

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA- UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA RURAL -ENR



RELATÓRIO DE ESTÁGIO:

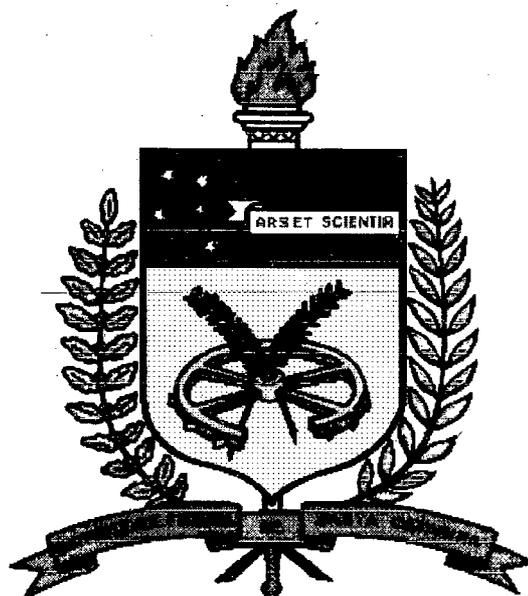
**Produção de Inóculo de Fungos Micorrízicos
Arbusculares e sua Utilização na Produção de
Plantas de Macieira Micropropagadas**

Acadêmico: SADI CASSOL

Orientador: PROF.º PAULO EMÍLIO LOVATO

FLORIANÓPOLIS, OUTUBRO DE 1995.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA- UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA RURAL -ENR**



RELATÓRIO DE ESTÁGIO:

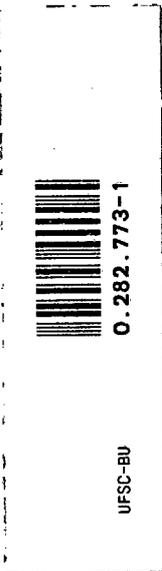
**Produção de Inóculo de Fungos Micorrízicos
Arbusculares e sua Utilização na Produção de
Plantas de Macieira Micropropagadas**

Acadêmico: SADI CASSOL

Orientador: PROF. PAULO EMÍLIO LOVATO

FLORIANÓPOLIS, OUTUBRO DE 1995.

Produção de Inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares e sua Utilização na Produção de Plantas de Macieira Micropropagadas



Sadi Cassol¹

**Relatório apresentado como um dos requisitos ao Grau de Engenheiro
Agrônomo pelo Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de
Santa Catarina (UFSC)**

Florianópolis

Outubro, 1995

¹ Acadêmico do Curso de Agronomia (CCA/UFSC)

138727

Identificação

Acadêmico: Sadi Cassol

Nº de Matrícula: 9128634-4

**Orientador: Paulo Emílio Lovato, Dr., Prof. Adjunto, Depto. de
Engenharia Rural/CCA - UFSC.**

**Supervisor: Alexandre V. Nogueira, Dr., Prof. Adjunto, Depto. de
Microbiologia e Parasitologia/CCB - UFSC.**

**Local de Estágio: Departamento de Microbiologia e Parasitologia.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).**

Período: 01 à 31 de Agosto de 1995.

Agradecimentos

Aos meus pais (Orlando e Josefina) e irmãos pela compreensão, carinho e apoio dedicados durante a realização do curso.

Ao professor Paulo E. Lovato pelo sua orientação, apoio e dedicação para a realização deste trabalho.

Ao professor Alexandre V. Nogueira pelo seu apoio e orientação.

Ao Coordenador de estágio Prof^o. Paulo R. Gondin pelo apoio e compreensão.

A todos os professores e funcionários do Centro de Ciências Agrárias (UFSC), pelos seus ensinamentos e colaboração durante os cinco anos de formação.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE PROTOCOLOS.....	vii
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Conceito	4
3.2 Tipos de Micorrizas	5
3.2.1 Ectomicorrizas.....	5
3.2.2 Ectendomicorrizas.....	5
3.2.3 Endomicorrizas.....	5
3.3 Produção de Inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares	7
3.4 Importância da Inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Plantas Micropropagadas	9
3.5 Procedimentos para a Inoculação de FMA em Explantes.....	11
3.5.1 Época da Inoculação	12
3.5.2 Composição de Substrato.....	12
3.5.3 Tipo do Inoculante	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Produção de Inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares	15
4.2 Aclimatização e Micorrização de Plantas de Macieira Micropropagadas	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5.1 Produção de Inóculo	18
5.2 Aclimatização e Micorrização de Plantas de Macieira Micropropagadas	21
5.2.1 Sobrevivência de Plantas.....	21
5.2.2 Avaliação do Crescimento de Parte Aérea	23
5.2.3 Dinâmica de Crescimento Radicular	26
5.2.4 Dinâmica de Infecção Radicular.....	29
6. CONCLUSÕES	31
6.1 Produção de Inóculo	31
6.2 Aclimatização e Micorrização de Plantas de Macieira Micropropagadas	31
7. AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ACLIMATIZAÇÃO UTILIZADA E RECOMENDAÇÕES PARA AÇÕES FUTURAS	33
7.1 Unidade Amostral.....	33
7.2 Bandejas.....	34
7.3 Substrato	34
8. BIBLIOGRAFIA CITADA.....	36
9. ANEXO 1	ix
ANEXO 2	xiii

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Micorriza vesicular-arbuscular (A); ectomicorriza (B);ectendomicorriza (C).....	6
Figura 2: Esquema de produção de plantas micropropagadas emicorrizadas.....	13
Figura 3: Percentagem de córtex radicular micorrizado (M%) em plantas de <i>Paspalum notatum</i> var. <i>saurea</i> cultivado em dois tipos de substratos (TR + areia, 1 : 3 v/v e PV + areia, 1 : 2 v/v) por três espécies de fungos micorrízicos arbusculares (<i>G etunicatum</i> , <i>G. mosseae</i> e <i>G. caledonium</i>).....	19
Figura 4: Número de esporos produzidos por três espécies de <i>Glomus</i> (<i>G. etunicatum</i> , <i>G. mosseae</i> e <i>G. caledonium</i>), inoculados em <i>Paspalum notatum</i> var. <i>saureae</i> cultivado em dois tipos de substratos elaborados a partir de solo TR + areia (1 : 3 v/v) e solo PV + areia (1 : 2):.....	20
Figura 5: Incremento médio de altura de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagado não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC) em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).....	24
Figura 6: Incremento médio de altura de plantas do porta-enxerto M 9 micropropagado não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC) em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).....	25
Figura 7: Comprimento de raízes de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagado não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC) em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).....	26
Figura 8: Comprimento de raízes de plantas do porta-enxerto M 9 micropropagado, não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC), em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).....	28
Figura 9: Infecção radicular em raízes de plantas do porta-enxerto M9 micropropagado não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC) em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).....	29

LISTA DE PROTOCOLOS

Protocolo 1: Inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Porta-enxertos de Macieira Micropropagados	xiii
Protocolo 2: Produção de Inóculo de Isolados de Fungos Micorrízicos Arbusculares.....	xviii
Protocolo 3: Avaliação da Infecção Radicular	xxii
Protocolo 4: Técnica de Descoloração de Raízes para Observação de Fungos Micorrízicos Arbusculares	xxiii
Protocolo 5: Separação de Esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares do solo	xxiv

RESUMO

Inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Porta-enxertos de Macieira Micropropagados Adaptados às Condições do Sul do Brasil.

A biotecnologia de plantas e de microorganismos pode contribuir para o aumento da produtividade agrícola e diminuição de seu impacto ao ambiente. Entre essas técnicas biotecnológicas podem ser destacadas a micropropagação e a utilização das micorrizas. Estas constituem-se em associações mutualistas dinâmicas entre determinados fungos de solo e a maioria das espécies de plantas. No sul do Brasil estas biotecnologias oferecem perspectivas para melhorar a produção de mudas de macieira com consequente efeito sobre a produtividade da cultura. Numerosas pesquisas com plantas micropropagadas têm demonstrado que a introdução de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pode contribuir para o crescimento e desenvolvimento dessas plantas. Dentro deste aspecto, o presente trabalho tem como objetivo geral desenvolver procedimentos para a inoculação de FMA em porta-enxertos de macieira micropropagados com vistas à otimização da produção dessas plantas, além da produção de inóculo de FMA como atividade de apoio. A produção de inóculo dos isolados de *G. etunicatum*, *G. mosseae* e *G. caledonium* foi realizada testando dois tipos de substratos esterilizados: substrato 1 (Terra Roxa Estruturada - TR + areia, 1 : 3 v/v) e substrato 2 (Podzólico Vermelho Amarelo - PV + areia, 1 : 2 v/v). A multiplicação foi feita em vasos, utilizando como hospedeiro *Paspalum notatum* var. *saurea*. Após 4 meses de cultivo foi coletada uma amostra de plantas e solo para avaliação da % de colonização radicular, e número de esporos/100g de solo. O inóculo de *G. etunicatum* produzido foi utilizado em um experimento de aclimatização de mudas micropropagadas dos porta-enxertos de macieira M9 e Marubakaido. Os explantes foram repicados para substrato composto de Terra Roxa Estruturada (TR) + casca de arroz carbonizada + areia (4:2:3 v/v/v) ao qual foram adicionados previamente, 3,7g de inóculo (solo e raízes infectadas). Os tratamentos consistiram de dois porta-enxertos M9 e Marubakaido, não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC), em substrato não corrigido (pH 4,8) e corrigido (pH 5,8), com 4 repetições de cada tratamento. Duas, quatro e seis semanas após a repicagem foi avaliada a sobrevivência e o incremento na altura de plantas, sendo posteriormente retirada uma amostra de plantas para avaliação do comprimento de radículas. Como resultado da produção de inóculo, observou-se que para o isolado de *G. etunicatum* utilizado os melhores resultados foram obtidos no substrato 1, e para o isolado de *G. mosseae* os melhores resultados foram obtidos no substrato 2. Em relação à aclimatização de plantas, o índice de sobrevivência foi maior para o porta-enxerto Marubakaido (98%) em relação ao M9 (66%) devido a melhor combinação de características genéticas e de melhor controle no processo de micropropagação. Para o parâmetro incremento na altura de plantas, os melhores resultados foram para o porta-enxerto Marubakaido nos tratamentos inoculados, apresentando menor comprimento de raízes. Os índices de colonização radicular obtidos para os dois porta-enxertos foram de 26% em substrato corrigido, mostrando que esse isolado de *G. etunicatum* não conseguiu estabelecer altos índices de infecção em substrato com pH baixo. Os passos seguintes serão a realização de testes de substratos e avaliação dos procedimentos de transferência das plantas de *in vitro* para *post-vitro* a fim de otimizar a produção dessas plantas.

1. INTRODUÇÃO

Grandes avanços na agricultura foram conseguidos nas últimas décadas, através de tecnologias baseadas no uso intensivo de fertilizantes e agrotóxicos. As preocupações crescentes com o impacto deste tipo de agricultura, sobre a qualidade de vida e do meio ambiente, a elevação nos custos dos insumos aplicados na agricultura e a necessidade de melhorar a eficiências dos sistemas produtivos têm despertado grande interesse dos pesquisadores, dos agricultores e de outros setores por tecnologias menos agressivas ao ambiente.

A biotecnologia de plantas e de microorganismos pode contribuir para o aumento da produtividade agrícola e diminuição do seu impacto sobre o meio ambiente. Entre estas técnicas biotecnológicas podem ser destacadas a micropropagação e a utilização das micorrizas. Estas constituem-se em associações mutualistas dinâmicas entre determinados fungos de solo e as raízes da maioria das espécies de plantas. Entre os benefícios proporcionados pelas micorrizas podemos citar o incremento da eficiência do sistema radicular na exploração de nutrientes do solo, principalmente aqueles de baixa concentração na solução do solo como o fósforo, o incremento da resistência natural das plantas a microorganismos patogênicos e o aumento da tolerância a elementos tóxicos como o alumínio e manganês.

Um volume crescente de pesquisas na área das micorrizas evidenciou a natureza dos seus efeitos, bem como as potencialidades para a exploração das micorrizas nos sistemas de produção, desde aqueles de subsistência até os mais tecnificados. As possibilidades de uso das micorrizas vão de programas de recuperação ecológica como o caso dos solos erodidos

ou perturbados pela mineração e construção civil, passando pela recuperação da vegetação e fixação de dunas costeiras, até sistemas altamente tecnificados, como a propagação de plantas *in vitro*, onde os microorganismos, inclusive os mutualistas, são eliminados.

A micorrização oferece assim a possibilidade de produção de plantas com alta qualidade e baixo uso de insumos químicos, contribuindo desta forma para redução do custo de produção das mesmas e minimizando os efeitos adversos da agricultura sobre o meio ambiente.

Desde 1985 a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) tem desenvolvido pesquisas na área das micorrizas. No campo das endomicorrizas estão sendo desenvolvidos trabalhos relacionados com a fixação de dunas, produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares e inoculação destes fungos em plantas micropropagadas produzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais no Centro de Ciências Agrárias.

É importante ressaltar que a UFSC conta com uma equipe com experiência de pesquisa em fruteiras, e atualmente está desenvolvendo dois projetos com o objetivo de elaborar tecnologias para a produção de mudas de plantas micropropagadas e micorrizadas de macieira e abacaxizeiro. São áreas em que o uso integrado de novas tecnologias, como a micropropagação e a micorrização, abrem perspectivas para a melhoria na produção de plantas de alto valor.

Neste contexto, houve a motivação para a realização do estágio de conclusão nesta área, desenvolvendo o trabalho de produção de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares e sua utilização na produção de plantas de macieira micropropagadas.

2 - OBJETIVOS

1. Multiplicar três isolados de fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus etunicatum*, *G. mosseae* e *G. caledonium*), testando dois substratos constituídos por Terra Roxa Estruturada e Podzólico Vermelho-Amarelo misturados com areia;
- 2- Testar a eficiência de uma técnica de aclimatização de porta-enxertos de macieira micropropagados em relação ao crescimento das plantas e desenvolvimento da simbiose;
- 3- Medir o crescimento de raízes dos porta-enxertos de macieira M9 e Marubakaido micropropagados em duas, quatro e seis semanas de aclimatização;
- 4- Medir a infecção micorrízica nos porta-enxertos de macieira M9 e Marubakaido micropropagados e inoculados com um isolado de *Glomus etunicatum* originário do NPI (EUA);
- 5- Medir o efeito da calagem do substrato e da inoculação de fungos micorrízicos sobre o crescimento da parte aérea e do sistema radicular das plantas dos dois porta enxertos de macieira micropropagados;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Conceito

O termo micorrizas foi inicialmente proposto em 1885 pelo botânico alemão Albert Bernard Frank originando-se do grego, onde “mico” significa fungo e “riza” significa raízes. Essas associações já eram conhecidas há pelo menos 50 anos antes de Frank, mas consideradas de natureza parasítica. Este mesmo pesquisador demonstrou em 1894 que a colonização das raízes das plantas por determinados fungos resultava em micélio abundante na rizosfera, o que ajudava a absorver os nutrientes e não causava prejuízo às plantas. Estudos recentes mostraram que a micorriza é uma das poucas associações entre fungo e planta com registros fósseis, que pode ter facilitado o estabelecimento das plantas na terra (SIMON et al., 1993). Caracteriza-se, portanto, como uma associação de natureza mutualística desde sua origem.

Baseando-se na natureza física, aspectos nutricionais, funcionais e ecológicos das relações entre as plantas e os microorganismos, as micorrizas podem ser definidas como: **“simbioses endofíticas¹, biotróficas², e mutualistas prevalentes na maioria das plantas vasculares nativas e cultivadas”**. Caracterizam-se pelo contato íntimo e a perfeita integração morfológica entre o fungo e a planta pela regulação funcional e troca de metabólitos, com benefícios mútuos. Deste modo micorrizas não se referem apenas aos fungos, mas à associação mutualista entre fungos e raízes.

¹ Só vivem no interior das raízes dos vegetais;

² Vivem somente associadas a organismos vivos; a planta fornece substrato energético ao fungo, e este, através da rede de hifas externas, capta nutrientes da solução do solo e os transfere à planta hospedeira (Cardoso et al., 1992).

3.2 - Tipos de Micorrizas

As micorrizas são de ocorrência generalizada, estando presentes dos polos gelados às florestas tropicais úmidas e desertos, podendo-se afirmar que: “**Plantas não tem raízes, têm micorrizas**” ou “**Micorriza é a regra e não a exceção**” (SIQUEIRA et al., 1988).

A verificação da ocorrência de micorrizas pode ser feita através da observação macroscópica das raízes absorventes, no caso das ectomicorrizas, ou observações microscópicas de segmentos ou secções de raízes clarificadas e coloridas com corantes especiais (Figura 1). Com base na anatomia das raízes colonizadas as micorrizas são tradicionalmente classificadas em:

3.2.1 - Ectomicorrizas: caracterizam-se pela penetração intercelular do micélio fúngico, formação da rede de Hartig no interior do córtex e de manto fúngico que se desenvolve em torno das raízes colonizadas. O ecossistema onde estas predominam são as florestas de coníferas temperadas nativas, tropicais plantadas e de eucaliptos (SIQUEIRA et al., 1988).

3.2.2 - Ectendomicorrizas: são geralmente ectomicorrizas com penetração inter e intracelular além da formação de manto fúngico havendo diferenças anatômicas em função da planta hospedeira. Abrange espécies de vários gêneros como *Pinus*, *Arbutos*, e *Monotropa*, porém sem maior interesse comercial evidente (SIQUEIRA et al., 1988).

3.2.3 - Endomicorrizas: caracterizam-se pela penetração inter e intracelular, ausência de manto e de modificações morfológicas nas raízes. São de ocorrência generalizada e se subdividem em Ericóides, Orquidóides e Arbusculares. Os dois primeiros sub-grupos são de menor ocorrência e abrangem representantes da ordem Ericales (*Rhododendron*, *Vaccinum*), sendo que as Orquidóides ocorrem entre plantas da família

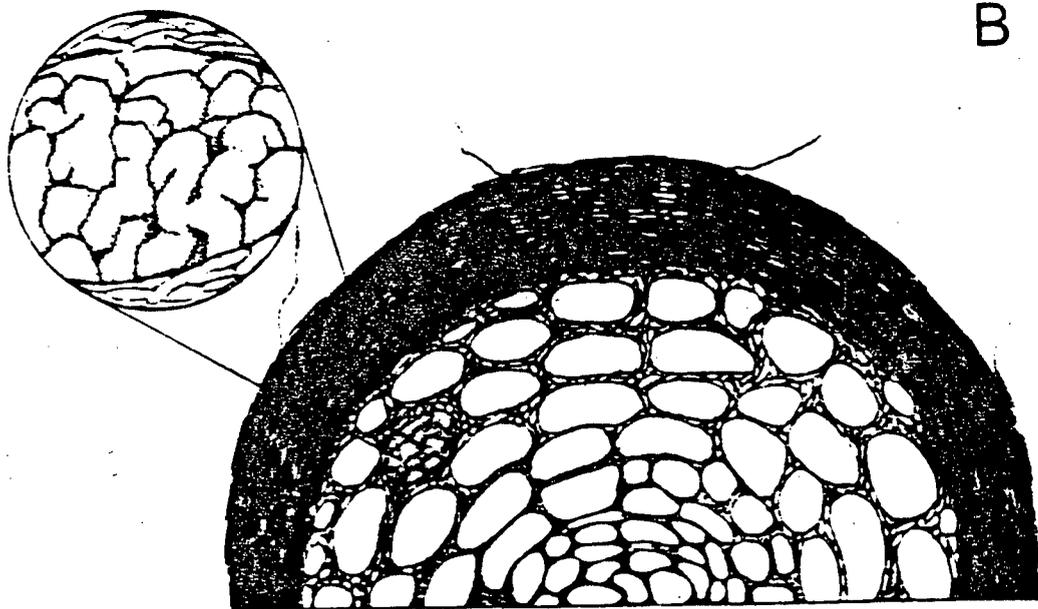
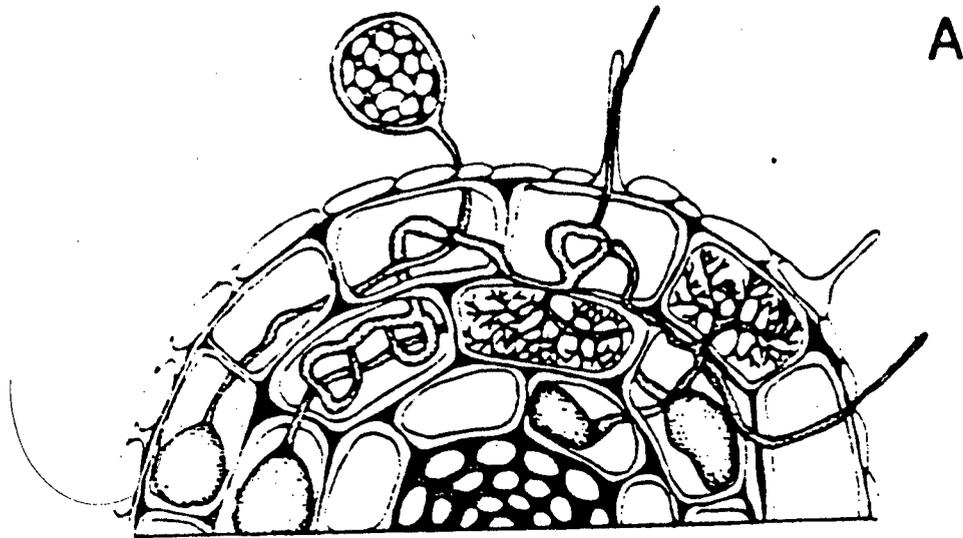


Figura 1: Micorriza vesicular-arbuscular (A); ectomicorriza (B); ectendomycorriza (C).

Orquidaceae e fungos da espécie *Rhizoctonia solani*. As micorrizas arbusculares são de ocorrência generalizada, envolvendo a maioria das Angiospermas e algumas Gimnospermas (SIQUEIRA et al., 1988).

Do ponto de vista ecológico e sob considerações práticas, as ectomicorrizas e endomicorrizas arbusculares são as mais importantes. As ectomicorrizas abrangem em torno de 5.000 espécies de fungos, que colonizam mais de 2.000 espécies de plantas, principalmente Gimnospermas e algumas Angiospermas. As endomicorrizas por sua vez, envolvem em torno de 140 espécies de fungos, que colonizam 97% das plantas vasculares. Estas predominam em ambientes tropicais de solos ácidos, além de agroecossistemas e ecossistemas naturais não dominados por coníferas.

3.3 Produção de Inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Um dos pontos importantes para se obter sucesso com a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) é a utilização de um inoculante que apresente boa infectividade e eficiência simbiótica para a cultura e as condições ambientais onde se pretende praticar a inoculação.

Por serem simbiontes obrigatórios, os FMA ainda não foram cultivados *in vitro* apesar das inúmeras tentativas em culturas axênicas. O cultivo de FMA é feito *in vivo*, isto é, os fungos se multiplicam em plantas vivas, chamadas de plantas multiplicadoras, crescendo sob condições controladas de temperatura e umidade (CARDOSO et al., 1992).

Para a produção de inóculo cultivam-se plantas hospedeiras em vasos contendo substrato esterilizado, inoculando-se junto à raiz esporos e/ou raízes colonizadas com o FMA a ser multiplicado. No final do ciclo das plantas, um grande número de esporos pode

ser obtido, após terem sido formados no substrato, a partir das hifas externas da micorriza (CARDOSO et al., 1992).

Na escolha da planta multiplicadora algumas características devem ser observadas. Entre estas características está o rápido crescimento, uma abundante produção de raízes e além disso não possuir patógenos comuns à cultura na qual o inóculo será utilizado (CARDOSO et al., 1992). Nestes aspectos, o *Paspalum notatum* var. *saurea* é uma espécie que possui rápido crescimento, rústica e que produz grande quantidade de raízes, importante para a multiplicação do FMA.

O tipo de substrato para a produção de inóculo é um dos fatores limitantes do processo e deve ser escolhido com muito critério. Solos arenosos com baixa fertilidade natural, vermiculita, perlita e casca-de-árvores podem ser utilizados, atentando-se para os possíveis problemas de toxidez. (CARDOSO et al., 1992).

A esterilização do substrato também é um fator importante a fim de se obter apenas propágulos do fungo desejado. A esterilização pode ser feita em autoclave (1 ATM, 121° C), onde o tempo de esterilização deve variar em função da constituição e da quantidade do material a ser esterilizado. Entre outros métodos, existe esterilização por radiação gama (0,8 a 1,0 Mrad) ou por fumigação com biocidas como Dazomet. Os nutrientes necessários podem ser supridos por adubação, ou através de soluções nutritivas com baixas concentrações de P e micronutrientes (CARDOSO et al., 1992).

O fósforo é o nutriente mais limitante para a produção do inóculo de FMA. Altas concentrações de P podem inibir o processo de colonização, da mesma forma que concentrações muito baixas podem fazer com que o fungo estabeleça uma relação parasítica com a planta. Outros fatores como pH do substrato, aeração, luminosidade, tamanho do

vaso, temperatura, poda e aplicação de pesticidas também devem ser considerados, já que podem interferir, direta ou indiretamente, nos processos de colonização e esporulação do fungo (CARDOSO et al., 1992). Esses constituem-se em fatores de fundamental importância para a obtenção de um inóculo de boa qualidade, capaz de estabelecer bons índices de infecção e bons resultados em termos de benefício para as plantas.

3.4 - Importância da Inoculação dos Fungos Micorrízicos Arbusculares em Plantas Micropropagadas

A micropropagação tornou-se uma técnica intensamente utilizada em linhas de pesquisa e produção comercial de plantas. Entre as vantagens da utilização desta técnica está a possibilidade de produção de um elevado número de plantas uniformes e com capacidade de iniciar a produção em um tempo relativamente curto. O cultivo de meristemas *in vitro* possibilita a obtenção de plantas de alta qualidade, livres de doenças como viroses e outros patógenos que são responsáveis por uma queda significativa na produtividade das culturas. Entretanto, o cultivo *in vitro*, além de tornar as plantas extremamente dependentes de condições artificiais, elimina os microorganismos benéficos associados a elas, e entre os organismos benéficos eliminados estão os fungos micorrízicos. Além disso, na fase de aclimatização os explantes são submetidos a severos estresses ambientais, por apresentarem poucas raízes e baixo crescimento e desenvolvimento cuticular da parte aérea. Embora algumas espécies de plantas apresentem boa capacidade de suportar estresses nesta fase, outras espécies em especial as lenhosas, apresentam maiores dificuldades principalmente em relação ao enraizamento. Nestas espécies, a fase de aclimatização é acompanhada por altos

índices de perdas, exigindo o uso intensivo de fertilizantes, o que aumenta o custo de produção destas plantas.

A micorrização tem sido uma solução biológica apontada por vários pesquisadores, demonstrando que a reintrodução dos fungos micorrízicos arbusculares (FMA) pode resultar em incremento no crescimento de um grande número de espécies de plantas micropropagadas (CHAVES & FERREIRA-CERRATO, 1990), e além disso podem melhorar significativamente o estabelecimento e crescimento de espécies de difícil enraizamento como o abacateiro (AZCÓN-AGUILAR et al., 1992). Esses fungos simbióticos normalmente colonizam raízes da maioria das espécies de plantas, incluindo a vasta maioria das plantas atualmente micropropagadas. Resultados positivos com a inoculação de fungos micorrízicos vem sendo obtidos com numerosas espécies de plantas micropropagadas como café, dendê, kiwi, videira, abacaxi, além da própria macieira (Tabela 1).

Tabela 1: Algumas espécies de plantas micropropagadas inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares (FMA):

Planta	Referência
Pereira	GIANINAZZI et al., 1985
Videira	RAVOLANIRINA et al., 1989a, 1989b
Dendezeiro	RAVOLANIRINA et al., 1989b
Roseira	GIANINAZZI et al., 1990
Abacaxizeiro	GUILLEMIN et al., 1991
Macieira	BRANZANTI et al., 1992
Plátano	TISSERANT e GIANINAZZI-PEARSON, 1992
<i>Rhododendron</i>	LEMOINE et al., 1992
<i>Citrus</i>	BLAL et al., 1992, não publicado
Bananeira	GUILLEMIN, não publicado
Aspargo	DELAITRE e GIANINAZZI, não publicado
Cerejeira	LOVATO et al., 1994
Fraxinus	LOVATO et al., 1994

Fonte: LOVATO et al. (1995).

Entre os benefícios que as micorrizas trazem a produção de plantas micropropagada destacam-se:

- Encurtamento das fases *in vitro* e de aclimatização (VESTBERG, 1992; AZCÓN-AGUILAR et al., 1992);
- Supressão do bloqueio do crescimento apical após o transplante (BERTA et al., 1994);
- Maior vigor das plantas com menor quantidade de fertilizantes (WILLIAMS et al., 1992);
- Maior homogeneidade das plantas (BLAL & GIANINAZZI-PEARSON, 1989);
- Maior resistência a estresses causados pelo ataque de patógenos (GUILLEMIN et al., 1994).
- Maior tolerância da plantas a estresses abióticos (SIQUIRA et al., 1988);

O efeito das micorrizas sobre os estresses bióticos e abióticos é de grande importância, pois estes se constituem em fatores limitantes na maioria das áreas brasileiras utilizadas para cultivo assim como as áreas de cultivo da macieira em Santa Catarina, onde predominam os solos ácidos, com altos níveis de alumínio e baixos teores de fósforo disponível.

3.5 - Procedimentos para a Inoculação de FMA em Explantes

Um bom estabelecimento da infecção micorrízica é um dos pré-requisitos para obter o máximo benefício proporcionado pelas micorrizas. Segundo LOVATO et al. (1995), os fatores de maior importância que devem ser considerados para a produção de plantas micropropagadas micorrizadas são: época e metodologia de inoculação, tipo do substrato de aclimatização e do inóculo de fungo micorrízico arbuscular.

3.5.1- Época da Inoculação

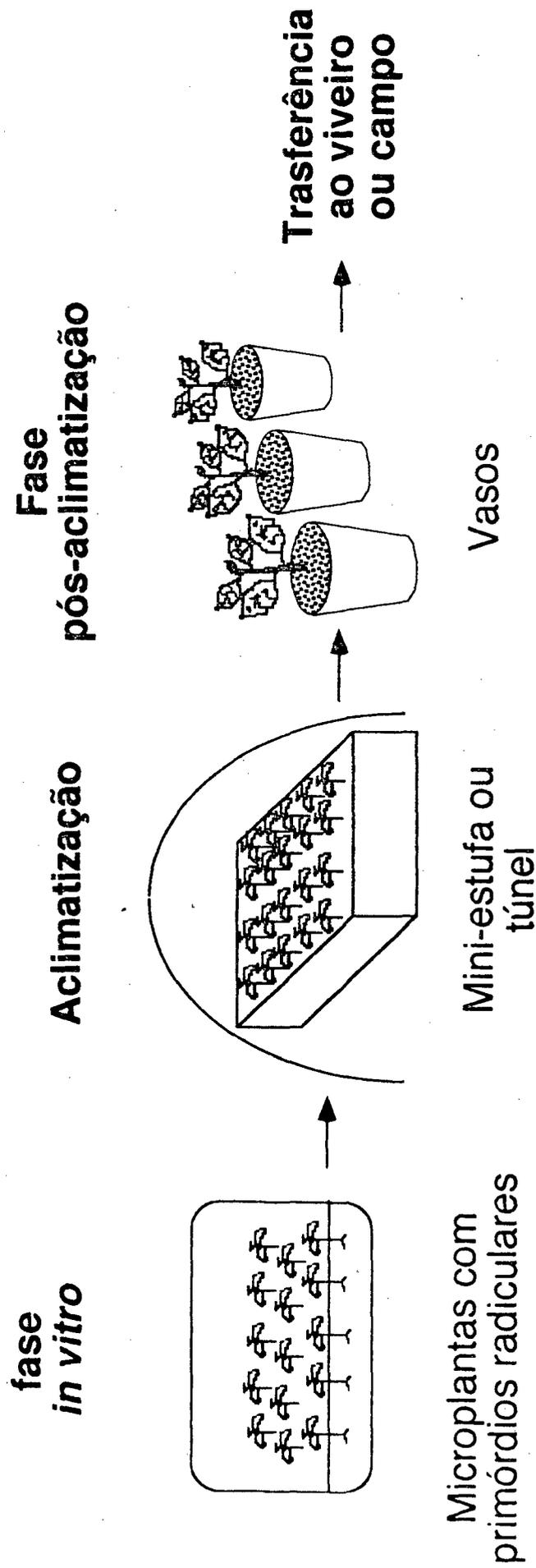
Durante a produção de plantas micropropagadas podem ser identificadas três fases para a introdução de fungos micorrízicos: durante a propagação *in vitro*, durante a aclimatização e após a fase de aclimatização (Figura 2). Plantas micropropagadas podem ser inoculadas durante a fase *in vitro*, mas isso requer um prolongamento desta fase, o que implica em significativa elevação do custo econômico. Além disso, RAVOLANIRINA et al. (1989) e BRANZANTI et al., (1992) mostraram que os melhores resultados em termos de crescimento das plantas são obtidos com a inoculação no início da fase de aclimatização, quando os explantes apresentam apenas primórdios radiculares.

3.5.2 - Composição do Substrato

A composição do substrato é também de grande importância para se obter um efeito compensador da micorriza. Comparando três tipos de substrato em abacateiro micropropagado micorrizado, AZCÓN-AGUILAR et al. (1992) concluíram que um substrato contendo 50 % de solo esterilizado apresentou os melhores resultados. Entretanto, a composição do mesmo varia em função da espécie a ser produzida e do fungo a ser inoculado. Em plantas frutíferas, BRANZANTI et al. (1991) mostrou que misturas contendo solo, turfa e vermiculita ou perlita fornecem os melhores resultados para o crescimento de plantas inoculadas. Com relação a utilização de fertilizantes no substrato, a adição de altos níveis de fósforo (comumente utilizados na etapa de aclimatização de plantas) reduz o efeito benéfico do fungo micorrízico sobre o crescimento das plantas (BRANZANTI et al., 1992), sendo um fator importante a ser considerado no processo de micorrização de plantas.

Figura 2

Esquema de produção de planta micropropagadas e micorrizadas



3.5.3 - Tipo do Inoculante

Os benefícios obtidos pela micorrização dependem, entre outros fatores, da combinação fungo-planta utilizada. A escolha do inoculante deve ser feita de acordo com o objetivo estabelecido, pois os isolados de fungos são diferentes em termos de capacidade de promover o crescimento das diversas espécies ou variedades de plantas (AZCÓN-AGUILAR et al., 1992). A solução indicada é a utilização de uma mistura de isolados. Entretanto, isto nem sempre resulta em benefícios, pois um isolado de baixa eficiência pode ser mais competitivo no sentido de colonizar as raízes do hospedeiro (LOVATO et al., 1995).

Neste aspecto, muitos estudos ainda se fazem necessários para conhecer quais são as espécies ou isolados de fungos micorrízico arbusculares que melhor contribuem para o crescimento de espécies de plantas micropropagadas como a macieira; que condições ambientais favorecem o desenvolvimento de ambos os organismos (planta e fungo micorrízico) no sentido de melhorar o crescimento das plantas; qual a época adequada para a inoculação destes fungos. Tais aspectos são importantes no sentido de desenvolver uma metodologia de aclimatização de mudas de plantas micropropagadas de macieira e inoculação de fungos micorrízicos. A união destas duas biotecnologias, a micropropagação e a micorrização, torna-se uma perspectiva interessante no sentido de se obter mudas de alta qualidade a preços competitivos.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Produção de Inóculo de Fungos Micorrízicos Arbusculares

A multiplicação de três espécies de fungos micorrízicos arbusculares (*Glomus etunicatum*, originário do NPI, EUA; *G. mosseae*, e *G. caledonium* provenientes da Estação Experimental de Rothamsted/Inglaterra) foi feita testando dois substratos esterilizados: substrato 1 (mistura de solo Terra Roxa Estruturada + areia - 1 : 3 v/v) e substrato 2 (mistura de solo Podzólico Vermelho-Amarelo + areia - 1 : 2 v/v). Os solos foram peneirados em peneira de 4mm, e a areia foi lavada para a eliminação de possíveis elementos tóxicos e posteriormente peneirada eliminando as porções maiores que 2 mm e menores que 0,3 mm de diâmetro (Protocolo 2). Vasos previamente desinfectados com álcool foram preparados colocando um disco de papel filtro no fundo, uma camada de pedrisco (1 - 2 mm) e posteriormente 2,5 l de substrato. A inoculação foi feita colocando aproximadamente 40 ml/vaso de solo inóculo em orifícios feitos no substrato (4 cm de profundidade por 1 cm de diâmetro). Esses orifícios foram cobertos com uma camada de substrato e em seguida, feita a semeadura de aproximadamente 60 sementes de *Paspalum notatum* var. *saurea* previamente desinfectadas em hipoclorito de sódio (Protocolo 2). Em cada vaso foi adicionada uma camada (0,5 - 1,0 cm) de pedrisco. Cada uma das três espécies de fungos micorrízicos foi inoculada separadamente em um vaso com três repetições para cada substrato. Como controles foram preparados vasos (500 ml) com os materiais puros e misturas não autoclavadas não inoculadas, da mesma forma como foram preparados os vasos para os tratamentos. Diariamente foi verificada a necessidade de água, sendo a rega feita com água destilada. Após 4 meses da implantação do experimento foi coletada uma

amostra de plantas (2-3 plantas/vaso) contendo o sistema radicular e também uma amostra de solo próximo às raízes para avaliação do número de esporos, utilizando a técnica de peneiragem e centrifugação (Brundrett et al., 1994). As raízes foram coloridas com azul de tripano (PHILLIPS e HAYMAN, 1970, modificada por KOSKE & GEMMA, 1989) e posteriormente cortadas em fragmentos de aproximadamente 1 cm de comprimento, montadas em lâminas (30 fragmentos/vaso) e levadas ao microscópio para avaliação da frequência da intensidade de infecção das raízes através da fórmula: $M\% = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1)/N$, onde n_5, n_4, \dots, n_1 são o número de fragmentos que apresentam 90, 70, 30, 5, e 0 % de córtex radicular micorrizado), segundo a técnica descrita por TROUVELOT et al., (1986).

4.2 - Aclimatização e Micorrização de Plantas de Macieira

Micropropagadas

Mudas de porta-enxertos de macieira M9 e Marubakaido foram obtidas por técnica de cultura de meristemas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) do Departamento de Fitotecnia - CCA/UFSC. Os explantes foram repicados para meio de multiplicação e posteriormente para meio de indução do enraizamento. Após 27 e 34 dias (M9 e Marubakaido respectivamente) em meio de enraizamento *in vitro*, plantas com iniciação radicular foram submetidas ao processo de aclimatização e inoculação de fungos micorrízicos. O substrato utilizado na aclimatização foi uma mistura, esterilizada em autoclave, de solo (Terra Roxa Estruturada), casca de arroz carbonizada e areia na proporção 4:2:3 (v/v/v), respectivamente. As plantas foram repicadas para bandejas de isopor contendo 56 células com capacidade para aproximadamente 35 cm³/célula. Os

tratamentos consistiram dos dois porta-enxertos M9 e Marubakaido (MK), não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC), em substrato não corrigido (pH 4,8) ou substrato corrigido com calcário (pH 5,8), com quatro repetições de cada tratamentos. A inoculação foi feita misturando-se 3,7g de inóculo de *Glomus etunicatum* (solo contendo esporos e raízes colonizadas) a cada célula com substrato. Após a repicagem das plantas foi feita a recomposição da microbiota do solo através da adição de uma suspensão do próprio inoculante filtrada com papel (0,5 ml/célula). As bandejas de isopor foram acondicionadas no interior de bandejas de plástico (capacidade para 12 l) e em seguida foi adicionada uma lâmina de aproximadamente 0,5 cm de água destilada no fundo das bandejas de plástico. Estas foram cobertas com filme de plástico transparente para manter alta umidade relativa e impedir a dessecação das plantas. As caixas foram mantidas em condições de viveiro sob sombrite (90%) por um período de 7 dias e posteriormente transferidas para casa de vegetação, sob sombrite (50%). Ao sétimo dia foi iniciada a retirada gradativa do filme de plástico sobre as bandejas. Diariamente foi verificada a necessidade de água, sendo a rega feita com água destilada. No 25º dia foi aplicado 1 ml da solução nutritiva indicada por BRUNDRETT et al. (1994), e no 37º dia foi aplicado 2 ml da solução LONG ASHTON ¼ de força, sem fósforo. Duas, quatro e seis semanas após a repicagem, foi avaliada a altura de plantas, sendo posteriormente retiradas amostras de 4 plantas por tratamento e avaliados os seguintes parâmetros: comprimento de radículas e taxa de infecção radicular (GIOVANETTI e MOSSE, 1980). Para descoloração de raízes e coloração do micélio interno foi utilizada a técnica de PHILLIPS e HAYMAN (1970), modificada por KOSKE e GEMMA (1989).

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Produção de Inóculo

Os substratos testados para a produção de inóculo dos fungos micorrízicos arbusculares *Glomus etunicatum*, *G. mosseae* e *G. caledonium* diferem em relação à algumas características como teor de alumínio e nutrientes (Tabela 2).

Tabela 2: Análise química dos substratos produzidos a partir de solo Terra Roxa Estruturada (TR) e areia (1 : 3 v/v) e solo Podzólico Vermelho-Amarelo (PV) e areia (1 : 2 v/v) utilizados para produção de inóculo:

AMOSTRA	pH H ₂ O	SMP	M.O (%)	P (ppm)	K (ppm)	Al -----	Ca meq/	Mg 100g	Ca + Mg -----
SUBSTRATO 1 (1 TR + 3 areia)	5,5	6,0	1,8	5,5	34	0,20	2,4	1,6	3,9
SUBSTRATO 2 (1PV + 2 areia)	5,2	6,0	1,6	10	26	1,6	0,6	0,6	1,1

Observa-se que o substrato 1 apresenta pH e teores de nutrientes como K, Ca e Mg e menores teores de Al e P em relação ao substrato 2. Esses fatores podem afetar o estabelecimento e a multiplicação do fungo micorrízico arbuscular, pois isolados de fungos vão se comportar diferentemente em função do tipo de substrato utilizado.

Os isolados de fungos utilizados (*G. etunicatum*, *G. mosseae* e *G. caledonium*) colonizaram as raízes de *Paspalum notatum* var. *saurea* produzindo índices de colonização radicular (M%) que variaram de 1 à 15% (Figura 3).

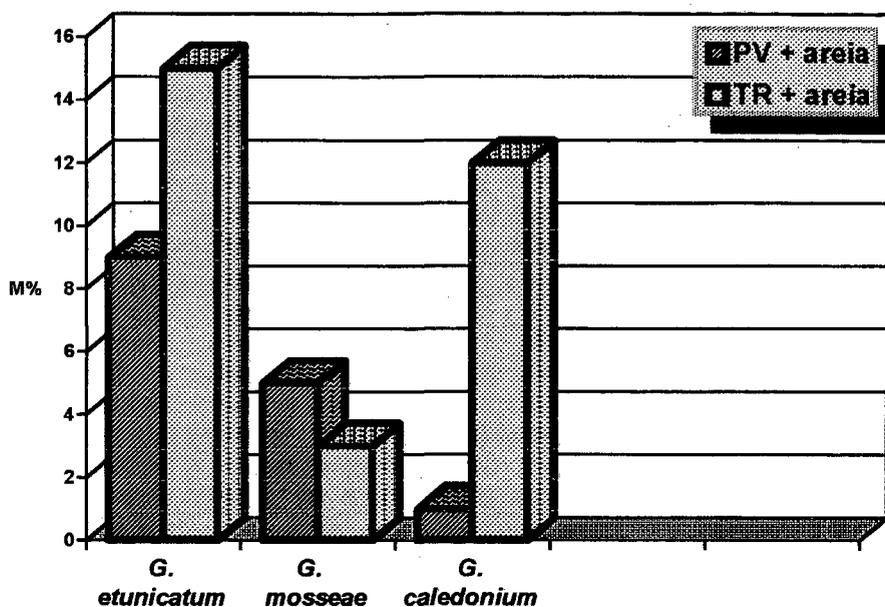


Figura 3: Percentagem de córtex radicular micorrizado (M%) em plantas de *Paspalum notatum* var. *saurea* cultivado em dois tipos de substrato (TR + areia, 1 : 3 v/v e PV + areia, 1 : 2 v/v) por três espécies de fungos micorrizicos arbusculares (*G. etunicatum*, *G. mosseae* e *G. caledonium*).

Para as espécies *G. etunicatum* e *G. caledonium* as maiores percentagens de colonização foram observadas no substrato 1 (TR e areia, 1 : 3) com valores de infecção de 15 e 12 %, respectivamente, sendo que no substrato 2 (PV : areia, 1 : 2) as percentagens de córtex colonizado foram de 9 e 1 %, respectivamente. Para a espécie *G. mosseae* os índices de infecção observados foram 3 e 5 % nos substratos 1 e 2, respectivamente.

Com relação à contagem do número de esporos o *G. etunicatum* foi o que apresentou maior número de esporos (2.970 esporos/100g de solo), sendo este número observado no substrato 1. O maior número de esporos de *G. mosseae* (1.188 esporos/100g de solo) foi observado no substrato 2, enquanto o *G. caledonium* apresentou quantidades

semelhantes de esporos nos dois substratos com 93 e 112 esporos/100g de solo nos substratos 1 e 2, respectivamente (Figura 4).

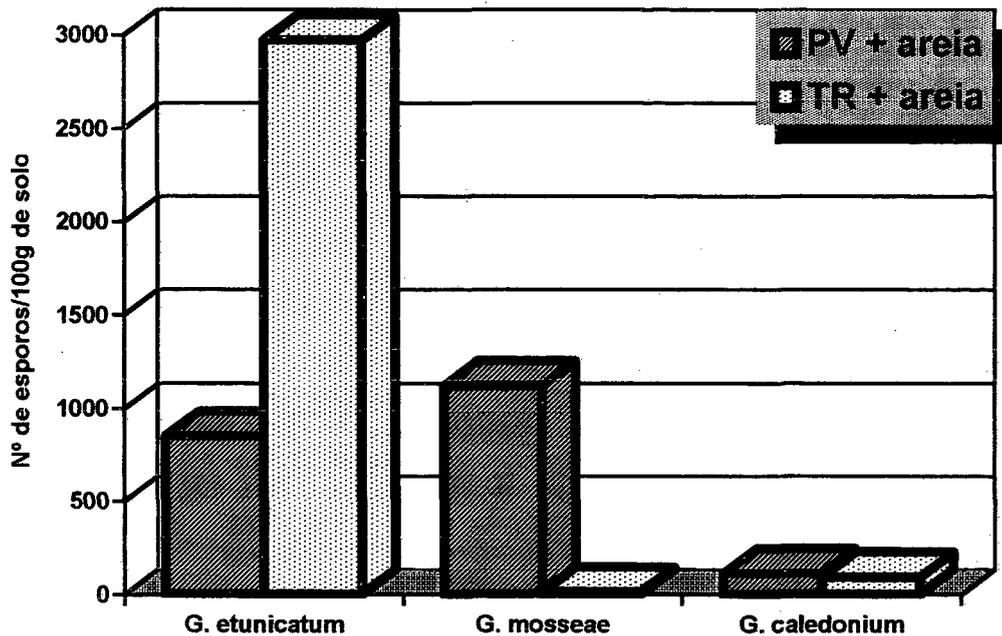


Figura 4: Número de esporos produzidos por três espécies de *Glomus* (*G. etunicatum*, *G. mosseae* e *G. caledonium*), inoculadas em *Paspalum notatum* var. *saureae* cultivado em dois tipos de substratos elaborados a partir de solo TR + areia (1 : 3 v/v) e solo PV + areia (1 : 2).

O substrato 1, elaborado a partir da mistura de solo TR + areia (1 : 3 v/v) foi mais eficiente para a multiplicação do fungo *G. etunicatum*.

Observa-se que o substrato 2 apresenta menor pH e maiores teores de Al, o que provavelmente atuou restringindo o crescimento radicular e, conseqüentemente também da parte aérea do *Paspalum notatum* var. *saureae*. Esta mesma espécie cultivada no substrato 1 apresentou melhor desenvolvimento, provavelmente devido aos maiores teores de nutrientes

como K, Ca e Mg e menores teores de Al, o que favoreceu o desenvolvimento do sistema radicular. Tais fatores, associados aos menores teores de P disponível, favoreceram um melhor desenvolvimento do fungo *G. etunicatum*. A disponibilidade de P no solo, assim como os teores de Al tem grande influência sobre o desenvolvimento dos FMA (CARDOSO et al., 1992; SIQUEIRA et al., 1988). Estes mesmos autores indicam que a taxa de colonização radicular e o efeito micotrófico são maiores em solos com menor disponibilidade de P, diminuindo com o aumento do P disponível. Com relação ao pH, geralmente existe um efeito positivo na elevação sobre o estabelecimento dos FMA, assim como para o estabelecimento radicular das plantas. Entretanto, estes valores variam para a espécie e isolado de FMA e planta hospedeira, havendo espécies ou mesmo isolados de fungos que têm maior tolerância à solos de baixo pH. Para a espécie *G. mosseae* o substrato 2 (solo PV e areia, 1 : 2 v/v) mostrou-se mais eficiente, sendo que o isolado de *G. caledonium* não mostrou uma preferência clara em relação a um dos substratos testados.

5.2 - Aclimatização e Micorrização de Plantas de Macieira Micropropagadas

5.2.1 - Sobrevivência de Plantas

A técnica de aclimatização utilizada, proporcionou um índice de sobrevivência de 98% para o porta-enxerto Marubakaido, enquanto que para o porta-enxerto M9 o índice de sobrevivência foi de apenas 66 %.

A fase de aclimatização é um dos períodos mais críticos na fase *post-vitro* pois é a fase onde as plantas passam de uma condição heterotrófica para uma condição autotrófica.

Nessa fase, ocorrem modificações em termos de substrato onde estão os nutrientes e de condições mesológicas (temperatura, luminosidade, umidade relativa do ar, etc.). Tais fatores influenciam a taxa de sobrevivência das plantas micropropagadas.

As condições que proporcionaram maior índice de sobrevivência para o porta-enxerto Marubakaido vão desde características intrínsecas do clone como maior vigor e rusticidade, até condições de melhor controle do processo de propagação *in vitro*. As mudas deste porta-enxerto submetidas ao processo de aclimatização e micorrização estavam em estágio inicial de enraizamento (2 a 3 radículas), indicado por autores como RAVOLANIRINA et al. (1989) e BRANZANTI et al. (1992), como o estágio mais adequado para a aclimatização e introdução do fungo micorrízico.

Para o porta-enxerto M9 as mudas utilizadas apresentavam variabilidade quanto ao tamanho de parte aérea e sistema radicular, sendo que muitas delas ainda não apresentavam iniciação radicular no momento da transferência para o substrato (ver fotos 1 e 2). Para o porta-enxerto M9, a combinação de características genéticas e de procedimentos de manipulação *in vitro* condicionaram uma baixa capacidade de enraizamento e de tolerância aos estresses a que são submetidos na fase de aclimatização. Torna-se necessário, portanto, aperfeiçoar os procedimentos de cultura *in vitro*, em especial na etapa de enraizamento, e melhorar o controle no processo de aclimatização para se obter maiores índices de sobrevivência na fase *post-vitro*.

5.2.2 - Avaliação do Crescimento de Parte Aérea

Houve incremento na altura de plantas dos porta-enxertos M9 e Marubakaido, no período de 0 a 6 semanas de aclimatização. Entretanto os resultados são mais evidentes para o porta-enxerto Marubakaido (Figura 5).

Na Figura 5 pode-se observar que os tratamentos que proporcionaram maior incremento após 6 semanas de aclimatização foram aqueles com inoculação do fungo micorrízico arbuscular (FMA), sendo que o que causou menor incremento no período de 6 semanas foi o tratamento NM/C sem, no entanto, haver diferença estatisticamente significativa³. Entretanto, pode-se observar que o tratamento NM/C apresentou incremento semelhante ao tratamento MIC/C até o período de 4 semanas, sendo que posteriormente houve uma queda no incremento. Isso provavelmente ocorreu devido ao fato de que a cada duas semanas uma amostra de 4 plantas de cada tratamento era retirada para a avaliação do crescimento e infecção radicular. Como o incremento no período inicial da fase de aclimatização é bastante lento, a retirada de uma ou mais plantas de maior vigor inicial causou a redução no incremento médio observado.

³ Teste F, ao nível de significância de 5 %.

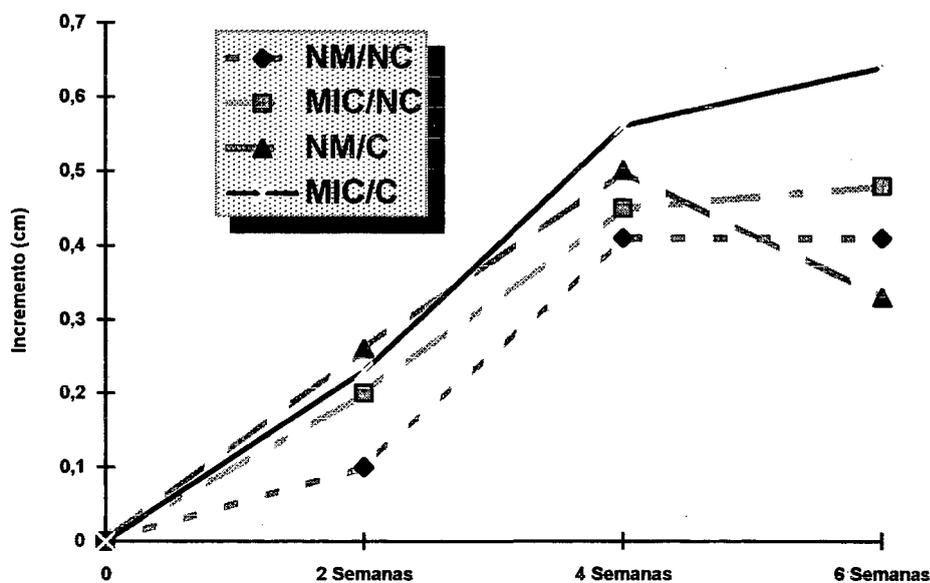


Figura 5: Incremento médio de altura de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagado não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC) em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).

Com relação ao porta-enxerto M9 observou-se um maior incremento de parte aérea a partir da quarta semana de aclimatização (Figura 6). Porém, no período inicial para os tratamentos inoculados (MIC/C e MIC/NC), observou-se que o incremento foi negativo, sendo este causado pelo forte estresse da saída da fase *in vitro* aliado a fase de estabelecimento da infecção micorrízica. Resultado semelhante foi obtido por BLAL et al. (1989) em plantas de dendê micropropagadas, nas quais houve um efeito negativo da micorriza sobre o crescimento no período inicial de aclimatização. Isso deve-se ao fato de o fungo micorrízico funcionar como um dreno de energia da planta na fase inicial de estabelecimento da infecção que é utilizada para formação do micélio fúngico, sem que tenha começado a melhorar a nutrição da planta. Passado esse período inicial do estabelecimento da simbiose, as plantas micorrizadas de dendê apresentaram melhor

crescimento de parte aérea, em função do aumento pela micorriza da eficiência do sistema radicular na exploração de nutrientes e água do solo.

Para o porta-enxerto M 9 observou-se, ao final da sexta semana de aclimatização, um incremento similar entre os tratamentos NM/C, MIC/NC e MIC/C para o parâmetro altura de plantas, sendo que para o tratamento NM/NC no período de 6 semanas não foi possível a obtenção dos dados devido a alta mortalidade de plantas desse porta-enxerto.

É interessante destacar que o crescimento nesta fase de aclimatização é lento devido aos severos estresses a que as plantas estão submetidas, sendo que os maiores índices de crescimento são observados em condições de viveiro.

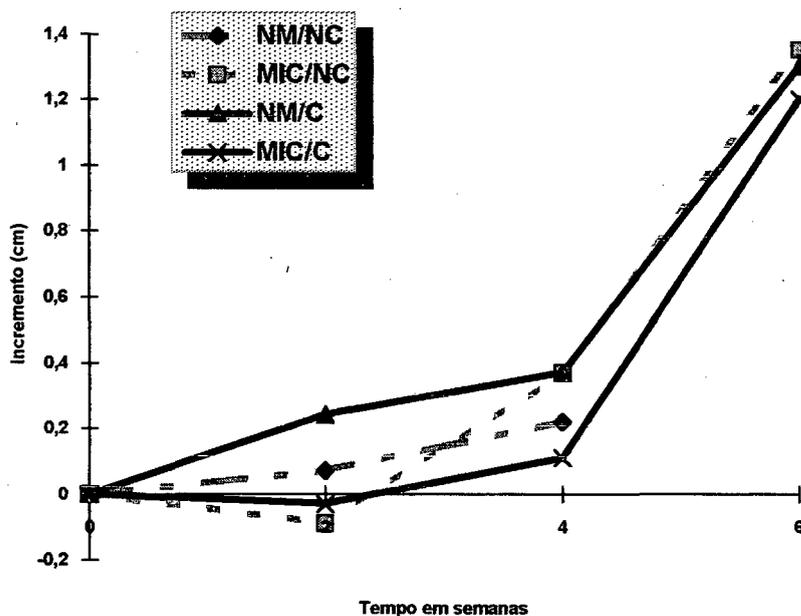


Figura 6: Incremento médio de altura de plantas do porta-enxerto M 9 micropropagado não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC) em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).

5.2.3 - Dinâmica de Crescimento Radicular

Com relação ao parâmetro comprimento de raízes, observou-se um grande desenvolvimento do sistema radicular no período de 6 semanas de aclimatização para o porta-enxerto Marubakaido (Figura 7).

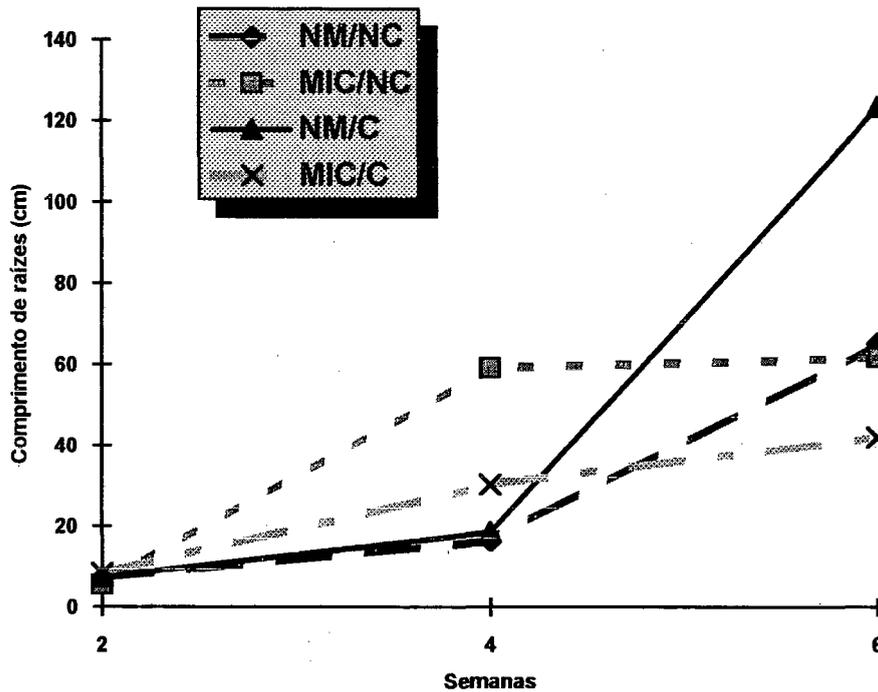


Figura 7: Comprimento de raízes de plantas do porta-enxerto Marubakaido micropropagado não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC) em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).

No período de 2 a 4 semanas, houve maior crescimento de raízes nos tratamentos micorrizados, sendo que após 6 semanas o tratamento MIC/C apresentou menor comprimento total de raízes. Os resultados indicam que a micorriza teve um efeito de

reduzir o comprimento de raízes, devido ao aumento da eficiência do sistema radicular na exploração de solo.

No que se refere à calagem os tratamentos micorrizados apresentaram comprimento total de raízes similar para o porta-enxerto Marubakaido (MIC/NC = 62cm; MIC/C = 42cm). Nos tratamentos não micorrizados o maior comprimento de raízes foi observado para o tratamento com calagem (125 cm), enquanto o tratamento sem calagem apresentou um comprimento total de raízes de 65 cm. Esse menor comprimento de raízes observado neste último tratamento é explicado pelo fato de que o pH do substrato não corrigido (pH 4.8), deve ter constituído num fator limitante para o crescimento das raízes. Com a calagem o pH do substrato foi elevado para 5.8, neutralizando os possíveis efeitos tóxicos do alumínio e/ou manganês, que podem ter efeito depressivo sobre o crescimento radicular. Para o porta-enxerto M9 o desenvolvimento de raízes foi similar até a quarta semana, sendo que na sexta semana o MIC/NC foi o tratamento que apresentou maior comprimento de raízes (Figura 8). Para o tratamento NM/NC não foi possível a obtenção dos dados devido a morte de plantas. Os dados relativos a este porta-enxerto não mostraram uma tendência clara devido a ampla variação existente entre as plantas.

Embora os resultados tenham sido mais claros para o porta-enxerto Marubakaido, os dados apresentaram um coeficiente de variação (CV)⁴ de 99%, indicando grande dispersão entre as médias dos tratamentos e, por isso, o teste F não detectou diferença significativa. Para reduzir o CV em novos experimentos deve-se aumentar o número de plantas/parcela e/ou o número de repetições a fim de se obter maior precisão experimental.

⁴ O coeficiente de variação é uma medida de variabilidade que mede percentualmente a relação entre o desvio padrão e a média aritmética.

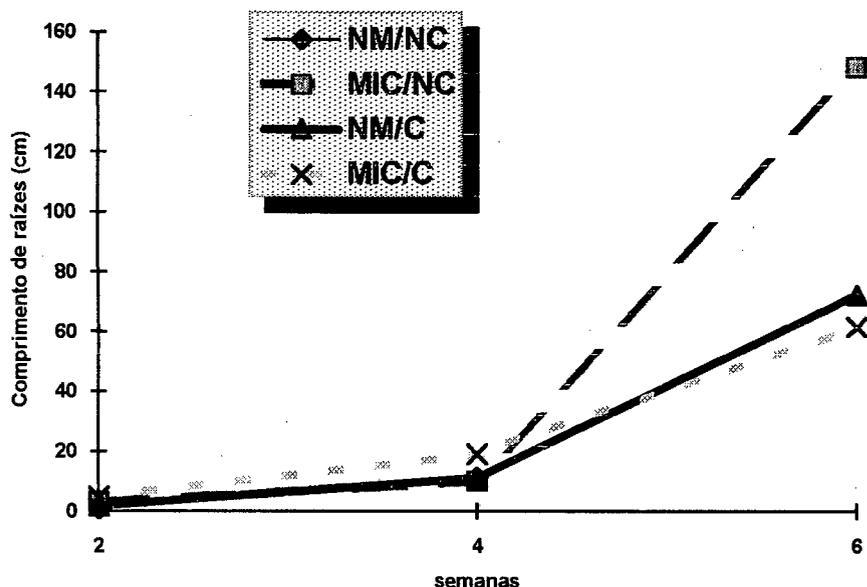


Figura 8: Comprimento de raízes de plantas do porta-enxerto M 9 micropropagado, não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC), em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).

Estudos realizados por autores como GUILLEMIN et al. (1991), trabalhando com abacaxizeiro micropropagado, mostram que em plantas micorrizadas a relação entre massa de raízes e da parte aérea diminui com a inoculação micorrízica. O efeito da micorriza sobre o desenvolvimento de raízes se deve basicamente a dois fatores: a melhoria da nutrição da planta devido ao aumento do volume de solo explorado pela ação do micélio fúngico e as modificações morfológicas no sistema radicular. Tal resultado tem sido verificado principalmente em espécies lenhosas como videira (SCHELLENBAUM et al., 1991) e *Prunus* (BERTA et al., 1994). Esses estudos mostraram que o fungo atua sobre atividade meristemática, modificando a topologia da raiz de uma forma de “espinha de peixe” para uma forma mais dicotômica, sendo que esta última possui maior capacidade de explorar e absorver os nutrientes do solo.

5.2.4 - Dinâmica de Infecção Radicular

A Figura 9 mostra a dinâmica de infecção radicular, onde nota-se um aumento na infecção partir da 4ª semana de aclimatização. Na primeira avaliação foi observado um início de infecção apenas em plantas de M9, cultivados no substrato não corrigido.

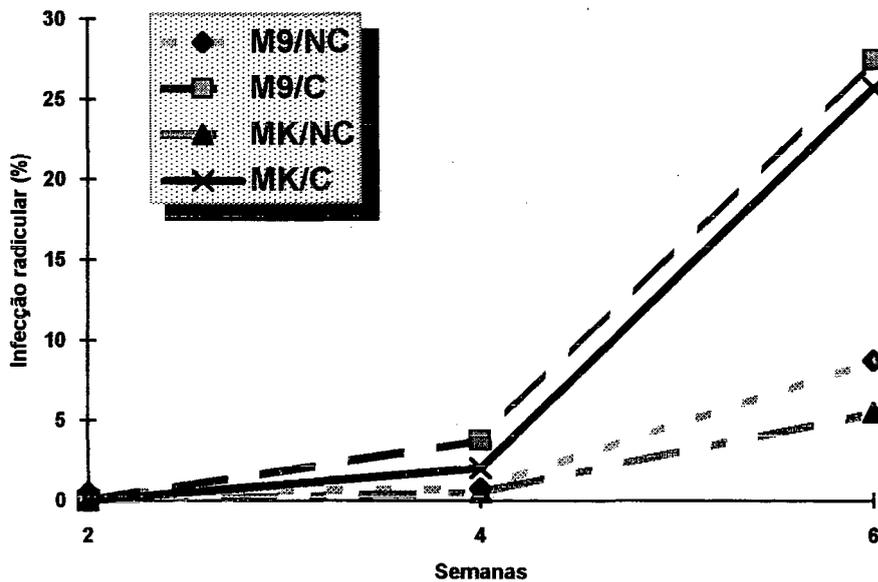


Figura 9: Infecção radicular em raízes de plantas do porta-enxerto M9 micropropagado não micorrizado (NM) e micorrizado (MIC) em substrato não corrigido (NC) e corrigido (C) em três períodos de aclimatização (média de 4 repetições).

Após 6 semanas de aclimatização foi observada maior infecção nos tratamentos em substrato corrigido, com cerca de 26 % do comprimento de raiz infectada pelo fungo em ambos os porta-enxertos.

Observou-se, um efeito benéfico da elevação do pH sobre o estabelecimento da infecção de raízes de macieira pelo isolado de *Glomus etunicatum* utilizado. O pH do solo

afeta a associação micorrízica devido aos seus efeitos sobre a permeabilidade das membranas do fungo e da planta, e devido aos efeitos indiretos sobre a disponibilidade dos nutrientes. Isto demonstra que o isolado utilizado não confirmou sua capacidade de estabelecer uma alta taxa de infecção em condições de baixo pH. É necessário verificar se isso se deve à presença de fatores associados ao baixo pH, como alumínio e manganês trocáveis.

Posteriormente é necessária a realização de novos experimentos testando diferentes isolados de fungos micorrízicos a fim de estabelecer quais fornecem os melhores resultados em termos de benefícios para as plantas em condições de baixo pH.

6 - CONCLUSÕES

6.1 - Produção de Inóculo

Para o isolado de *G. etunicatum* utilizado, o substrato mais eficiente para produção de inóculo foi a mistura de solo Terra Roxa Estruturada e areia (1 : 3 v/v), enquanto que para o isolado de *G. mosseae* o melhor substrato foi a mistura de solo Podzólico Vermelho-Amarelo e areia (1 : 2 v/v). O isolado de *G. caledonium* não mostrou preferência em relação a um dos substratos testados.

6.2 - Aclimatização e Micorrização de Plantas de Macieira Micropropagadas

1. Os maiores índices de sobrevivência de plantas foram obtidos para o porta-enxerto Marubakaido com 98%, sendo que para o M9 foi de 66%.

2. Houve incremento da altura de plantas nos porta-enxertos M9 e Marubakaido no período de aclimatização. Para o porta-enxerto Marubakaido, os maiores incrementos foram observados para os tratamentos inoculados com fungo micorrízicos, porém sem diferença estatisticamente significativa.

3. A micorrização provocou redução no comprimento de raízes para o porta-enxerto Marubakaido, sendo esta proporcionada pelo aumento da eficiência do sistema radicular na exploração dos nutrientes. Para o porta-enxerto M9 os resultados não mostraram uma tendência clara devido a ampla variação existente entre as plantas. Entretanto estes dados não apresentaram significância estatística devido ao alto coeficiente de variação existente.

4. A calagem teve um efeito positivo sobre o crescimento de raízes nas plantas não micorrizadas do porta-enxerto Marubakaido, pela elevação do pH, e pela melhoria do ambiente radicular.

5. Os porta-enxertos M9 e Marubakaido apresentaram comportamento similar em termos de infecção micorrízica, com cerca de 26 % de infecção no substrato corrigido.

6. A correção do solo pela calagem teve um efeito benéfico sobre o estabelecimento da infecção micorrízica, demonstrando que o isolado de *Glomus etunicatum* utilizado não foi capaz de estabelecer altos índices de infecção em pH baixo;

7 - AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ACLIMATIZAÇÃO UTILIZADA E RECOMENDAÇÕES PARA AÇÕES FUTURAS

Embora tenham-se obtido incremento na altura de plantas e infecção radicular com esta técnica de aclimatização e micorrização de plantas de macieira micropropagada, é necessário aperfeiçoá-la visando à produção de mudas. Uma série de medidas nesse sentido é apresentada a seguir.

7.1 - Unidade Amostral

A definição da unidade amostral a ser utilizada em um experimento é muito importante no sentido de se obter resultados com boa precisão experimental. Neste experimento o tamanho da amostra foi definido em 6 plantas/repetição com 4 repetições, sendo que para avaliação do comprimento de raiz e infecção radicular foi coletada uma planta/repetição em três épocas (2, 4 e 6 semanas), totalizando 96 plantas para cada porta-enxerto (M9 e Marubakaido). Entretanto, para o porta-enxerto M9 este número teve que ser reduzido para 3 plantas/repetição em função do número insuficiente de plantas disponíveis, provocado pela baixa taxa de enraizamento deste porta-enxerto. O coeficiente de variação calculado (99%), mostrou que mesmo para o porta-enxerto Marubakaido, o tamanho da amostra para determinação do comprimento de raiz e infecção radicular foi muito pequena. Para os próximos ensaios faz-se necessário portanto, considerar no processo de micropropagação, a percentagem de perdas (ocorridas em função de plantas que não enraizam ou que são eliminadas por outros fatores) para cada clone de porta-enxerto, assim

como aumentar o número de plantas/parcela e/ou o número de repetições a fim de se obter melhor precisão experimental.

7.2 - Bandejas

As bandejas de isopor utilizadas (capacidade de 35 cm³/célula), restringem a planta a um espaço muito pequeno, o que impede um perfeito desenvolvimento de sistema radicular e conseqüentemente também da parte aérea. A utilização de bandejas com células maiores (120 cm³) serão mais adequadas à macieira.

7.3 - Substrato

O substrato deve fornecer condições físicas (umidade e aeração) e químicas adequadas para o bom desenvolvimento radicular das plantas e também do fungo micorrízico. O fato de as bandejas de isopor serem colocadas dentro de bandejas de plástico com água no fundo promove o encharcamento do substrato, dificultando a aeração. Isto é prejudicial ao desenvolvimento tanto das raízes das plantas quanto o estabelecimento da infecção micorrízica, pois ambos necessitam de oxigênio para o seu desenvolvimento. Além disso, favorece-se o ataque dos esporos do fungo micorrízico por bactérias que foram inoculadas no momento da recomposição da microbiota do solo (Potocolo 1). Fatores como estes podem ser controlados ou minimizados com a utilização de câmara de nebulização ou simplesmente construindo uma pequena câmara (Figura 2), de forma que permita a drenagem e aeração do substrato.

Com relação á nutrição das plantas, é necessário conjugar a necessidade das plantas, porém com pequenas doses de fósforo na fase de aclimatização, de modo a não inibir o

estabelecimento da simbiose. Trabalhos desenvolvidos por Williams et al. (1992) com morangueiro inoculado com FMA, mostraram que plantas micorrizadas recebendo 25 % do mínimo recomendado para a produção comercial (fertilizante de lenta liberação) apresentaram rendimento similar às plantas não micorrizadas. A utilização controlada de adubos de lenta liberação (ex. Osmocote, rocha fosfatada) pode contribuir o bom desenvolvimento da simbiose.

No que se refere à constituição do substrato se faz-se necessário a realização de experimento, com a finalidade de estabelecer o melhor substrato para a aclimatização das plantas e desenvolvimento do fungo micorrízico. Essa etapa está prevista em nossas atividades futuras.

8 - BIBLIOGRAFIA CITADA

01. AZCÓN-AGUILAR, C.; BARCELÓ, A.; VIDAL, M. T. & DE LA VIÑA, G. Further studies on the influence of mycorrhizae on growth and development of micropropagated avocado plants. *Agronomie*, 12, 837-840, 1992.
02. BERTA, G.; TROTTA, A. A. F.; HOOKER, J.; MUNRO, M.; ATKINSON, D.; GIOVANETTI, M.; MARINI, S.; LORETI, F.; TISSERANT, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. The effects of arbuscular mycorrhizal infection on plant growth, root system morphology and soluble protein content in *Prunus cerasifera* L. *Tree physiology*, 1994, (in press).
03. BLAL, B. & GIANINAZZI-PEARSON, V. Interest of mycorrhiza for the production of micropropagated oil palm clones. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 29,39-43, 1989.
04. BRANZANTI, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & GIANINAZZI, S. Influence of phosphate fertilization on the growth and nutrient status of micropropagated apple infected with endomycorrhizal fungi during the weaning stage. *Agronomie* 12, 841-845, 1992.
05. BRANZANTI, B.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; GIANINAZZI, S.; PREDIERI, S.; BARALDI, R. Influence of artificial substrata on mycorrhization of micropropagated fruit-trees in a horticultural system. In: *Mycorrhizas in Ecosystems* (Alexander IJ, Fitter AH, Lewis DH, Read DJ, eds) CAB International, Oxon (UK), 333-339, 1991.
06. BRUNDRETT, M.; MELVILLE, L.; PETERSON, L. **Practical Methods in Mycorrhiza Research**. Guelph, Ontario, Canada, 1994, 80 p.
07. CARDOSO, E. J. B. N. (coord.) **Microbiologia**, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, 1992, 360 p.
08. CHAVEZ, M. C. G. & FERREIRA-CERRATO, R. Effect of vesicular-arbuscular mycorrhizae on tissue culture derived plantlets of strawberry. *Hort Science*, 25: 903-905. , 1990.
09. GIOVANETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. *The New Phytologist*, London, 84: 489-500, 1980.
10. GUILLEMIN, J. P.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. & MARCHAL, J. Contribution of endomycorrhizas to biological protection of micropropagated pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr) against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Agricultural Science in Finland*, 3: 241-251, 1994.
11. KOSKE, R. E. & GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycology Research*, 92(4): 486-505, 1989.
12. LOVATO, P. E.; SCHÜEPP, H.; TROUVELOT, A. & GIANINAZZI, S. Application of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in orchards and ornamental plants. In: Varma, A. e Hock. B. *Mycorrhizas: structure, function, molecular biology and technology*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pag. 443-467, 1995.
13. PHILLIPS, J. M. and HAYMAN, D. S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transaction of the British Mycological Society*, London, 55(1): 158-161, 1970.

14. RAVOLANIRINA, F.; BLAL, B.; GIANINAZZI, S. & GIANINAZZI-PEARSON V. Mise au point d'une méthode d'endomycorhization de vitroplants. *Fruits*, 44:165-170, 1989.
15. ROLAS RS/SC - **Recomendações de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**, 2º ed., SBSC - Núcleo Regional Sul/EMBRAPA - CNPT, Passo Fundo, 1989, 128 p.
16. SCHELLENBAUM, L.; BERTA, G.; RAVOLANIRINA, F. ; TISSERANT, B.; GIANINAZZI, S. & FITTER, A. H. Influence of endomycorrhizal infection on root morphology in a micropropagated woody plant species (*Vitis vinifera* L.). *Annales of Botany* 68: 135-141, 1991.
17. SIQUEIRA, O. S.; FRANCO, A. A. **Biotechnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas**. Brasília: Ministério da Educação, ABEAS; Lavras: ESAL, FAEPE, 1988, 236 p.
18. TROUVELOT, A.; KOUGH, J. L. et V. GIANINAZZI-PEARSON. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: **Mycorrhizes: physiologie et génétique**. 1st ESM/ 1^{er} SEM, Dijon, 1-5 July 1985 - INRA, PARIS, 1986, p. 217-220.
19. UOSUKAINEN, M. & VESTBERG, M. Effect of inoculation with arbuscular mycorrhizas on rooting, weaing, and subsequent growth of micropropagated *Malus* (L.) Moench. *Agricultural Science in Finland*, 3: 269-279, 1994.
20. WILLIAMS, S. C. K.; VESTBERG, M.; UOSUKAINEN, M.; DOSS, J. C. & JEFFRIES, P. Effects of fertilizer and arbuscular mycorrhizal fungi on the *post-vitro* growth of micropropagated strawberry. *Agronomie* 12, 851- 857, 1992.

ANEXO 1: FOTOS

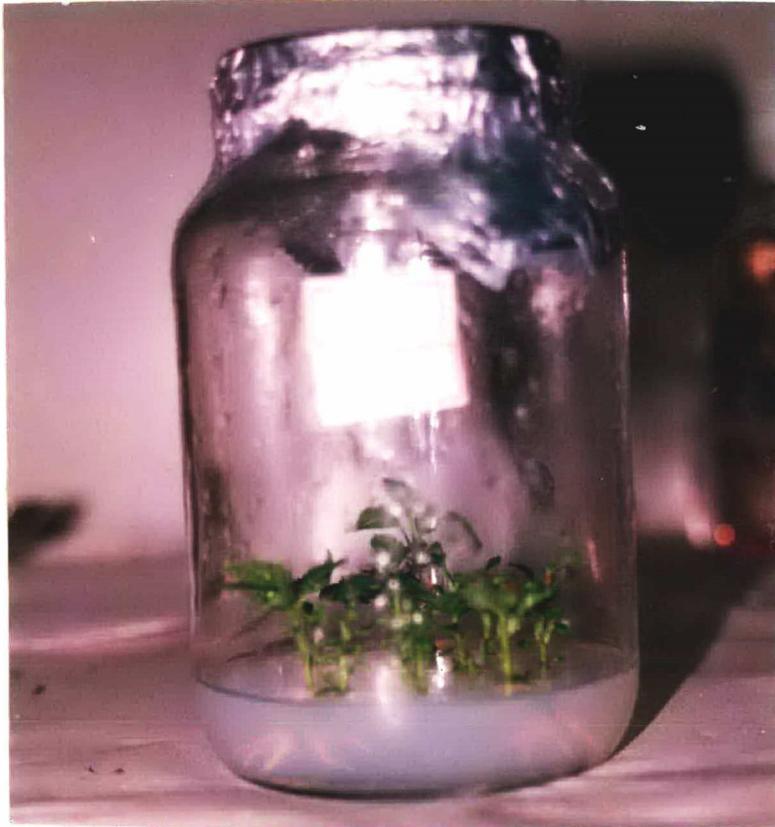


FIGURA 1: Mudanças do porta-enxerto de macieira M9 micropropagadas pelo Lab. de Cult. de Tecidos Vegetais - CCA/UFSC (fase *in vitro*).



FIGURA 2: Mudanças do porta-enxerto de macieira M9 micropropagadas, mostrando o início da formação do sistema radicular (fase *in vitro*).



FIGURA 3: Mudas de porta-enxertos de macieira micropropagadas micorrizadas repicadas para bandejas de isopor (etapa de aclimatização).



FIGURA 4: Túnel com sombrite (90%) onde às plantas de macieira foram colocadas no início do processo de aclimatização.

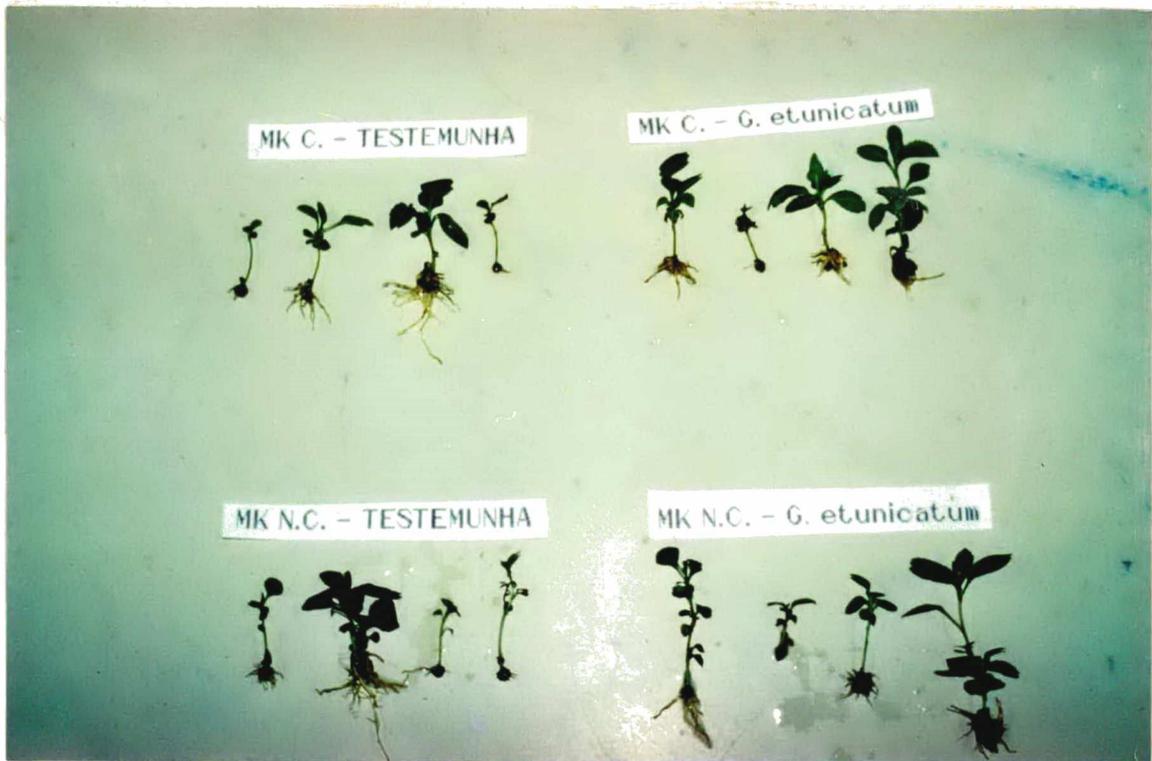


FIGURA 5: Plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (MK) micropropagadas, inoculadas e não inoculadas em substrato não calado (NC) e calado (C), após duas semanas de aclimatização.

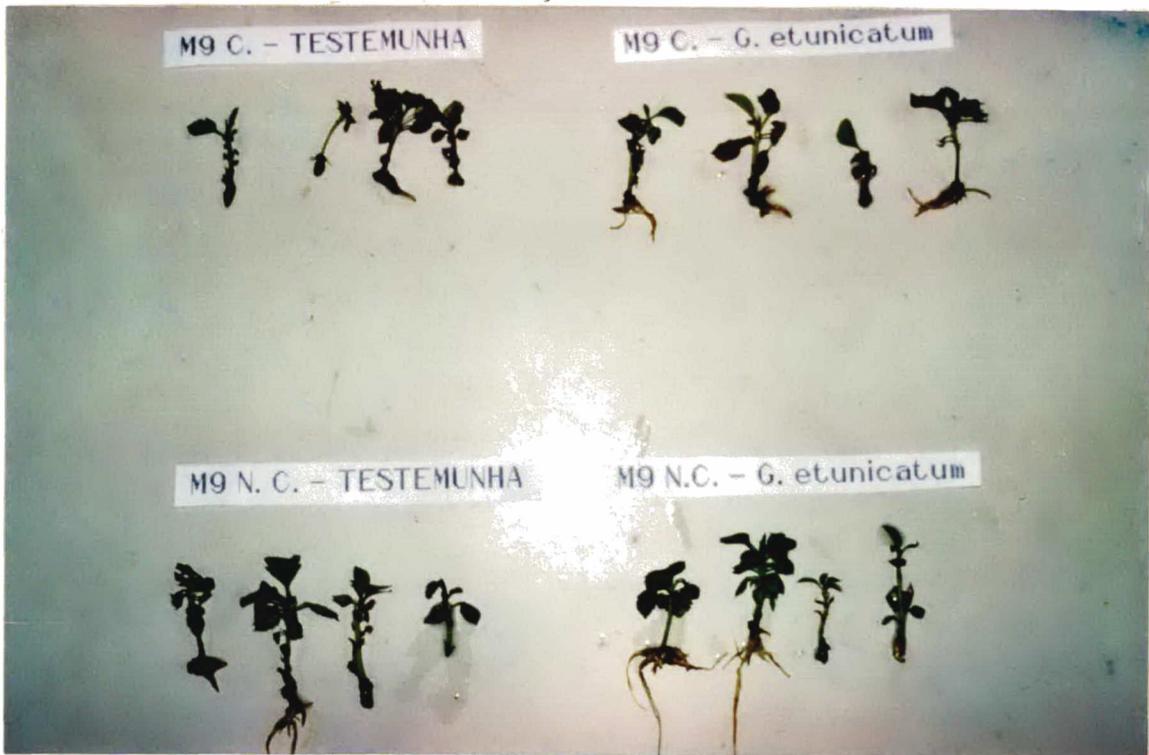


FIGURA 6: Plantas do porta-enxerto de macieira M9 micropropagadas, inoculadas e não inoculadas em substrato não calado (NC) e calado (C), após duas semanas de aclimatização.

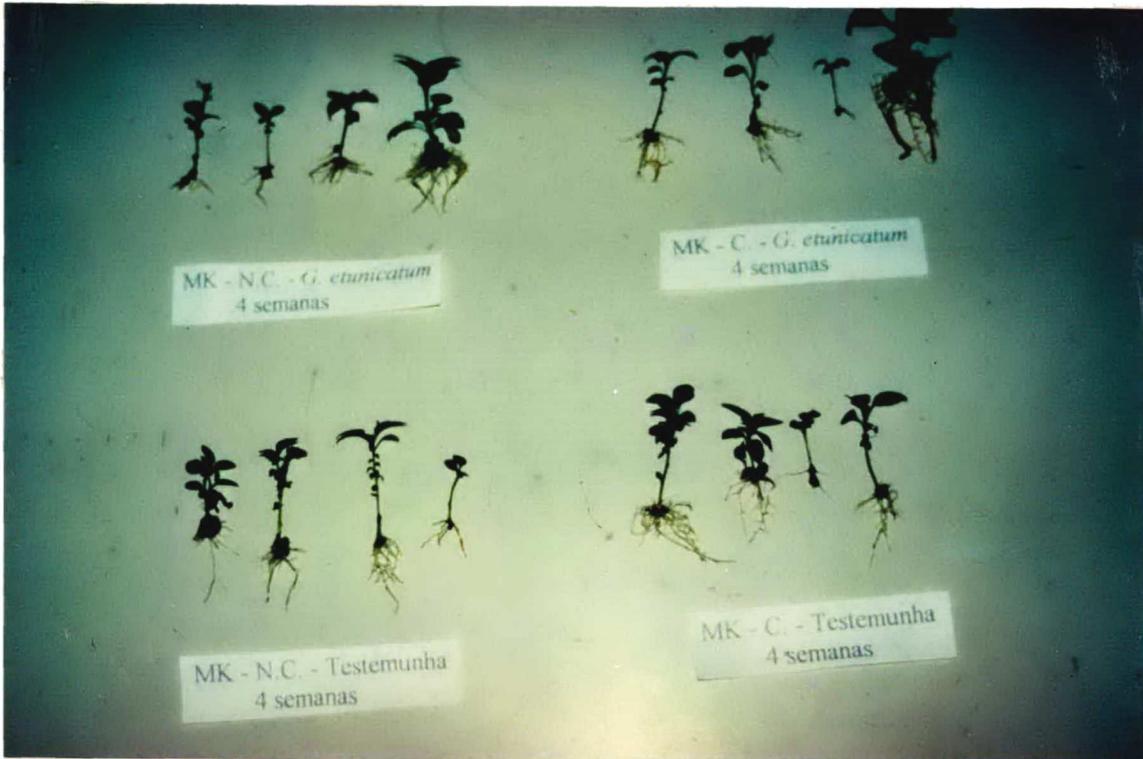


FIGURA 7: Plantas do porta-enxerto de macieira Marubakaido (MK) micropropagadas, inculcadas e não inculcadas em substrato não calado (NC) e calado (C), após quatro semanas de aclimatização.



FIGURA 8: Produção de inóculo de três espécies de *Glomus* em vasos contendo dois tipos de substratos: TR + areia (9 vasos do fundo); PV + areia (9 vasos anteriores) em casa de vegetação.

ANEXO 2: PROTOCOLOS

Protocolo 1: Inoculação de Fungos Micorrízicos Arbusculares em Porta-enxertos de Macieira Micropropagados

A) PREPARO DOS SUBSTRATOS:

Material:

- 15 kg de Terra Roxa Estruturada (TR);
- 10 kg de areia média;
- 3 l de casca de arroz calcinada;
- Hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] e óxido de magnésio (MgO);
- Autoclave;

Procedimentos:

- 1- Peneirar o solo em peneira de 4 mm para retirar torrões;
- 2- Peneirar a areia primeiro em peneira de 2,0 mm e posteriormente, a porção menor que 2,0 mm, passar em peneira de 0,71 mm;
- 3- Preparar 7 l de substrato misturando solo (TR) + casca de arroz calcinada + areia (> 2,00 mm e < 0,71 mm) na proporção 4 : 2 : 3 [v:v:v] (a casca de arroz calcinada e a areia visam tornar o substrato mais poroso, favorecendo a drenagem);
- 4- Medir o pH e o índice SMP (SHOEMAKER et al., 1961) do substrato (ROLAS 1989);

5- Fazer a calagem para pH 6,0 em 50% do substrato, utilizando hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) e óxido de magnésio (MgO), na proporção 3 : 1, respectivamente (misturar previamente os reagentes a 1 Kg da mistura e posteriormente adicionar ao resto da mistura e homogenizar). (A prática da calagem objetiva elevar o pH do substrato, visando neutralizar os efeitos tóxicos do alumínio e/ou manganês, bem como melhorar o ambiente radicular para as plantas absorverem os nutrientes essenciais disponíveis (ROLAS, 1989).

6- Umedecer o solo;

7- Deixar o Ca(OH)_2 e o MgO reagir com o substrato por um período de 5 - 7 dias;

8- Autoclavar os substratos (120°C por 45 minutos), e após um período de 2 - 3 dias autoclavar novamente;

9- Deixar o substrato em repouso por um período de 3 - 4 dias, para permitir a liberação de possíveis gases tóxicos liberados pelo processo de esterilização;

B) PREPARO DAS BANDEJAS PARA REPICAGEM E INOCULAÇÃO:

Material:

- 4 bandejas de isopor com 56 células (capacidade de 35 cm³/célula);
- 4 bandejas de plástico com tamanho suficiente para acondicionar as bandejas de isopor no seu interior (altura mínima 15cm);
- 4 filmes de plástico transparente (50 x 50 cm) ou lâmina de vidro transparente (30 x 50 cm) para cobrir as bandejas de plástico;
- Álcool

- Água sanitária
- Espátula
- 650g de inóculo de fungo micorrízico;

Procedimentos:

- 1- Lavar as bandejas de isopor em água corrente, para eliminar quaisquer resíduos;
- 2- Mergulhar as bandejas em solução de água sanitária (1% de cloro) por 1-2 dias.
Antes de utilizá-las, desinfetar com álcool 70%;
- 3- Acomodar as bandejas de isopor dentro das bandejas de plástico previamente desinfetadas com álcool 70%.
- 4- Preencher as células das bandejas de isopor com os substratos até alcançar 0,5 cm da borda superior da bandeja;
- 5- Umedecer o substrato com água destilada;
- 6- Abrir um orifício de aproximadamente 0,8 cm de diâmetro x 2,5 cm de profundidade no substrato de cada célula;
- 7- Adicionar 3 - 4g de inóculo fresco de *Glomus etunicatum* (solo contendo esporos e raízes infectadas);
- 8- Misturar o inóculo ao substrato.

C) REPICAGEM DOS PORTA-ENXERTOS M9 E MARUBAKAIDO :

Material:

- 1 bandeja de plástico (capacidade 2 l);
- pinça

- papel toalha

Procedimentos:

(OBS.: Os passos de 1 à 8 devem ser realizados em local com temperatura amena e à sombra).

- 1- Forrar o interior de uma bandeja de plástico com papel toalha, e umedecê-lo com água destilada;
- 2- Retirar as mudas dos porta-enxertos de frascos de cultura *in vitro* com auxílio de uma pinça;
- 3- Lavar as mudas dos porta-enxertos em água corrente, de forma a eliminar os restos de meio de cultura (visa impedir que haja proliferação de fungos e bactérias);
- 4- Repicar as mudas para os substratos;
- 5- Regar as mudas com água destilada;
- 6- Acrescentar uma lâmina de água de aproximadamente 0,5 cm no fundo das bandejas de plástico;
- 7- Fazer a recomposição da microbiota do solo:
 - a) Pesar 200g de inóculo de *Glomus etunicatum* (mistura de solo, esporos e raízes infectadas);
 - b) Colocar o inóculo em um béquer, adicionar 2 l de água, agitar e após 30 segundos passar em papel filtro para permitir a passagem de microorganismos exceto os propágulos de fungos micorrízicos.

- c) Adicionar 0,5 ml do filtrado em cada célula contendo a muda de porta-enxerto;
- 8- Tampar as bandejas de plástico com um filme de polietileno ou vidro transparente para manter alta umidade relativa e impedir o dessecamento das plantas;
- 9- Colocar as plantas sob sombrite (90% de sombra) à temperatura ambiente;
- 10- Após 7 dias iniciar a retirada do plástico ou vidro existente sobre as bandejas (a retirada deve ser gradual);
- 11- Passados 7 dias da repicagem, transferir as plantas para casa de vegetação, sob sombrite (50%);
- 12- Regar as plantas com água destilada de acordo com a necessidade (verificar diariamente), e anotar a eventual morte de plantas;
- 13- Após 2, 4, e 6 semanas do início do experimento, retirar uma amostra de 4 plantas por tratamento e analisar os seguintes parâmetros:
- a) altura das plantas;
 - b) peso fresco de parte aérea;
 - d) comprimento de radículas;
 - e) infecção radicular.
- 14- Submeter os resultados a análise estatística, segundo o delineamento e os métodos determinados para cada experimento.

Protocolo 2: Produção de Inóculo de Isolados de Fungos Micorrízicos Arbusculares

Material:

- 6 litros de solo Terra Roxa Estruturada (TR);
- 8 litros de solo Podzólico Vermelho-Amarelo (PV);
- 35 l de areia para mistura ($0,297 \text{ mm} < \varnothing < 2,0 \text{ mm}$);
- 10 l de pedrisco ($\varnothing > 2,0 \text{ mm}$);
- 18 vasos de 2,5 l;
- 11 vasos de 0,5 l para as testemunhas;
- sementes de *Paspalum notatum* var. *sauroae*;
- 720 ml de solo inóculo:
 - 240 ml de solo inóculo de *Glomus etunicatum*;
 - 240 ml de solo inóculo de *Glomus caledonium*;
 - 240 ml de solo inóculo de *Glomus mosseae*.

1. PREPARO DOS SUBSTRATOS

A. Preparo da areia:

- a. Secar a areia;
- b. Peneirar a areia em peneiras de 2 e 0,297 mm, e posteriormente, a fração menor que 2 mm passar em peneira de 0,297 mm;
- c. Descartar a fração menor que 0,3 mm;
- d. Lavar e secar as duas frações restantes.

B. Preparo do solo:

- a. Coletar solo Terra Roxa Estruturada e solo Podzólico Vermelho-Amarelo;
- b. Secar os solos;
- c. Peneirar o solo em peneira de 4 mm;
- d. Descartar o solo que ficou retido na peneira;

C. Preparo das misturas:

- a. Substrato 1: misturar solo Terra Roxa Estruturada com areia na proporção de 1 : 3 (v/v);
- b. Substrato 2: misturar solo Podzólico Vermelho-Amarelo com areia, na proporção 1 : 2 (v/v);
- d. Esterilizar os substratos duas vezes por 60 minutos à 120°C em autoclave, com um intervalo de 48 h entre às autoclavagens (utilizar os substratos somente 48 horas após a última autoclavagem).

2. PREPARO DAS SEMENTES

- a. Deixar as sementes de *Paspalum notatum* var. *saurae* em água destilada por 15 minutos;
- b. Retirar as sementes da água e colocá-las em solução de hipoclorito de sódio (1% de cloro) por 15 minutos;
- c. Lavar as sementes por 4 vezes em água destilada;
- d. Deixar as sementes de molho por uma hora em água destilada antes de utilizá-las;

3. PREPARO DOS VASOS

- a. Lavar e secar os vasos;
- b. Desinfectar os vasos com álcool;
- c. Colocar um disco de papel filtro no fundo de cada vaso;
- d. Colocar aproximadamente 2 cm de pedrisco (> 2 mm) em cada vaso;
- e. Colocar 2,5 l de substrato 1 em 9 vasos e posteriormente repetir os mesmo com o substrato 2;
- f. Regar cada um dos 18 vasos com 450 ml água destilada;

4. INOCULAÇÃO E SEMEADURA

- a. Fazer 20 orifícios de 4 cm de profundidade por 1 cm de diâmetro em cada vaso;
- b. Inocular três vasos de cada tipo de substrato com aproximadamente 40 ml de inóculo de cada uma das espécies de fungo a ser multiplicado, perfazendo 6 vasos por espécie de fungo;
- c. Colocar uma pequena camada de substrato nos orifícios já contendo o inóculo e fazer uma leve compactação;
- d. Semear 60 - 65 sementes desinfectadas de *Paspalum notatum* var. *saurae* em cada vaso;
- e. Cobrir as sementes com 0,5 cm de substrato e fazer uma leve compactação;
- f. Umedecer o substrato de cada vaso com 20 ml de água destilada;

- g. Distribuir uma fina camada de pedrisco (0,5 - 1,0 cm) sobre a superfície dos vasos;
- h. Colocar os vasos em casa de vegetação;
- i. Verificar diariamente a necessidade de água;
- j. Preparar controles com os substratos utilizados (sem inoculação), utilizando vasos de 500 ml.

Protocolo 3: Avaliação da Infecção Radicular

Método de Intersecções (Gridline intersect method

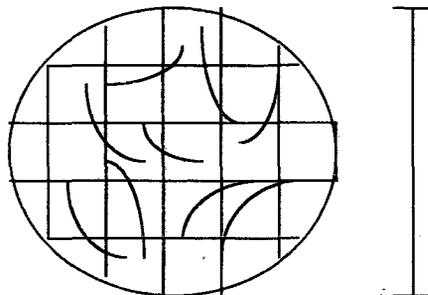
Mash (1971) e GIOVANNETTI e MOSSE (1980)

- Usar placas de Petri ($\varnothing = 8,5$ cm) e realizar um quadriculado de 1,1 cm de lado conforme a Figura abaixo;
- Espalhar as raízes coradas na placa de Petri uniformemente;
- Contar as intersecções entre as raízes e o retículo do estereomicroscópio com um aumento de 40 vezes. Contar as intersecções, e anotando aquelas que apresentarem infecção.

Erro do método (GIOVANNETTI e MOSSE, 1980)

- O erro padrão é pequeno e não depende da espécie de planta.
- A precisão é de mais ou menos 2% se contadas 200 intersecções.

Placa de Petri



Protocolo 4: Técnica de Descoloração de Raízes para Observação de Fungos

Micorrízicos Arbusculares

KOSKE, R. E. & GEMMA, J. N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. *Mycology. Research*. 92(4): 486-505.

- 1- Lavar as raízes
- 2- Mergulhar as raízes em solução KOH 2,5% por 3 minutos a 121°C ou 10 - 30 minutos a 90°C;
- 3- Lavar as raízes em água;
- 4- Se necessário, lavar as raízes em H₂O₂ alcalina (3 ml NH₄OH (20%), 30 ml H₂O₂ (3%)) por 10 - 30 minutos;
- 5- Lavar as raízes em água;
- 6- Mergulhar as raízes em solução HCl 1% por 1 - 24 horas;
- 7- Colorir as raízes em glicerol acidificado + azul de tripano por 3 minutos a 121°C ou 10 - 30 minutos a 90°C.

Solução: 500 ml Glicerol
450 ml H₂O
50 ml HCl 1%
0,05% Azul de tripan

- 8- Descolorir e estocar as raízes em solução de Glicerol acidificado;

Solução: 500 ml de Glicerol
450 ml de H₂O
50 ml de HCl 1%

Protocolo 5: Separação de Esporos de Fungos Micorrízicos Arbusculares do Solo

- 1- Coletar uma amostra de solo e secar em estufa à 90°C por uma noite.
- 2- Separar uma amostra de solo (geralmente menos que 100 g);
- 3- Adicionar a amostra de solo aproximadamente 1 l de água, agitar, deixar decantar e passar em peneiras.
- 4- Submeter o material suspenso a centrifugação por 5 minutos (2000 RPM) com água.
- 5- Descartar o sobrenadante.
- 6- Suspender o pellet em sacarose 50% e centrifugar por 1 minuto (2000 RPMs);
- 7- Despejar o sobrenadante em peneira 50 µm e lavar com água para remover a sacarose;
- 8- Transferir para placa de Petri e contar os esporos sob estereomicroscópio;