

# QUANTIFICAÇÃO DE MICÉLIO EXTRARRADICULAR DE FUNGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES EM PLANTAS CÍTRICAS. II. COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES CÍTRICAS E ENDÓFITOS<sup>(1)</sup>

R. MELLONI<sup>(2)</sup> & E. J. B. N. CARDOSO<sup>(3)</sup>

## RESUMO

Visando verificar a influência da utilização de diferentes métodos de quantificação de micélio extrarradicular ativo (MEA) e micélio extrarradicular total (MET) de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) e de diferentes hospedeiros nesta simbiose, foi realizado um experimento em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado e esquema fatorial: 3 espécies de FMAs (*Glomus intraradices*, *G. etunicatum* e *G. clarum*) e um controle sem FMA x 6 doses de P (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mg kg<sup>-1</sup> de substrato) x 2 plantas cítricas: tangerina cleópatra (*Citrus reshni*) e laranja caipira (*Citrus sinensis*), com 5 repetições por tratamento. Seis meses após o transplante e inoculação das mudas, determinaram-se altura e diâmetro do caule, colheram-se as plantas e avaliaram-se matéria seca e nutrientes da parte aérea, porcentagem de colonização radicular e comprimento de MEA e MET pelos métodos de fluorescência induzida com diacetato de fluoresceína (FDA) e redução do idonitrotetrazólio (INT). As doses crescentes de P proporcionaram redução da porcentagem de colonização radicular nos dois porta-enxertos estudados e aumentos nas características altura, diâmetro, matéria seca da parte aérea e quantidade total absorvida de macro e micronutrientes por ambos os porta-enxertos. Houve correlação negativa entre comprimento de MEA e quantidade total absorvida de macronutrientes (P, N, Ca e Mg) por laranja caipira e correlação positiva entre comprimento de MET e quantidade absorvida por tangerina cleópatra, sugerindo ser esta última mais micotrófica que a anterior, além de haver, possivelmente, outros mecanismos de absorção de nutrientes que não pelo MEA, cujos resultados variaram em função do método empregado.

**Termos de indexação:** corante, FDA, INT.

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Mestrado do primeiro autor. Trabalho realizado com auxílio da FAPESP. Recebido para publicação em junho de 1997 e aprovado em setembro de 1998.

<sup>(2)</sup> Mestre em Agronomia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ/USP. Av. Pádua Dias 11, Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba (SP). Bolsista do CNPq.

<sup>(3)</sup> Professora Titular do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas, ESALQ/USP. Bolsista do CNPq.

**SUMMARY:** *QUANTIFICATION OF EXTRARADICULAR MYCELIUM OF ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI ON CITRUS. II. COMPARISONS BETWEEN DIFFERENT CITRUS AND ENDOPHYTE SPECIES*

*Different methods for quantification of active extraradicular mycelium (AEM) and total extraradicular mycelium (TEM) of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) were examined by conducting an experiment under greenhouse conditions, with a completely randomized factorial design and five replicates per treatment. The experiment was arranged in a 4 x 6 x 2 design and the factors were: 3 species of AMF (Glomus intraradices, G. etunicatum and G. clarum) and one control without AMF x 6 levels of P (0, 50, 100, 150, 200 and 250 mg kg<sup>-1</sup>) x 2 citrus species (Citrus reshni and Citrus sinensis). Six months after transplanting, height and diameter were evaluated and the plants were harvested. Shoot dry weight, total shoot macronutrients, percentage of root infection and the length of AEM and TEM by the fluorescein diacetate (FDA) and the iodinitrotetrazolium reduction (INT) methods were also evaluated. Increasing levels of P promoted decreases in percentage of root infection and increases in plant height, diameter, dry weight and macro and micronutrients absorbed by both citrus species. There was a negative correlation between AEM and total macronutrients absorbed (P, N, Ca and Mg) by Citrus sinensis and a positive correlation between TEM and those macronutrients by C. reshni indicating that the latter host may be more mycotrophic than the former and, possibly, that there are other mechanisms of nutrient absorption rather than by AEM, with results varying in relation to the method used.*

*Index terms: FDA, INT, vital stain.*

## INTRODUÇÃO

Plantas com sistema radicular profundo e pobre em pêlos absorventes, como citros, são altamente micotróficas e dependentes de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) para a absorção de nutrientes (principalmente P) e seu desenvolvimento (Fonseca et al., 1994). O P é o nutriente mais importante nesse complexo nutricional pelo fato de estar pouco disponível, apresentar baixa mobilidade e estar em baixa concentração no solo. Então, qualquer tipo de manejo que aumente a absorção e a utilização desse nutriente seria de extrema importância para a agricultura, resultando em maior economia de fertilizantes fosfatados, fonte de insumo não-renovável.

A significativa absorção de P por plantas micorrizadas tem sido atribuída à maior exploração do solo e à maior capacidade das hifas extrarradiculares em absorver P em baixa concentração (Silveira & Cardoso, 1990; Tobar et al., 1994; Sena et al., 1997). Segundo Cardoso et al. (1986), a utilização de FMAs de grande eficiência pode promover aumentos de até 5.070% no P acumulado na parte aérea dos hospedeiros.

O efeito de P do substrato sobre a micorrização ocorre na fase de crescimento rápido com o desenvolvimento de micélio extrarradicular, múltiplas infecções e extensivo desenvolvimento interno de cada espécie de FMA (Abbott & Robson, 1985; Lambais & Cardoso, 1988). Baixas concentrações de P na planta já foram relacionadas

com o maior desenvolvimento de micélio extrarradicular (Miranda & Harris, 1994a,b), assim como diferentes fontes de P *in vitro* (Silva et al., 1991) e espécies de FMAs (Jakobsen et al., 1992). Portanto, o desenvolvimento micelial constitui importante fator na determinação da capacidade do FMA em aumentar o crescimento vegetativo, mas a sua quantificação sempre foi associada a dificuldades técnicas, principalmente na diferenciação entre fungos MAs e os não-micorrízicos, e ao uso de métodos trabalhosos de extração e avaliação (Sylvia, 1992; Vilariño et al., 1993; Cardoso Filho, 1994).

Segundo Sylvia (1988), independentemente da importância do micélio extrarradicular na absorção e translocação de nutrientes, muitos pesquisadores têm-se dedicado apenas à quantificação do comprimento de micélio total de FMAs no solo, sem distinção de micélio ativo e inativo. Uma vez que a absorção de P é um processo ativo (Beever & Burns, 1980; Schubert et al., 1987), a quantificação de micélio ativo seria de extrema importância. Há dúvidas quanto ao método mais apropriado, visto que diferentes técnicas podem fornecer resultados discrepantes (Hamel et al., 1990; Melloni & Cardoso, 1998). Os métodos enzimáticos têm sido largamente utilizados nesta avaliação, destacando-se os de fluorescência induzida com a hidrólise do diacetato de fluoresceína-FDA (Hamel et al., 1990; Sylvia, 1992; Gomes, 1997; Nogueira, 1997), indicando a presença de esterases, e o de redução do iodinitrotetrazólio-INT (Sylvia, 1992; Cardoso Filho, 1994; Kabir et al., 1997), para desidrogenases, presentes em organismos vivos.

Os objetivos do presente trabalho foram verificar a influência de utilização desses dois métodos enzimáticos de quantificação de micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET) de FMAs em estudos nutricionais de dois porta-enxertos de citros (laranja caipira e tangerina cleópatra) micorrizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolveu-se um experimento em casa de vegetação com delineamento inteiramente ao acaso e esquema fatorial 6 doses de P (0, 50, 100, 150, 200 e 250 mg kg<sup>-1</sup> de substrato) na forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O x 4 níveis de inoculação [(3 espécies de FMAs (*Glomus intraradices*, *G. etunicatum* e *G. clarum*) e um controle (sem FMA)] x 2 porta-enxertos cítricos [(tangerina cleópatra (*Citrus reshni*) e laranja caipira (*Citrus sinensis*)], com 5 repetições, em vasos plásticos de 5 litros. O substrato foi composto de 3 partes de solo Areia Quartzosa série Paredão Vermelho (pH em CaCl<sub>2</sub> 3,8; 11 g dm<sup>-3</sup> de M.O.; 3 mg dm<sup>-3</sup> de P resina; 0,2; 7; 2; 8 e 28 mmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> de K<sup>+</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup> e H<sup>+</sup>+Al<sup>+3</sup>, respectivamente), para 1 parte de areia de rio peneirada e lavada, autoclavada por 2 h a 121°C, corrigido e adubado conforme Antunes & Cardoso (1991). O substrato dos vasos foi infestado com propágulos de FMAs, utilizando-se 20 g de solo rizosférico e raízes de milho Pirão micorrizado, antes do transplantio de uma muda de tangerina cleópatra ou laranja caipira por vaso, obtida após 3 meses de crescimento em caixas de areia autoclavada. Para os vasos de controle, utilizou-se a mesma quantidade de solo rizosférico de plantas não inoculadas.

Seis meses após o transplantio, determinaram-se altura e diâmetro do caule, colheram-se as plantas e avaliaram-se: (a) matéria seca da parte aérea, após peso constante em estufa a 60°C; (b) macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) e micronutrientes (Cu, Fe e Mn) da parte aérea, segundo método descrito em Sarruge & Haag (1974); (c) porcentagem de colonização radicular (Phillips & Hayman, 1970; Giovanetti & Mosse, 1980; Bethlenfalvay & Ames, 1987) e (d) comprimentos de micélio extrarradicular ativo (MEA) e micélio extrarradicular total (MET) de FMAs pelos métodos de fluorescência induzida com hidrólise de diacetato de fluoresceína-FDA (Hamel et al., 1990; Sylvia, 1992) e de redução de idonitrotetrazólio-INT (Benefield et al., 1977; Cardoso Filho, 1994), após extração de micélio por meio do método predefinido por Melloni & Cardoso (1998).

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o nível de significância de 0,05 para o teste F. Valores relativos à porcentagem de colonização radicular foram transformados para arc sen (x/100)<sup>1/2</sup>, sendo as comparações de médias (Tukey) e as equações de regressão feitas por meio do programa estatístico SANEST (Zonta et al., 1984).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Altura, diâmetro de caule, matéria seca da parte aérea e porcentagem de colonização radicular dos porta-enxertos

Verificaram-se efeitos das interações porta-enxerto-P e P-FMAs nas variáveis altura de planta e matéria seca da parte aérea. O comportamento da variável matéria seca da parte aérea em função das doses de P pôde ser representado por equação linear para o porta-enxerto tangerina cleópatra ( $y = 0,019x + 1,0$   $R^2 = 0,90^{**}$ ) e quadrática para laranja caipira ( $y = -5,1 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,024x + 0,83$   $R^2 = 0,96^{*}$ ), revelando maior resposta do primeiro ao P. Houve correlação altamente significativa entre matéria seca da parte aérea e altura de plantas, concordando com os resultados obtidos por Gomes (1997). O efeito de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) na matéria seca da parte aérea em função das doses de P pode ser visto no quadro 1, onde *G. clarum* e *G. intraradices* destacaram-se dos demais em praticamente todas as doses de P e porta-enxertos, com médias estatisticamente superiores às de *G. etunicatum* e controle sem FMA. Para médias de ambos os porta-enxertos, verificou-se efeito quadrático de doses de P ( $y = -2,7 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,015x + 2,55$   $R^2 = 0,98^{**}$ ), com médias para laranja caipira significativamente superiores às de tangerina cleópatra quando colonizada por *G. clarum* ou *G. intraradices* (resultados não apresentados).

O efeito de doses de P nessas variáveis já era esperado, pelo fato de ter sido este o único nutriente limitante na referida condição experimental. Diversos autores (Lambais & Cardoso, 1990; Souza et al., 1991; Fonseca et al., 1994; Melloni et al., 1996a,b; Gomes, 1997; Nogueira, 1997), em estudos com micorrizas, constataram correlação positiva e significativa entre matéria seca da parte aérea e P total absorvido, conforme ocorreu em ambos os porta-enxertos. Os fungos *G. clarum* e *G. intraradices* foram os FMAs que mais se destacaram nessas variáveis, provavelmente por apresentarem alta eficiência na colonização radicular de ambos os porta-enxertos (Quadro 2).

Verificou-se efeito negativo das doses de P na porcentagem de colonização radicular dos porta-enxertos para todos os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) utilizados. Observou-se que *G. intraradices* apresentou efeito linear negativo de colonização radicular com o aumento das doses de P para ambos os porta-enxertos ( $y = -0,042x + 24,6$   $R^2 = 0,42^{**}$  para laranja caipira e  $y = -0,122x + 32,2$   $R^2 = 0,90^{**}$  para tangerina cleópatra), enquanto *G. clarum* mostrou efeito quadrático ( $y = -5,8 \cdot 10^{-4}x^2 + 0,092x + 32,7$   $R^2 = 0,68^{**}$  para laranja caipira e  $y = -7,3 \cdot 10^{-4}x^2 + 0,11x + 35,2$   $R^2 = 0,64^{**}$  para tangerina cleópatra). Pelos resultados obtidos, este último parece ser menos sensível ao aumento das doses de P, quando comparado ao *G. intraradices*, já que, mesmo em doses elevadas de P, ainda promoveu colonização dos

**Quadro 1. Matéria seca da parte aérea dos porta-enxertos (média de 10 repetições) influenciada por fungo micorrízico arbuscular e doses de fósforo e respectivas equações de regressão**

Fungo micorrízico arbuscular	Doses de P (mg kg <sup>-1</sup> de substrato)						Equação de regressão
	0	50	100	150	200	250	
	g						
Controle	0,17 a	0,35 b	1,01 b	1,51 b	2,91 b	3,86 bc	$\hat{y} = 0,015x - 0,27$ R <sup>2</sup> =0,94**
<i>G. intraradices</i>	1,41 a	3,52 a	4,16 a	4,38 a	4,62 b	5,26 ab	$\hat{y} = 0,013x + 2,26$ R <sup>2</sup> =0,82**
<i>G. etunicatum</i>	0,19 a	0,48 b	1,18 b	1,75 b	2,84 b	2,94 c	$\hat{y} = 0,012x + 0,035$ R <sup>2</sup> =0,97**
<i>G. clarum</i>	1,24 a	4,84 a	3,99 a	5,80 a	7,45 a	6,12 a	$\hat{y} = -1.10^{-4}x^2 + 0,046x + 1,60$ R <sup>2</sup> = 0,83**

Comparam-se letras na vertical. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si (Tukey a 5%). \*\* significativo a 1%.

**Quadro 2. Colonização radicular dos porta-enxertos laranja caipira e tangerina cleópatra, colonizados por FMAs, considerando as doses crescentes de P (média de 5 repetições)**

Doses P (mg kg <sup>-1</sup> )	<i>G. intraradices</i>		<i>G. etunicatum</i>		<i>G. clarum</i>	
	Laranja caipira	Tangerina cleópatra	Laranja caipira	Tangerina cleópatra	Laranja caipira	Tangerina cleópatra
	%					
0	14,2bB	27,8aA	2,0aC	0,2aB	35,2aA	38,6aA
50	19,9aA	20,4aA	2,5aB	0,1aB	22,5aA	34,2aA
100	17,5aB	14,7aB	0,1aC	0,0aC	39,2aA	32,6aA
150	3,4aB	4,6aB	0,8aB	0,0aC	32,0aA	31,0aA
200	6,6aB	0,1bB	0,6aC	0,0aB	26,6bA	39,8aA
250	8,7aA	1,2bAB	0,1aB	0,0aB	8,9aA	4,0aA

Comparam-se letras minúsculas na horizontal entre porta-enxertos para o mesmo FMA e letras maiúsculas entre FMAs do mesmo porta-enxerto. Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si (Tukey a 5%).

hospedeiros. O efeito negativo de doses de P na colonização radicular por *G. intraradices* e *G. clarum* está de acordo com Antunes & Cardoso (1991), Peng et al. (1993), Miranda & Harris (1994b), Melloni et al. (1996a,b), Nagahashi et al. (1996), Gomes (1997) e Nogueira (1997), com hipóteses ligadas à diminuição dos exsudatos radiculares, interferindo no processo inicial de desenvolvimento micelial de FMAs (Graham et al., 1981; Miranda & Harris, 1994a); ao aumento de P foliar com diminuição da permeabilidade radicular à infecção (Thomson et al., 1986; Miranda et al., 1989); à variação do fluxo de carboidratos da planta ao endófito (Buwald & Goh, 1982; Siqueira et al., 1984); ao aumento da atividade de endoquitinases e de  $\beta$ -1,3 endoglucanases, restringindo a colonização interna (Lambais & Mehdy, 1993; Lambais & Mehdy, 1995), entre outras. O FMA *G. etunicatum*, apesar de utilizado previamente por Antunes & Cardoso (1991), não demonstrou capacidade de colonização radicular em nenhum dos porta-enxertos utilizados, provavelmente por causa da ineficiência enzimática ou morfológica no processo inicial de infecção radicular.

### Absorção de nutrientes pelos porta-enxertos

O conteúdo de nutrientes (N, P, Ca e Mg) para tangerina cleópatra, considerando as doses aplicadas de P, pôde ser expresso por equações lineares [ $y(N) = 0,54x + 23,26$  R<sup>2</sup> = 0,94\*\*;  $y(P) = 0,01x + 1,19$  R<sup>2</sup> = 0,89\*\*;  $y(Ca) = 0,26x + 14,75$  R<sup>2</sup> = 0,89\*\*;  $y(Mg) = 0,07x + 4,0$  R<sup>2</sup> = 0,91\*\*], enquanto para laranja caipira verificou-se um efeito quadrático para a maioria dos nutrientes avaliados [ $y(N) = -0,002x^2 + 0,77x + 31,0$  R<sup>2</sup> = 0,95\*;  $y(P) = 0,02x + 0,85$  R<sup>2</sup> = 0,90\*\*;  $y(Ca) = -0,0008x^2 + 0,39x + 17,22$  R<sup>2</sup> = 0,92\*;  $y(Mg) = -0,0002x^2 + 0,097x + 4,66$  R<sup>2</sup> = 0,91\*]. Destacou-se maior conteúdo de P em tangerina cleópatra nas doses iguais e superiores a 200 mg kg<sup>-1</sup> de P no substrato, o que poderia explicar o maior desenvolvimento vegetativo desse porta-enxerto, quando comparado à laranja caipira nessas doses (dados não apresentados). Aumentos do conteúdo de nutrientes (P, K, S, Cu, Fe e Mn) em função das doses de P poderiam ser explicados pelo aumento da matéria seca da parte aérea das plantas (Quadro 1), reflexo, possivelmente, de três fatores: (a) exigência proporcional de nutrientes com o



crescimento e necessidade de manter um equilíbrio nutricional interno; (b) aumento do sistema radicular das plantas em função das doses de P, garantindo maior exploração do substrato e maior absorção de nutrientes, ou (c) maior desenvolvimento do micélio extrarradicular total, garantindo maior exploração superficial de substrato, transpondo a zona de depleção nutricional da raiz.

Quanto ao efeito de FMAs na composição mineral das plantas, houve resposta no conteúdo de N, S, Ca e Mg da parte aérea dos porta-enxertos, com *G. clarum* e *G. intraradices* novamente se destacando como os FMAs responsáveis pelos maiores valores. O conteúdo de P na planta relacionado com os FMAs com a aplicação de doses de P no substrato pôde ser representado por equação linear para *G. intraradices* ( $y = 0,014x + 1,98$   $R^2 = 0,88^{**}$ ) e equação quadrática para *G. clarum* ( $y = -9,4 \cdot 10^{-5}x^2 + 0,043x + 1,50$   $R^2 = 0,83^{**}$ ), com um pico de absorção para este último na dose calculada de 229 mg kg<sup>-1</sup> de P no substrato. Enquanto *G. intraradices* destacou-se pelo maior conteúdo de P comparado ao *G. clarum*, *G. etunicatum* não diferiu do controle sem FMA em nenhuma dose aplicada.

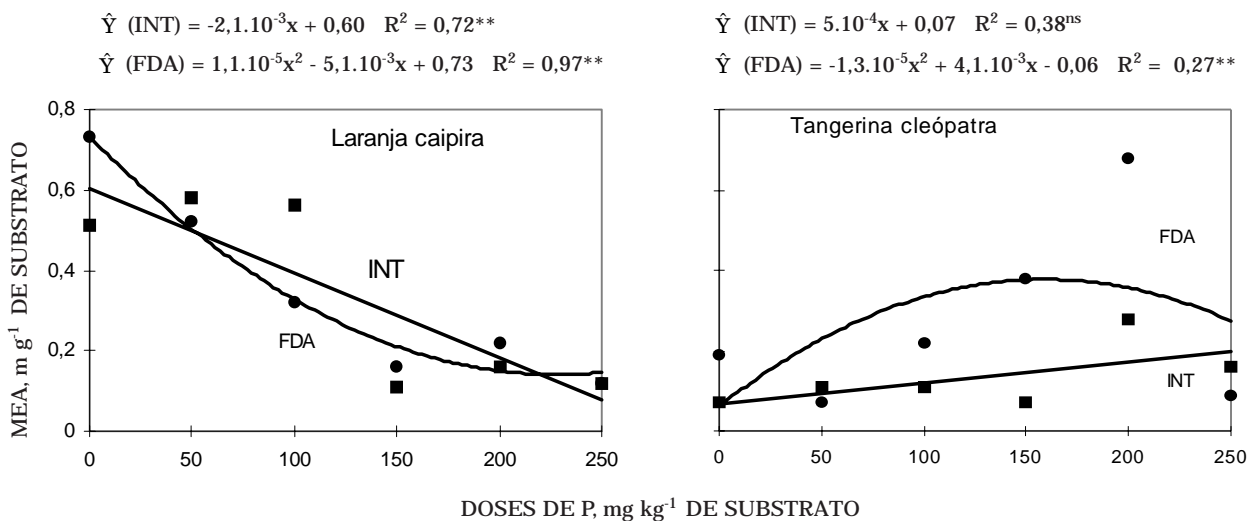
Observou-se comportamento linear positivo de conteúdo de P e matéria seca da parte aérea com o aumento das doses de P para os fungos *G. intraradices*, *G. etunicatum* e controle sem FMA. Entretanto, *G. clarum* apresentou efeito quadrático, com diminuição dos valores dessas duas variáveis a partir da dose teórica de 229 mg kg<sup>-1</sup> de P no substrato. Embora esse fungo, em doses menores de P, promova associações simbióticas mais eficientes que os demais FMAs, possivelmente em doses superiores às utilizadas poderia ocorrer depressão no crescimento vegetativo em ambos os porta-enxertos,

fenômeno demonstrado por diversos autores que utilizaram outras espécies cítricas e outros FMAs (Antunes & Cardoso, 1991; Peng et al., 1993; Gomes, 1997).

**Micélio extrarradicular ativo (MEA) e total (MET) de FMAs**

Para o método FDA, verificou-se efeito quadrático do comprimento de MEA de acordo com as doses de P, enquanto, para o método INT, o efeito pôde ser representado por equação linear, em laranja caipira e em tangerina cleópatra (Figura 1). A tendência das curvas de ambos os métodos no mesmo porta-enxerto foi semelhante, com diminuição do comprimento de MEA para laranja caipira e aumento para tangerina cleópatra até a dose 200 mg kg<sup>-1</sup> de P no substrato. Como ambos os métodos são enzimáticos e cada um atua em complexos enzimáticos diferentes, resultados controvertidos poderiam ser esperados, como de fato ocorreu, concordando com Hamel et al. (1990). Segundo Beever & Burns (1980), altas doses de P podem inibir o ciclo de Krebs e, como o INT é também reduzido por enzimas presentes neste ciclo, o método apresentaria maior sensibilidade e tenderia a indicar menor quantidade de MEA, quando comparado ao método FDA nas mesmas doses de P.

Não houve efeito significativo de FMAs na variável comprimento de MEA, mas verificou-se efeito positivo do aumento das doses de P, quando associados ao porta-enxerto tangerina cleópatra (Figura 2). Apesar de ser a suscetibilidade da planta à micorrização controlada geneticamente, a diferença de comportamento verificada entre os porta-enxertos se deve, provavelmente, a fatores morfológicos e, ou, fisiológicos, ligados à facilidade



**Figura 1. Comprimento de micélio extrarradicular ativo (MEA) de fungos micorrízicos arbusculares para laranja caipira e tangerina cleópatra, pelos métodos de fluorescência induzida (FDA) e redução de idonitrotetrazólio (INT), considerando as doses aplicadas de P (média de 20 repetições).**

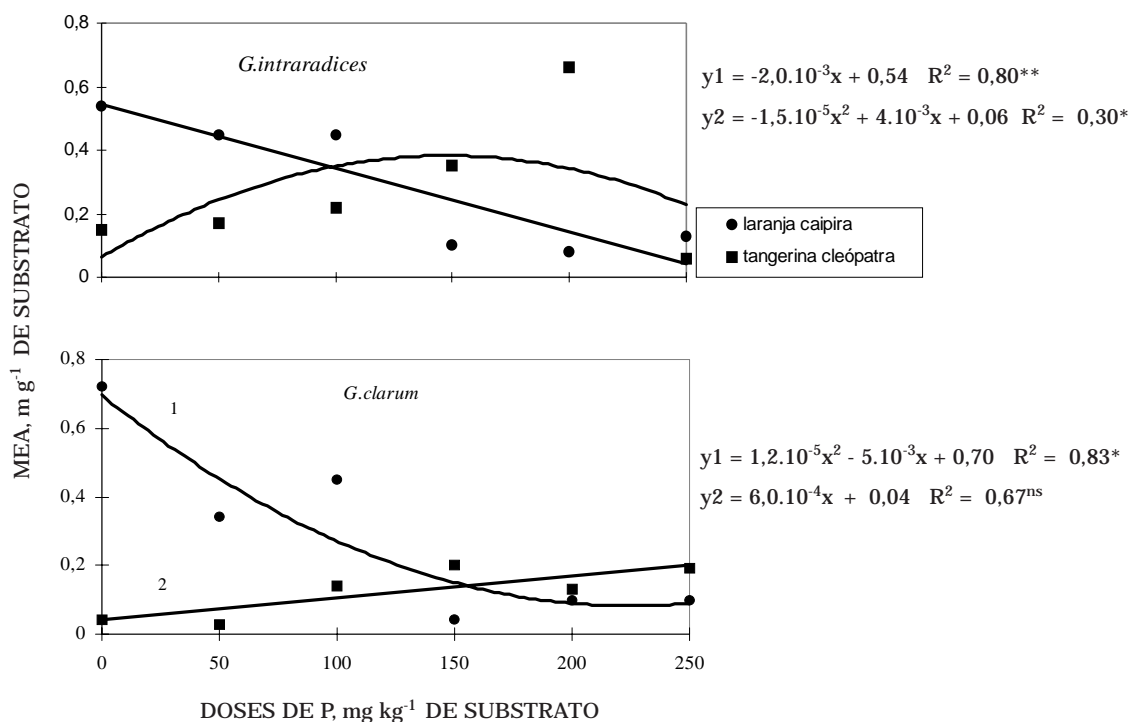
de absorção de P e outros nutrientes pela raiz; à exigência diferenciada de P pelo hospedeiro, à morfologia radicular ligada à penetração do fungo; à produção e liberação de exsudatos radiculares responsáveis pela atração e formação da comunidade biológica na micorrizosfera, e à espécie ou ao isolado de FMA utilizado, cujo grau de compatibilidade fungo-planta parece estar ligado a mecanismos de reconhecimento entre os simbiossitos (Silveira, 1992).

Foram encontrados valores consideráveis de comprimento de MEA em substratos não infestados com propágulos de FMAs (controle), evidenciando a existência de fungos sapróbios, oriundos provavelmente do inóculo original ou de contaminação natural, já que o substrato foi previamente autoclavado. Hifas de fungos não-micorrízicos não são facilmente distinguíveis daquelas produzidas pelos FMAs, por não haver diferenças morfológicas ou de coloração expressivas entre ambas (Abbott et al., 1984; Abbott & Robson, 1985; Sylvia, 1992).

Apesar dessa dificuldade de diferenciação, o comprimento de MEA de fungos sapróbios (tentativamente identificados pela maior espessura e coloração mais escura) foi superior, embora não estatisticamente diferente, em substrato-controle (principalmente em tangerina cleópatra) do que em substrato infestado com FMAs, sugerindo inibição

de desenvolvimento micelial dos primeiros na presença dos FMAs e impossibilitando a subtração dos valores, como sugerido por Sylvia (1992) e Kabir et al. (1996) para micélio extrarradiclar. Isto vem comprovar que a micorrizosfera difere profundamente da rizosfera de plantas não micorrizadas, como já discutido por Silveira (1992), e que a única maneira realmente confiável para identificar espécies de FMAs seria por meio de métodos como imunofluorescência (Kough et al., 1983; Wilson et al., 1983) ou moleculares (Lanfranco et al., 1993; Di Bonito et al., 1995; Lanfranco et al., 1995). Para todos os FMAs de laranja caipira, observou-se redução acentuada de comprimento de MEA com o aumento das doses de P, cuja causa pode estar associada aos nutrientes acrescentados quando da adubação com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , principalmente o  $\text{K}^+$ . Esse nutriente exerceria efeito inibitório no crescimento micelial pelo fato de a planta micorrizada apresentar maior absorção e concentração intracelular de P (e de K), podendo atingir níveis tóxicos ao fungo (Silva et al., 1991).

O porta-enxerto laranja caipira promoveu maior comprimento de MEA, principalmente em doses iguais ou inferiores a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  de P, quando comparado ao tangerina cleópatra, independentemente do método de avaliação empregado (Figura 1), bem como do FMA (Figura 2), sugerindo um cuidado adicional em estudos interligados, considerando a grande influência do hospedeiro nessa variável.



**Figura 2.** Comprimento de micélio extrarradiclar ativo (MEA) de *G. intraradices* e *G. clarum*, nos porta-enxertos laranja caipira e tangerina cleópatra, considerando as doses aplicadas de P e métodos FDA e INT (média de 10 repetições).

Correlações negativas significativas ( $r = -0,96^{**}$  e  $r = -0,71^{*}$ ) foram encontradas entre comprimento de MEA de FMAs (métodos FDA e INT, respectivamente) e P total absorvido por laranja caipira, contrariando resultados obtidos em experimentos que utilizaram limão-cravo (Melloni et al., 1996b) e trevo (Schubert et al., 1987). Esta poderia ser uma resposta da própria planta ao desenvolvimento micelial de FMA, a qual estaria absorvendo P pela raiz, independentemente da presença do fungo, não havendo necessidade de despendar energia para que se mantivessem as hifas ativas do fungo, responsáveis pela absorção do nutriente.

Verificou-se o oposto para tangerina cleópatra com correlação positiva e significativa ( $r = 0,68^{*}$ ) entre comprimento de MEA (método INT) e P total absorvido, concordando com os autores supracitados e revelando que a absorção de P ocorreu realmente pelo MEA, provavelmente num processo ativo com dispêndio de energia pelo hospedeiro (Beever & Burns, 1980; Cooper & Tinker, 1981; Sylvia, 1992; Kabir et al., 1997; Bago et al., 1998).

Quanto ao MET de FMAs, não se verificou diferença estatística significativa em doses iguais e inferiores a  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  de P para ambos os porta-enxertos. No entanto, em doses superiores, a tangerina cleópatra superou significativamente a laranja caipira, com comportamentos representados por equação linear para o primeiro porta-enxerto ( $y = 0,014x + 7,11$   $R^2 = 0,56^{**}$ ) e sem ajuste significativo para o segundo. Essa observação contrariou os resultados obtidos por Abbott & Robson (1985), Miller et al. (1987), Miranda et al. (1989), Miranda & Harris (1994a,b), dentre outros, que encontraram redução do crescimento micelial extrarradicular com o aumento da concentração de P na planta, e assemelhou-se aos obtidos por Crush (1976) em leguminosas, Cardoso-Filho (1994) em milho, Melloni et al. (1996b) em limão-cravo e Gomes (1997) em espécies cítricas.

Abbott et al. (1984) discutiram que o P poderia atuar ainda não diretamente no crescimento micelial, mas no aumento da densidade radicular, reduzindo a distância que o micélio deveria crescer para interceptar a raiz do hospedeiro. Tais resultados revelam que plantas com maior quantidade de P absorvida e acumulada (aquelas mais propensas à depressão de crescimento quando micorrizadas) poderiam destinar mais fotoassimilados para a formação de maior comprimento de MET, enquanto, proporcionalmente, pequena parte estaria ativa e envolvida no processo de absorção do nutriente, como verificado na figura 1.

Para laranja caipira, encontraram-se correlações positivas e significativas ( $r = 0,78^{*}$  e  $r = 0,83^{*}$ , respectivamente) entre comprimento de MEA de *G. intraradices* e *G. etunicatum* e porcentagem de colonização radicular. Isto indica, provavelmente, uma extensão das estruturas fúngicas ativas presentes no interior da raiz altamente colonizada,

corroborando com Sylvia (1988), apesar da baixa eficiência do último FMA. Teoricamente, tal comportamento era esperado, visto que, havendo maior comprimento de MEA explorando o solo, deveria existir conjuntamente maior quantidade de estruturas internas como micélio e arbúsculos para que se efetuassem as trocas nutricionais entre os simbiontes. Para o porta-enxerto tangerina cleópatra e para o fungo *G. clarum*, não foram encontradas correlações significativas para essas variáveis.

Além do P total absorvido, discutido anteriormente, observou-se correlação negativa significativa entre totais absorvidos de N, Ca, Mg e comprimento de MEA para laranja caipira, enquanto para tangerina cleópatra encontrou-se correlação positiva significativa entre os mesmos macronutrientes e comprimento de MET. Tais correlações indicam que podem existir outros mecanismos de absorção e translocação de nutrientes que não pelo MEA, como já discutido por Schubert et al. (1987) e Miranda et al. (1989).

Os dados revelam que: (a) a absorção desses nutrientes poderia não ser promovida exclusivamente pelo MEA ou (b) a alta quantidade absorvida de nutrientes pela raiz ou talvez pelo micélio extrarradicular inativo (compreendido no MET) promoveria um efeito "feed-back" negativo, reduzindo o comprimento de MEA e evitando o desvio desnecessário de fotoassimilados do hospedeiro ao FMA. Miranda et al. (1989) e Jakobsen et al. (1994) discutiram, neste sentido, que uma alta quantidade absorvida de P pelo MEA poderia diminuir a absorção radicular, ou a presença dessa absorção radicular poderia impedir o funcionamento ótimo do MEA pela competição por P ou interações com microrganismos da rizosfera. A existência de correlações positivas entre P absorvido e MEA e entre macronutrientes absorvidos (P, N, Ca e Mg) e MET somente em tangerina cleópatra indica ser ele o porta-enxerto com maior dependência micorrízica à absorção de nutrientes, ao contrário do porta-enxerto laranja caipira, que seria capaz de absorvê-los por suas próprias raízes. Segundo Oliveira & Jesus (1987), tangerina cleópatra dispõe de um sistema radicular com dominância apical e uma baixa relação de massa entre raiz e parte aérea, confirmando ser uma planta mais micotrófica, como comprovado neste trabalho.

Neste experimento, não foi encontrada correlação significativa entre comprimento de MEA e MET de FMAs em nenhum porta-enxerto utilizado, contrariando Sylvia (1988), indicando não depender da atividade micelial do MET, e vice-versa.

## CONCLUSÕES

1. Há variação no comprimento de micélio extrarradicular ativo e total de fungos micorrízicos arbúsculares quando submetidos a diferentes doses

de P e porta-enxertos de citros, a qual pode estar ligada ao método empregado de avaliação e, ou, à dependência micorrízica do hospedeiro na absorção de nutrientes.

2. As doses crescentes de P proporcionaram diminuição da porcentagem de colonização radicular de ambos os porta-enxertos e aumentos nas variáveis altura, diâmetro, matéria seca da parte aérea e quantidade total absorvida de macro e micronutrientes por ambos os porta-enxertos.

### LITERATURA CITADA

- ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. Formation of external hyphae in soil by four species of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 99:245-55, 1985.
- ABBOTT, L.K.; ROBSON, A.D. & DE BOER, G. The effect of phosphorus on the formation of hyphae in soil by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus fasciculatum*. *New Phytol.*, 97:437-46, 1984.
- ANTUNES, V. & CARDOSO, E.J.B.N. Growth and nutrient status of citrus plants as influenced by mycorrhiza and phosphorus application. *Plant Soil*, 131:11-19, 1991.
- BAGO, B.; AZCÓN-AGUILAR, C.; GOULET, A. & PICHÉ, Y. Branched absorbing structures (BAS): a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.*, 139:375-388, 1998.
- BEEVER, R.E. & BURNS, D.J.W. Phosphorus uptake, storage and utilization by fungi. In: WOOLHOUSE, H.W. *Advances in botanical research*. London, Academic Press, 1980. 286p.
- BENEFIELD, C.B.; HOWARD, P.J.A. & HOWARD, D.M. The estimation of dehydrogenase in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 9:67-70, 1977.
- BETHLENFALVAY, G.J. & AMES, R.N. Comparison of two methods for quantifying extraradical mycelium of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 51:834-837, 1987.
- BUWALDA, J.G. & GOH, K.M. Host-fungus competition for carbon as a cause of growth depressions in vesicular-arbuscular mycorrhizal ryegrass. *Soil Biol. Biochem.*, 14:103-106, 1982.
- CARDOSO FILHO, J.A. Quantificação do micélio extramatricial de *Glomus etunicatum* e da sua atividade, em simbiose com milho. Piracicaba, ESALQ/USP, 1994. 121p. (Tese de Mestrado)
- CARDOSO, E.J.B.N.; ANTUNES, V.; SILVEIRA, A.P.D. & OLIVEIRA, M.H.A. Eficiência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares em porta-enxertos de citros. *R. Bras. Ci. Solo*, 10:25-30, 1986.
- COOPER, K.M. & TINKER, P.B. Translocation and transfer of nutrients in vesicular-arbuscular mycorrhizas - IV. Effect of environmental variables on movement of phosphorus. *New Phytol.*, 88:327-339, 1981.
- CRUSH, J.R. Endomycorrhizas and legume growth in some soils of the Mackenzie Basin, Canterbury, New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.19, p.473-476, 1976.
- DI BONITO, R.; ELLIOT, M.L.; DES JARDIN, E.A. Detection of an arbuscular mycorrhizal fungus in roots of different plant species with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:2809-2810, 1995.
- FONSECA, E.B.A.; OLIVEIRA, E.; SOUZA, M. & CARVALHO, J.G. Efeitos do fósforo e fungo MVA na nutrição de dois porta-enxertos de citros. *Pesq. Agropec. Bras.*, 29:1889-1896, 1994.
- GIOVANETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol.*, 84:489-500, 1980.
- GOMES, V.F.F. Desenvolvimento de fungos micorrízicos arbusculares em três espécies de porta-enxertos cítricos sob níveis de fósforo. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997. 89p. (Tese de Doutorado)
- GRAHAM, J.H.; LEONARD, R.T. & MENGE, J.A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation. *Plant Physiol.*, 68:548-552, 1981.
- HAMEL, C.; FYLES, H. & SMITH, D.L. Measurement of development of endomycorrhizal mycelium using three different vital stains. *New Phytol.*, 115:297-302, 1990.
- JAKOBSEN, I.; ABBOTT, L.K. & ROBSON, A.D. External hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Trifolium subterraneum* L. 1. Spread of hyphae and phosphorus inflow into roots. *New Phytol.*, 120:371-380, 1992.
- JAKOBSEN, I.; JONER, E.J. & LARSEN, J. Hyphal phosphorus transport, a keystone to mycorrhizal enhancement of plant growth. In: GIANINAZZI, S. & SCHÜEPP, H., eds. *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Boston, 1994. p.133-146.
- KABIR, Z.; O'HALLORAN, I.P.; FYLES, J.W. & HAMEL, C. Seasonal changes of arbuscular mycorrhizal fungi as affected by tillage practices and fertilization: Hyphal density and mycorrhizal root colonization. *Plant Soil*, 192:285-293, 1997.
- KABIR, Z.; O'HALLORAN, I.P. & HAMEL, C. The proliferation of fungal hyphae in soils supporting mycorrhizal and non mycorrhizal plants. *Mycorrhiza*, 6:477-480, 1996.
- KOUGH, J.; MALAJCZUK, N. & LINDERMAN, R.G. Use of the indirect immunofluorescent technique to study the vesicular-arbuscular fungus *Glomus epigaeum* and other *Glomus* species. *New Phytol.*, 94:57-62, 1983.
- LAMBAIS, M.R. & CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação da germinação de esporos de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e da colonização micorrízica de *Stylosanthes guianensis* em solo ácido e distrófico. *R. Bras. Ci. Solo*, 12:249-255, 1988.
- LAMBAIS, M.R. & CARDOSO, E.J.B.N. Response of *Stylosanthes guianensis* to endomycorrhizal fungi inoculation as affected by lime and phosphorus applications. I. Plant growth and development. *Plant Soil*, 129:283-289, 1990.
- LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Suppression of endochitinase,  $\beta$ -1,3-endoglucanase, and chalcone isomerase expression in bean vesicular-arbuscular mycorrhizal roots under different soil phosphate conditions. *Mol. Plant Microb. Interact.*, 6:75-83, 1993.
- LAMBAIS, M.R. & MEHDY, M.C. Different expression of defense-related genes in arbuscular mycorrhiza. *Can. J. Bot.*, 73:533-540, 1995.



- LANFRANCO, L.; WYSS, P.; MARZACHÌ, C. & BONFANTE, P. DNA probes for identification of the ectomycorrhizal fungus *Tuber magnatum* Pico. FEMS Micro. Biol. Lett., 114:245-252, 1993.
- LANFRANCO, L.; WYSS, P.; MARZACHÌ, C. & BONFANTE, P. Generation of RAPD-PCR primers for the identification of isolates of *Glomus mosseae*, an arbuscular mycorrhizal fungus. Mol. Ecol., 4:61-68, 1995.
- MELLONI, R. & CARDOSO, E.J.B.N. Quantificação de micélio extrarradicular de fungos micorrízicos arbusculares. I. Metodologia empregada. R. Bras. Ci. Solo, 23:53-58, 1998.
- MELLONI, R.; NOGUEIRA, M.A.; FREIRE, V.F. & CARDOSO, E.J.B.N. Avaliação do estado nutricional de limoeiro cravo (*Citrus limonia*) submetido à doses crescentes de fósforo e espécies de fungos micorrízicos arbusculares. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 22., Manaus, 1996. Anais. Manaus, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1996a. p.462-463.
- MELLONI, R.; NOGUEIRA, M.A.; FREIRE, V.F. & CARDOSO, E.J.B.N. Efeito de doses de fósforo e fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de limão cravo (*Citrus limonia* L. Osbeck). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO, 13., Águas de Lindóia, 1996. Trabalhos. Campinas, USP/SLCS/SBCS/CEA/SBM, 1996b. (CD-ROM)
- MILLER, R.M.; JARSTFER, A.G. & PILLAI, J.K. Biomass allocation in an *Agropyron smithii*-*Glomus symbiosis*. Am. J. Bot., 74:114-122, 1987.
- MIRANDA, J.C.C. & HARRIS, P.J. Effects of soil phosphorus on spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytol., 128:103-108, 1994a.
- MIRANDA, J.C.C. & HARRIS, P.J. The effect of soil phosphorus on the external mycelium growth of arbuscular mycorrhizal fungi during the early stages of mycorrhiza formation. Plant Soil, 166:271-280, 1994b.
- MIRANDA, J.C.C.; HARRIS, P.J. & WILD, A. Effects of soil and plant phosphorus concentrations on vesicular-arbuscular mycorrhiza in sorghum plants. New Phytol., 112:405-410, 1989.
- NAGAHASHI, G.; DOUDS Jr., D.D. & ABNEY, G.D. Phosphorus amendment inhibits hyphal branching of the VAM fungus *Gigaspora margarita* directly and indirectly through its effect on root exudation. Mycorrhiza, 6:403-408, 1996.
- NOGUEIRA, M.A. Colonização radicular e produção de micélio externo por duas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em soja submetida a doses de fósforo. Piracicaba, ESALQ/USP, 1997. 92p. (Tese de Mestrado)
- OLIVEIRA, A.A.R. & JESUS, I.S. Efeito da infecção por fungos micorrízicos vesicular-arbusculares sobre o desenvolvimento de porta-enxertos de citros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 9, Local, 1987. Anais. Local, Editora, 1987. p. 319-325.
- PENG, S.; EISSENSTAT, D.M.; GRAHAM, J.H.; WILLIAMS, K. & HODGE, N.C. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply. Plant Physiol., 101:1063-1071, 1993.
- PHILLIPS, J.M. & HAYMAN, D.S. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Brit. Mycol. Soc. 55:158-160, 1970.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. Análises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ, 1974. 56p.
- SCHUBERT, A.; MARZACHÍ, C.; MAZZITELLI, M.; CRAVERO, M.C. & BONFANTE-FASOLO, P. Development of total and viable extraradical mycelium in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus clarum* Nicol. & Schenck. New Phytol., 107:183-190, 1987.
- SENA, J.O.A.; STEFANUTTI, R.; MALAVOLTA, E.; CARDOSO, E.J.B.N. & LABATE, C.A. Cinética de absorção de P tabaco (*Nicotiana tabacum*) submetido a doses de P e fungos micorrízicos arbusculares. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 26, Rio de Janeiro. 1997. Anais. Rio de Janeiro, SBCS-CNPS-CNPAB-UFRRJ-PESAGRO, 1997. (CD-ROM)
- SILVA, L.R.C.; PEREIRA, J. & AZEVEDO, I.C. Efeito de fontes de fósforo sobre o crescimento micelial de *Gigaspora gigantea* in vitro. R. Bras. Ci. Solo, 15:169-72, 1991.
- SILVEIRA, A.P.D. & CARDOSO, E.J.B.N. Kinetics of phosphorus uptake, growth and mineral nutrition of mycorrhizal and non-mycorrhizal bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: NORTH AMERICAN CONFERENCE ON MYCORRHIZAE, 8., Wyoming, 1990. Abstracts. Wyoming, 1990. p.264.
- SILVEIRA, A.P.D. Micorrizas. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M. & NEVES, M.C. eds. Microbiologia do Solo. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.257-282.
- SIQUEIRA, J.O.; HUBBELL, D.H.; VALLE, R.R. Effects of phosphorus on formation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Pesq. Agropec. Bras., 19:1465-1474, 1984.
- SOUZA, E.F.O.; SOUZA, M. & OLIVEIRA, E. Efeito de fungos MVA e fósforo sobre o crescimento do limoeiro cravo (*Citrus limonia* OSBEC"K), pós repicagem. Ci. Prat., 15:398-404, 1991.
- SYLVIA, D.M. Activity of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biol. Biochem., 20:39-43, 1988.
- SYLVIA, D.M. Quantification of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Methods in Microbiol., 24:54-65, 1992.
- THOMSON, B.D.; ROBSON, A.D. & ABBOTT, L.K. Effects of phosphorus on the formation of mycorrhizas by *Gigaspora calospora* and *Glomus fasciculatum* in relation to root carbohydrates. New Phytol., 103:751-765, 1986.
- TOBAR, R.; AZCÓN, R. & BAREA, J.M. Improved nitrogen uptake and transport from <sup>15</sup>N-labelled nitrate by external hyphae of arbuscular mycorrhiza under water-stressed conditions. New Phytol., 126:119-122, 1994.
- VILARIÑO, A.; ARINES, J. & SCHÜEPP, H. Extraction of vesicular-arbuscular mycorrhizal mycelium from sand samples. Soil Biol. Biochem., 25:99-100, 1993.
- WILSON, J.M.; TRINICK, M.J. & PARKER, C.A. The identification of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi using immunofluorescence. Soil Biol. Biochem., 15:439-445, 1983.
- ZONTA, E.P.; MACHADO, A.A. & SILVEIRA Jr., P. Sistemas de análise estatística para microcomputadores (SANEST). Pelotas, Universidade Federal de Pelotas, 3 1984. 151p.