosas arbóreas bem supridas com fósforo, sem levar em conta se o fator que conduz a essa maior atividade é a adubação fosfatada ou a infecção micorrízica.

Ho & Trappe (1975) encontraram atividade da redutase do nitrato em esporos de *Glomus macrocarpus* e *Glomus mosseae*. Cliquet & Stewart (1993), trabalhando com milho, encontraram aumento na atividade da redutase do nitrato em raízes colonizadas com *Glomus fasciculatum*.

De acordo com Delú-Filho (1994), o fornecimento de 8 mM de N-nitrato na forma de solução nutritiva de Bolle-Jones, às plantas jovens de seringueira não inoculadas, propiciou uma atividade da enzima em torno de 0,43 $\mu\text{moles de NO}_2^- \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$.

Pereira (1995), trabalhando com espécies arbóreas micorrizadas, encontrou a atividade da enzima aumentada nos tratamentos com pré-inoculação e cultivadas com solução nutritiva contendo 4 mM de N-nitrato, sendo que nos tratamentos com solução nutritiva na ausência de N-nitrato ou somente na

* SHAN, A. Tese. Universidade Federal de Lavras. 2007. No prelo.

presença de N-amoniaco não foi possível detectar a atividade da enzima. A presença do nitrato resulta em aumento na atividade da enzima.

Os valores de atividade da RN, observados no presente trabalho, para as plantas micorrizadas e para as plantas s/mic+500P, encontram-se superiores aos valores encontrados por Delú-Filho (1994). A RN encontrada em tecidos não-clorofilados, como as raízes, pode utilizar tanto NADH como NADPH como poder redutor (Taiz & Zeiger, 2004); um maior suprimento de fósforo pode significar em um aumento de NADPH, o que poderia resultar, junto ao fornecimento de N-nitrato, em uma maior atividade da enzima da planta. Junto a isso, uma maior captação de P leva a um aumento da atividade fotossintética, o que é traduzido em maior produção de carboidratos, os quais poderiam estimular a proteína fosfatase, que desfosforila resíduos de serina na proteína RN, promovendo sua ativação, o que justifica a mais alta atividade da enzima no tratamento s/mic+500P.

As plantas micorrizadas apresentaram um aumento de cerca de 83 % na atividade da enzima em comparação com o tratamento não inoculado e submetido à mesma concentração de fósforo no substrato de cultivo. Essa atividade aumentada pode ser justificada tanto em virtude da melhora nutricional, desde que levado em consideração o efeito de diluição dos nutrientes, quanto dos efeitos da micorrização sobre a resistência estomática e taxa de transpiração, contribuindo para uma maior quantidade de carboidratos chegando nas raízes, o que ativaria a enzima.

Informações sobre as propriedades da RN do fungo micorrízico são altamente escassas, devido ao fato de esta ser instável e às dificuldades de se purificar a enzima, sendo que as poucas informações disponíveis são obtidas com estudos de ectomicorrizas.

No presente trabalho, foram utilizadas raízes laterais lavadas em água corrente e água destilada, processo que não exclui completamente o MER,

responsável pela captação dos nutrientes, sendo que o mesmo pode ser visualizado nas figuras 3B e 3D, as quais mostram raízes laterais após tratamento para visualização de estruturas fúngicas.

De acordo com vários autores (Govindarajulu et al., 2005; Bago et al., 2001), o micélio externo possui todas as enzimas necessárias ao metabolismo do nitrogênio, inclusive a redutase do nitrato, sendo que não há evidências de translocação de nitrato para o micélio intra-radicular. Entretanto, após preparo das raízes para ensaio da enzima, a quantidade de micélio externo que resta associado àquelas não é em quantidades suficientes para justificar a elevada atividade da enzima em relação ao tratamento s/mic+50P.

Portanto, o aumento na atividade da enzima nas raízes micorrizadas pode ser devido ao estímulo à enzima da planta hospedeira ocasionado pela micorrização em si, somado à própria atividade da enzima do fungo no micélio externo. Pode-se, ainda, sugerir que talvez haja alguma transferência de nitrato do micélio externo para o interno, onde a redutase do nitrato poderia, também, estar atuando, o que ocasionou a elevada atividade da enzima, uma vez que Kaldorf et al.(1998), citados por Bago et al. (2001) encontraram altos níveis de um transcrito com grande homologia com os genes da redutase do nitrato em arbúsculos do FMA *Glomus intraradices*.

5 CONCLUSÕES

A micorrização artificial com o FMA *Glomus clarum* teve efeito benéfico sobre a altura e diâmetro dos caules das mudas de seringueira, mesmo apresentando uma baixa taxa de colonização radicular.

A micorrização teve efeito positivo sobre as taxas de transpiração, resistência estomática e temperatura média foliar.

Maiores teores de clorofila *a* e alterações no número de pólos de xilema foram observados nas plantas micorrizadas.

As plantas micorrizadas mostraram maior concentração foliar de ASTs e açúcares redutores; maior concentração foliar e radicular de aminoácidos e proteínas em relação ao tratamento não micorrizado e com 50 ppm de fósforo.

A atividade radicular da redutase do nitrato foi aumentada devido à presença da enzima do próprio fungo e do estímulo, por parte deste, à enzima da planta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-FATTAH, G.M.; MIGAHED, F.F.; IBRAHIM, A.H. Interactive effects of endomycorrhizal fungus *Glomus etunicatum* and phosphorous fertilization on growth and metabolic activities of broad bean plants under drought stress conditions. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.5, n.8, p.835-841, 2002.

ALLEN, M.F.; MOORE, T.S. JR.; CHRISTENSEN, M. Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. **Canadian Journal of Botany**, v.58, p.371-374, 1980.

ALVES, E.M. **Redução do nitrato, assimilação do amônio e transporte do nitrogênio em plantas jovens de seringueira**. 2001. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ARINES, J.; PALMA, J.M.; VILARIÑO, A. Comparison of protein patterns in non mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal roots of red clover. **New Phytology**, v.123, p.763-768, 1993.

ARNON, D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Rockville, v.24, n.1, p.1-15, Jan. 1949.

AUGÉ, R.M. Stomatal behavior of arbuscular mycorrhizal plants. In: KAPULNIK, Y.; DOUDS, D.D. **Arbuscular mycorrhizas: physiology and function**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, 2000. p.201-237.

AUGÉ, R.M. Water relations, drought and VA mycorrhizal symbiosis. **Mycorrhiza**, v.11, p.3-42, 2001.

AUGÉ, R.M. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations. **Canadian Journal of Soil Science**, v.84, p.373-381, 2004.

AUGÉ, R.M.; MOORE, J.L.; SYLVIA, D.M.; CHO, K. Mycorrhizal promotion of host stomatal conductance in relation to irradiance and temperature. **Mycorrhiza**, v.14, p.85-92, 2004.

AUGÉ, R.M.; SCHEKEL, K.A.; WAMPLE, R.L. Osmotic adjustment in leaves of VA mycorrhizal non-mycorrhizal rose plants in response to drought stress. **Plant Physiology**, v.82, p.765-770, 1986.

BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. **Plant Physiology**, v.124, p.949-957, Nov. 2000.

BAGO, B.; PFEFFER, P.; SHACHAR-HILL, Y. Could the urea cycle be translocating nitrogen in the arbuscular mycorrhizal symbiosis? **New Phytologist**, v.149, n.1, p.4-8, 2001.

BAGO, B.; PFEFFER, P.E.; ABUBAKER, J.; JUN, J.; ALLEN, J.W.; BROUILLETTE, J.; DOUDS, D.; LAMMERS, P.J.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. **Plant Physiology**, v.131, n.3, p.1496-1507, Mar. 2003.

BAGYARAJ, D.J.; MENGE, J.A. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and *Azotobacter* and their effects on rhizosphere microflora and plant growth. **New Phytologist**, London, v.80, p.567-573, 1978.

BAREA, J.M.; AZCON-AGUILAR, C. Mycorrhizas and their significance in nodulating nitrogen-fixing. **Advances in Agronomy**, New York, v.36, p.1-54, 1983.

BAREA, J.M.; AZCON-AGUILAR, C.; ROLDAN-FAJARDO, B. Avances recientes en el estudio de la micorrizas VA-I. Formacion, funcionamiento y efectos em nutricion vegetal. **Anal. Edafol. Agrobiology**, Madrid, Tomo XLIII, n.6, p.659-677, 1984.

BAREA, J.M.; BONIS, A.F.; OLIVARES, J. Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.15, p.705-709, 1983.

BARROSO, J.; NEVES, H.C.; PAIS, M.S. Production of indole-3-ethanol and indole-3-acetic acid by the mycorrhizal fungus of *Ophrys lutea* (Orchidaceae). **The New Phytologist**, Cambridge, v.103, p.745-749, 1986.

BATAGLIA, O.C.; SANTOS, W.R. dos. Nutrição e adubação de seringais em formação e produção. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE A HEVEICULTURA PAULISTA, 1., 1998, Barretos. **Anais...** Barretos, SP: IAC, 1998.

BÉCARD, G.; DONER, L.W.; ROLIN, D.B.; DOUDS, D.D. Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by *in vivo* ^{13}C NMR and HPLC analyses. **New Phytologist**, v.118, p.547-552, 1991.

BONFANTE, P.; PEROTO, S. Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. **New Phytologist**, v.130, p.3-21, 1995.

BONFANTE-FASOLO, P. Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: POWELL, C.L.; BAGYARAJ, D.J. (Ed.). **VA Mycorrhiza**. Boca Raton: CRC, 1984. cap.2, p.5-33, 1984.

BONOME, L.T. da S. **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Adr. de Juss.) Müell.-Arg.] durante o armazenamento**. 2006. 124 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

BORGES, R.G.; CHANEY, W.R. Root temperature affects mycorrhizal efficacy in *Fraxinus pennsylvanica* marsh. **New Phytologist**, v.112, p.411-418, 1989.

BOWEN, G.D. Mycorrhizal roles in tropical plants and ecosystems. In: MIKOLA, P. (Ed.). **Tropical mycorrhiza research**. Oxford: Clarendon, 1980. p.165-190.

BOWEN, G.D.; SMITH, S.E. The effects of mycorrhizas on nitrogen uptake by plants. In: CLARK, F.E.; ROSSWALL, T. (Ed.). **Terrestrial nitrogen cycles: processes, ecosystem strategies and management impacts**. Stockholm: Swedish National Science Research Council, 1981.

BOYER, J.S. Recovery of photosynthesis in sunflower after a period of low leaf water potential. **Plant Physiology**, v.47, p.816-820, 1971.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, New York, v.72, n.1/2, p. 248-258, 1976.

BROWN, M.S.; BETHLENFALVAY, G.J. The *Glycine-Glomus-Rhizobium* symbiosis. VII. Photosynthetic nutrient-use efficiency in nodulated mycorrhizal soybeans. **Plant Physiology**, v.86, p.1292-1297, 1988.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; DAVIDE, A.C. Fósforo e inoculação com fungos micorrizicos arbusculares no estabelecimento de mudas de embaúba (*Cecropia pachstachya* Trec.) **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.34, n.3, p.119-125, 2004.

CASTRO, E.M. **Alterações anatomicas, fisiológicas e fitoquímicas em plantas de *Mikania glomerata* sprengel (guaco) sob diferentes fotoperíodos e níveis de sombreamento**. 2002. 221 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CAVALCANTE, J.R.; CONFORTO, E.C. Desempenho de cinco clones jovens de seringueira na região do Planalto Ocidental Paulista. **Bragantia**, v.61, n.3, p.237-245, 2002.

CHU, E.Y.; YARED, J.A.G.; MAKI, H.J.O. Efeitos da inoculação micorrizica e da adubação fosfatada em mudas de *Vochysia máxima* Ducke. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.28, n.2, p.157-165, 2004.

CLIQUE, J.B.; STEWART, G.R. Ammonia assimilation in *Zea mays* L. infected with a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. **Plant Physiology**, v.101, n.3, p. 865-871, 1993.

CRUZ, C.; EGSGAARD, H.; TRUJILLO, C.; AMBUS, P.; REQUENA, N.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A.; JAKOBSEN, I. Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. **Plant Physiology**, v.144, p.782-792, June 2007.

CSEKE, C.; BALOGH, A.; WONG, J.H.; BUCHANAN, B.B.; STITT, M.; HERZOG, B.; HELDT, H.W. Fructose 2,6-bisphosphate: a regulator of carbon processing in leaves. **Trends in Biochemical Sciences**, v.9, p.533-535, 1984.

DELÚ-FILHO, N. **Efeito do N-NO₃ sobre o crescimento e atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**. 1994. 87p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

DELÚ-FILHO, N.; OLIVEIRA, L.E.M de.; ALVES, J.D. Atividade da redutase do nitrato em plantas jovens de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) otimização das condições de ensaio e ritmo circadiano. **Revista Árvore**, v.21, n.3, p.329-336, 1997.

DEMCHENKO, K.; WINZER, T.; STOUGAARD, J.; PARNISKE, M.; PAWLOWSKI, K. Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. **New Phytologist**, v.163, p.381-392, 2004.

DOSSKEY, M.G.; LINDERMAN, R.G.; BOERSMA, L. Carbon-sink stimulation of photosynthesis in Douglas fir seedlings by some ectomycorrhizas. **New Phytologist**, v.115, p.269-274, 1990.

DOURADO NETO, D.; DARIO, G.J.A.; JUNIOR, P.A.V.; MANFRON, P.A.; MARTIN, T.N.; BONNECARRÈRE, R.A.G.; CRESPO, P.E.N. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.11, n.1, p.93-102, 2004.

DRÜGE, U.; SCHÖNBECK, F. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection on transpiration, photosynthesis and growth of flax (*Linum usitatissimum* L.) in relation to cytokinin levels. **Journal of Plant Physiology**, v.141, p.40-48, 1993.

ECKARDT, N.A. Insights into plant cellular mechanisms: of phosphate transporters and arbuscular mycorrhizal infection. **The Plant Cell**, v.17, p.3213-3216, Dec. 2005.

EL-RAHEEM, A.; EL-SHANSHOURY, R.; HASSAN, M.A.; ABDEL-GHAFFAR, B.A. Synergistic effect of vesicular-arbuscular-mycorrhizas and *Azotobacter chroococcum* on the growth and the nutrient contents of tomato plants. **Phyton**, Austria, v.29, p.203-212, 1989.

FABER, B.A.; ZASOSKI, R.J.; MUNNS, D.N.; SHACKEL, K. A method for measuring hyphal nutrient and water uptake in mycorrhizal plants. **Canadian Journal of Botany**, v.69, n.1, p.87-94, 1991.

FERNADES, A.R.; CARVALHO, J.G. de; MELO, P.C. Efeito do fósforo e do zinco sobre o crescimento de mudas do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.). **Cerne**, v.9, n.2, p.221-230, jul./dez. 2003.

FITTER, A.H. Water relations of red clover *Trifolium pratense* L. as affected by VA mycorrhizal infection and phosphorus supply before and during drought. **Journal of Experimental Botany**, v.39, p.595-603, 1988.

FITZE, D.; WIEPNING, A.; KALDORF, M.; LUDWIG-MÜLLER, J. Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. **Journal of Plant Physiology**, v.162, p.1210-1219, 2005.

GADKAR, V.; DAVID-SCHWARTZ, R.; KUNIK, T.; KAPULNIK, Y. Arbuscular mycorrhizal fungal colonization. Factors involved in host recognition. **Plant Physiology**, v.127, p.1149-1499, 2001.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, S.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. Transcriptional regulation of host enzymes involved in the cleavage of sucrose during arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Physiologia Plantarum** v.129, n.4, p.737-746, 2007.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; GOLLOTTE, A.; LHERMINIER, J.; TISSERANT, B.; FRANKEN, P.; DUMAS-GAUDOT, E.; LEMOINE, M.C.; VAN TUINEN, D.; GIANINAZZI, S. Cellular and molecular approaches in the characterization of symbiotic events in functional arbuscular mycorrhizal associations. **Canadian Journal of Botany**, v.73, S526-S532, 1995. Supplement, 1

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

GOICOECHEA, N.; ANTOLIN, M.C.; SANCHEZ-DIAZ, M. Gás Exchange is related to the hormone balance in mycorrhizal or nitrogen-fixing alfalfa subjected to drought. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.989-997, 1997.

GOVINDARAJULU, M.; PFEFFER, P.E.; JIN, H.; ABUBAKER, J.; DOUDS, D.D.; ALLEN, J.W.; BÜCKING, H.; LAMMERS, P.J.; SHACHAR-HILL, Y. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Nature**, v.435, n.7043, p.819-823, 2005.

GRAHAM, J.H. Assessing costs of arbuscular mycorrhizal symbiosis agroecosystems. In: PODILA, G.K.; DOUDS, D.D. (Ed.). **Current advances in mycorrhizae research**. St. Paul: APS, 2000. p.127-140.

GRAHAM, J.H.; SYVERTSEN, J.P. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the hydraulic conductivity of roots of two citrus rootstocks. **New Phytologist**, v.97, p.277-284, 1984.

HAMPP, R.; SCHAEFFER, C. Mycorrhiza carbohydrate and energy metabolism. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). **Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology**. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 1999. p.273-303.

HAYMAN, D.S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. VI. Effect of light and temperature. **New Phytologist**, Oxford, v.73, p.71-80, 1974.

HEPPER, C.M. A calorimetric method for estimating vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v.9, p.15-18, 1977.

HEPPER, C. M. Germination and growth of *Glomus caledonius* spores: the effects of inhibitors and nutrients. **Soil Biology and Biochemistry**, v.11, p.269-277, 1979.

HO, I.; TRAPPE, J.M. Nitrate reducing capacity of two vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. **Mycologia**, v.67, p.886-888, 1975.

HOFFMANN, L.V.; LUCENA, V.S. **Para entender micorrizas arbusculares**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 22p. (Embrapa Algodão, Documentos, 156).

HSIAO, T.C. Plant response to water stress. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.4, p.519-570, 1973.

JACQUELINET-JEANMOUGIN, J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S. Endomycorrhizas in the Gentianaceae. II. Ultrastructural aspects of symbiont relationships in *Gentiana lutea* L. **Symbiosis**, v.3, p.269-286, 1987.

JAKOBSEN, I. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhizas. In: VARMA, A.; HOCK, B. (Ed.). **Mycorrhiza: structure, function, molecular biology and biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1995. p.297-324.

JANOS, D.P. Vesicular-arbuscular mycorrhizae affect lowland tropical rain forest plant growth. **Ecology**, v.61, n.1, p.151-162, Feb. 1980.

JIN, H.; PFEFFER, P.E.; DOUDS, D.D.; PIOTROWSKI, E.; LAMMERS, P.J.; SHACHAR-HILL, Y. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. **New Phytologist**, v.168, n.3, p.687-696, 2005.

JOHANSEN, A.; FINLAY, R.D.; OLSSON, P.A. Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **New Phytologist**, v.133, p.705-712, 1996.

KALDORF, M.; LUDWIG-MÜLLER, J. AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, v.109, p.58-67, 2000.

KARABAGHLI-DEGRON, C.; SOTTA, B.; BONNET, M.; GAY, G.; LE TACON, F. The auxin transport inhibitor 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) inhibits the stimulation of in vitro lateral root formation and the colonization of the tap-root cortex of Norway spruce (*Picea abies*) seedlings by the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*. **New Phytologist**, v.140, p.723-733, 1998.

KOIDE, R. Physiology of the mycorrhizal plant. **Advanced Plant Pathology**, v.9, p.33-54, 1993.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997. 198p.

KRUCKELMANN, H.W. Effects of fertilizers, soils, soil tillage and plant species on the frequency of *Endogone* chlamydospores and mycorrhizal infection in arable soil. In: SANDERS, F.E.; MOSSE, B.; TINKER, P.B. (Ed.). **Endomycorrhizas**. London: Academic, 1975. p.511-526.

LABOURIAU, L.C.; OLIVEIRA, J.G.; SALGADO-LABOURIAU, M.L. Transpiração de *Schizolobium parahyba* (Vell) Toledo I. Comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.23, n.2, p.237-257, jun. 1961.

LAMMERS, P.J.; JUN, J.; ABUBAKER, J.; ARREOLA, R.; GOPALAN, A.; BAGO, B.; HERNANDEZ-SEBASTIA, C.; ALLEN, J.W.; DOUDS, D.D.; PFEFFER, P.E. et al. The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus: gene expression and carbon flow. **Plant Physiology**, v.127, n.3, p.1287-1298, 2001.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531p.

LEMOS, G.B.; DELÚ-FILHO, N.; OLIVEIRA, L.E.M.; PURCINO, A.A.C. Atividade das enzimas de assimilação do nitrogênio em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.2, p.113-118, 1999.

LILLO, C.; MEYER, C.; LEA, U.S.; PROVAN, F.; OLTEDAL, S. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1275-1282, 2004.

LIMA, P.C. **Dependência da seringueira as micorrizas vesículo-arbusculares, em função de doses de fósforo, zinco e cobre adicionadas em um Latossolo Vermelho-Amarelo**. 1989. 108 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

LIMA, P.C.; SOUZA, P.; OLIVEIRA, E. Efeitos de micorrizas vesicular-arbusculares no desenvolvimento de mudas de seringueira. In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 1., 1986, Lavras. **Anais...** Lavras, MG: ESAL, 1986. v.1, p.155-155.

LOPES, E.S.; SIQUEIRA, J.O.; ZAMBOLIM, L. Caracterização das micorrizas vesicular-arbusculas (MVA) e seus efeitos no crescimento das plantas. Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.7, n.1, p.1-19, 1983.

LOPES, O.M.N. **Efeitos de diferentes doses de fósforo e da colonização fúngica da raiz sobre o crescimento e a absorção de nutrientes em seringueira (*Hevea brasiliensis*, Muell. Arg.)**. 1988. 75p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP.

LUDWIG-MÜLLER, J.; KALDORF, M.; SUTTER, E.G.; EPSTEIN, E. Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays*) L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. **Plant Science**, v.125, p.153-162, 1997.

MALAVOLTA, E. **Elementos da nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: CERES, 1980. 251 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. London: Academic, 1997. 889p.

- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. In: ROBSON, A.D.; ABBOTT, L.K.; MALAJCZUK, N. **Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry**. Boston: Kluwer Academic, 1994. p.89-102.
- MARTINS, M.B.G.; ZIERI, R. Leaf anatomy of Rubber-tree clones. **Scientia Agricola**, v.60, n.4, p.709-713, Oct./Dec. 2003.
- MARULANDA, A., AZCON, R.; RUIZ-LOZANO, J.M. Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. **Physiologia Plantarum**, v.119, n.4, p.526-533, 2003.
- MELARATO, M.; PANOBIANCO, M.; VITTI, G.C.; VIEIRA, R.D. Manganês e potencial fisiológico de sementes de soja. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.6, p.1069-1071, 2002.
- MELO, R.F.; OLIVEIRA, L.E.M.de.; MESQUITA, A.S.; DELÚ-FILHO, N. Variação sazonal de algumas características nutricionais e bioquímicas relacionadas com a produção de látex em clones de seringueira [*Hevea brasiliensis* (Wild.) Muell. Arg.], em Lavras – MG. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.6, p.1326-1335, nov./dez. 2004.
- MIGUEL, A.A. **Comportamento fotossintético e caracterização morfoanatômica de folhas de diferentes clones de seringueira (Hevea spp), em Lavras-MG**. 2005. p.155. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MILLER, E.L. Use of dinitrosalicylic and reagent determination of sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, p.426-428, 1959.
- MILLER, J.C.; RAJAPAKSE, S.; CABER, R.K. Vesicular-arbuscular mycorrhizae in vegetable crops. **Horticultural Science**, Minesota, v.21, n.4, p.974-983, 1986.
- MIRANDA, J.C.C. de; MIRANDA, L.N. de. Micorriza arbuscular. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.67-111.
- MORANDI, D. Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. **Plant and Soil**, v.185, p.241-251, 1996.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. v.1, p.729.

NAGY, S.; NORDY, H.E.; NEMEC, S. Composition of lipids in roots of six citrus cultivars infected by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **New Phytologist**, v.85, p.377-384, 1980.

NELSEN, C.E.; SAFIR, G.R. Increased drought tolerance of mycorrhizal onions due to improved phosphorus nutrition. **Planta**, v.154, p.407-413, 1982.

NEMEC, S.; GUY, G. Carbohydrate status of mycorrhizal and nonmycorrhizal citrus rootstocks. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.107, n.2, p.177-180, 1982.

O'KEEFE, D.M.; SYLVIA, D.M. Mechanisms of the vesicular-arbuscular mycorrhizal plant-growth response. In: ARORA, D.K.; RAI, B.; MUKERJI, D.G.; KNUDSEN, G.R. (Ed.). **Handbook of applied mycology**. New York: M. Dekker, 1991. p.35-53.

OIHABI, A.; PERRIN, R.; MARTY, F. Effect des mycorhizes V.A. sur la croissance et la nutrition minérale du palmier dattier. **Revue du Réseau pour L'Amélioration de la Productivité Agricole en Milieu Aride**, v.5, p.1-9, 1993.

OLIVER, A.J.; SMITH, S.E.; NICHOLAS, D.J.D.; WALLACE, W.; SMITH, F.A. Activity of nitrate reductase in *Trifolium subterraneum* L.: effect of mycorrhizal infection and phosphate nutrition. **The New Phytologist**, v.94, n.1, p.63-79, 1983.

OLIVEIRA, D.P. de. **Variação sazonal da produção de borracha e da atividade da invertase nos clones RRIM-600 e GT-1 de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)**. 1999. 71p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLSSON, P.A.; VAN AARLE, I.M.; ALLAWAY, W.G.; ASHFORD, A.E.; ROUBIER, H. Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular mycorrhiza cultures. **Plant Physiology**, v.130, p.1162-1171, 2002.

OLSSON, P.A.; HANSSON, M.C.; BURLEIGH, S.H. Effect of P availability on temporal dynamics of carbon allocation and *Glomus intraradices* high-affinity P transporter gene induction in arbuscular mycorrhiza. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.6, p.4115-4120, June 2006.

PAULA, M.A. **Interação micorrizas vesículo-arbusculares e bactérias diazotróficas em batata-doce (*Ipomoea batatas* (L) Lam).** 1992. 168p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

PAULA, M.A.; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.11, p.111-115, 1991.

PENG, S.; EISSENSTAT, D.M.; CRAHAM, J.H.; WILLIAMS, K.; HODGE, N.C. Growth depressions in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply. **Plant Physiology**, v.101, p.1063-1071, 1993.

PEREIRA, E.G. **Micorrização e fósforo no solo na resposta de espécies arbóreas a nitrogênio mineral.** 1995. 65 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, E.G.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N.; MOREIRA, F.M.S.; PURCINO, A.A.C. Efeitos da micorriza e do suprimento de fósforo na atividade enzimática e na resposta de espécies arbóreas ao nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.1, p.59-65, 1996.

PFEFFER, P.E.; DOUDS, D.D.; BÉCARD, G.; SHACHAR-HILL, Y. Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. **Plant Physiology**, v.120, p.587-598, 1999.

PHILLIPS, J.M.; HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment for infection. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v.55, p.158-161, 1970.

REID, C.P.P.; BOWEN, G.D. Effect of water stress on phosphorus uptake by mycorrhizas of *Pinus radiata*. **New Phytologist**, v.83, p.103-107, 1979.

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

ROCHA, F.S.; SAGGIN JUNIOR, J.O.; SILVA, E.M.R.da; LIMA, W.L. de. Dependência e resposta de mudas de cedro a fungos micorrizicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.1, p.77-84, jan. 2006.

ROCHA, H.S. **Luz e sacarose na micropropagação da Banana “Prata Anã”:** **Alterações morfoanatômicas.** 2005. 98 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RUIZ-LOZANO, R.; AZCÓN, R. Hyphal contribution to water uptake in mycorrhizal plants as affected by the fungal species and water status. **Physiologia Plantarum**, v.95, n.3, p.472–478, 1995.

SAIF, S.R. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Effect of soil oxygen on the growth and mineral uptake of *Eupatorium odoratum* L., inoculated with *Glomus macrocarpus*. **New Phytologist**, v.88, p.649–659, 1981.

SAIF, S.R. The influence of soil aeration on the efficiency of vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Effect of soil oxygen on the growth and mineral uptake of *Eupatorium odoratum* L., *Sorghum bicolor* (L.) Moench and *Guizotia abyssinica* (L.f.) Cass. inoculated with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, v.95, p.405-417, 1983.

SAITO, M. Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker and Hall . **New Phytologist**, v.129, n.3, p.425-431, 1995.

SCHENCK, N.C. **Methods and principles of mycorrhizal research.** St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society, 1991. 224p.

SCHUBERT, A.; ALLARA, P.; MORTE, A. Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**, v.161, n.2, p.495–501, 2004.

SCHWOB, I.; DUCHER, M.; SALLANON, H.; COUDRET, A. Growth and gas exchange responses of *Hevea brasiliensis* seedlings to inoculation with *Glomus mosseae*. **Trees**, v.12, p. 236-240, 1998.

SCHWOB, I.; DUCHER, M.; COUDRET, A. Effects of climatic factors on native arbuscular mycorrhizae and *Meloidogyne exigua* in a brasilian rubber tree (*Hevea brasiliensis*) plantation. **Plant Pathology**, v.48, p.19-25, 1999.

SENA, J.O.A. de. **Caracterização bioquímica da depressão de crescimento de porta-enxertos cítricos inoculados com fungos micorrízicos arbusculares em doses altas de fósforo**. 1998. 111p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, SP.

SILVA, S. da. **Fungos micorrízicos arbusculares no crescimento, extração de metais pesados e características anatômicas da *brachiaria decumbens* stapf. em solo contaminado**. 2006. 82p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas, SP: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. cap. 19, 360p.

SIQUEIRA, J.O.; LAMBAIS, M.R.; STÜRNER, S.L. Fungos micorrízicos arbusculares. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n.25, p.12-21, mar./abr. 2002.

SMITH, S.E. Mycorrhizas of autotrophic higher plants. **Biological Reviews**, v.55, p.475-510, 1980.

SMITH, S.E.; READ, D.J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2.ed. San Diego: Academic, 1997. 605p.

SNELLGROVE, R.C.; SPLITTSTOESSER, W.E.; STRIBLEY, D.P.; TINKER, P.B. The distribution of carbon and the demand of fungal symbiont in leek plants with vesicular-arbuscular mycorrhizas. **New Phytologist**, v.92, n.1, p.75-87, 1982.

SOARES, A.C.F.; GARRIDO, M. da S.; AZEVEDO, R.L.; MENDES, L. do N.; GRAZZIOTTI, P.H. Produção de mudas de ipê roxo inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v.15, n.2, p.123-127, jul./dez. 2003.

SPANU, P.; BONFANTE-FASOLO, P. Cell-wall-bound peroxidase activity in roots of mycorrhizal *Allium porrum*. **New Phytologist**, v.109, p.119-124, 1988.

SUBRAMANIAN, K.S.; CHAREST, C. Acquisition of N by external hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus and its impact on physiological responses in maize under drought-stressed and well-watered conditions. **Mycorrhiza**, v.9, n.2, p.285-296, 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAMASLOUKHT, M.B.; SEJALON-DELMAS, N.; KLUEVER, A.; JAUNEAU, A.; ROUX, C.; BÉCARD, G.; FRANKEN, P. Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. **Plant Physiology**, v.131, p.1468-1478, 2003.

TAWARAYA, K.; TAKAYA, Y.; TURJAMAN, M.; TUAH, S.J.; LIMIN, S.H.; TAMAI, Y.; CHA, J.Y.; WAGATSUMA, T.; OSAKI, M. Arbuscular mycorrhizal colonization of tree species grown in peat swamp forests of Central Kalimantan, Indonesia. **Forest Ecology and Management**, v.182, p.381-386, 2003.

THODEN, J.B.; HOLDEN, H.M.; WESENBERG, D.; RAUSHEL, F.M.; RAYMENT, I. Structure of carbamoyl phosphate synthetase: a journey of 96 Å from substrate to product. **Biochemistry**, v.36, p.6305-6316, 1997.

TINKER, P.B. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and plant growth. **Physiologie Vegetale**, v.16, p.743, 1978.

TOUSSAINT, J.P.; ST-ARNAUD, M.; CHAREST, C. Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, n.4, p.251-260, Apr. 2004.

TRISTÃO, F.S.M.; ANDRADE, S.A.L. de; SILVEIRA, A.P.D. da. Fungos micorrízicos arbusculares na formação de mudas de caféiro, em substratos orgânicos comerciais. **Bragantia**, v.65, n.4, p.649-658, 2006.

VIÉGAS, I. de J.M.; HAAG, H.P.; BUENO, N.; PEREIRA, J. da P. Nutrição mineral de seringueira. XII. Absorção de macro e micronutrientes nos primeiros 240 dias. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, SP, v.41, n.1, p.41-52, 1992.

VIERHEILIG, H.; ISELI, B.; ALT, M.; RAIKHEL, N.; WIEMKEN, A.; BOLLER, T. Resistence of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. **Plant Soil**, v.183, p.131-136, 1996.

VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T.; VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **Plant Journal**, v.3, p.315-324, 1993.

VOGT, K.A.; PUBLICOVER, D.A.; VOGT, D.J. A critique of the role of ectomycorrhizas in forest ecology. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.35, n.2-3, p.171-190, 1991.

WU, Q.S.; XIA, R.X. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p.417-425, 2006.

YEMM, E.W.; COCKING, E.C. The determination of amino acid with ninhydrin. **Analyst**, London, v.80, p.209-213, 1955.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v.57, n.3, p.508-514, 1954.